

ВЫЯВЛЕНИЕ МАРКЕРОВ РЕПЛИКАЦИИ ВИРУСА ГЕПАТИТА С В МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТКАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ С

Вишневская Т.В.¹, Масалова О.В.¹, Альховский С.В.¹,
Пичугин А.В.², Шкурко Т.В.³, Келли Е.И.³,
Атауллаханов Р.И.², Блохина Н.П.³, Кушч А.А.¹

¹ ГУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, Москва

² ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва

³ Инфекционная клиническая больница № 1, Москва

Резюме. Цель работы состояла в экспериментальной оценке роли инфицирования мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) вирусом гепатита С (ВГС) в прогрессировании заболевания хроническим гепатитом С (ХГС). Для этого в клетках больных ХГС выявляли структурный core-белок и неструктурные белки ВГС, входящие в репликативный комплекс, а также геномные и репликативные цепи РНК ВГС. Исследованы образцы крови от 83 пациентов с ХГС, находящихся на разных стадиях заболевания. Белки ВГС в МКПК выявляли при помощи методов иммуноцитохимического окрашивания и проточной цитофлуориметрии с использованием 17 моноклональных антител. Геномные и репликативные цепи РНК ВГС определяли методом ОТ-ПЦР. Белки ВГС были выявлены в МКПК у 86% больных ХГС. Наиболее часто обнаруживали белок NS5A. Вирусные белки были локализованы исключительно в цитоплазме клеток крови, преимущественно в моноцитах, количество ВГС-позитивных лимфоцитов было существенно ниже. Геномные цепи РНК ВГС были выявлены в МКПК 95% пациентов, репликативные — в клетках 51% пациентов. Статистический анализ позволил установить достоверную прямую корреляцию между накоплением вирусных белков в МКПК и показателями активности и стадиями гепатита С: уровень аланинаминотрансферазы, индекс гистологической активности и степень фиброза печени. У большинства больных отмечен дисбаланс в соотношении числа лимфоцитов и моноцитов. Накопление в МКПК белков ВГС достоверно коррелировало со снижением общего количества мононуклеаров. Полученные данные позволяют сделать вывод, что МКПК являются местом активной репликации вируса, что может вызывать иммунные расстройства и усиливать тяжесть течения ХГС.

Ключевые слова: белки ВГС, РНК ВГС, мононуклеарные клетки периферической крови, моноклональные антитела.

Vishnevskaya T.V., Massalova O.V., Alkhovsky S.V., Pichyugin A.V., Shkurko T.V., Kelly E.P., Ataulakhanov R.I., Blokhina N.P., Kushch A.A.

DETECTION OF HEPATITIS C VIRUS-SPECIFIC REPLICATION MARKERS IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEARS FROM THE PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C

Адрес для переписки:

Масалова Ольга Владимировна
123098, Москва, ул. Гамалеи, 16.
НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН,
лаборатория клеточной инженерии.
Тел.: (499) 190-30-49.
Факс: (499) 190-28-67.
E-mail: ol.mas@mail.ru

Abstract. The aim of present study was to evaluate a role of peripheral blood mononuclear cell (PBMC) infection with hepatitis C virus (HCV) in chronic hepatitis C (CHC) progression under experimental conditions. To this purpose, structural core-protein and nonstructural proteins of viral replication complex,

as well as genomic and replicative RNA chains were determined in PBMCs of CHC patients. Blood samples were analyzed from 83 patients at different stages of the disease. Viral proteins were identified in PBMC by cytochemical staining and flow cytometry using 17 monoclonal antibodies. Genomic and replicative HCV RNA chains were detected by means of RT-PCR. HCV proteins were present in PBMC of 86% patients, the occurrence of NS5A protein being the highest. Viral proteins were located exclusively in cytoplasm of the blood cells, predominantly, monocytes, the number of HCV-positive lymphocytes being much lower. Genomic and replicative HCV RNA chains were detected in 95 and 51% patients, respectively. A statistically significant positive correlation was revealed between accumulation of viral proteins in PBMCs, and CHC progression estimated on the basis of alanine aminotransferase level, histological activity index, and degree of liver fibrosis. In majority of the patients, an imbalance in lymphocyte-to-monocyte ratio was shown. Accumulation of HCV proteins in PBMCs exhibited a statistically significant correlation with a decrease in total number of mononuclears. The data obtained suggest that PBMCs are a site of active viral replication, which may cause immune disorders and result into more severe clinical course of CHC. (*Med. Immunol.*, vol. 10, N 4-5, pp 397-404)

Введение

Влияние вируса гепатита С (ВГС) на иммунную систему инфицированного организма изучено недостаточно. Известно, что ВГС может вызывать аутоиммунные заболевания, криоглобулинемию, болезни иммунных комплексов и другие иммунные расстройства. Накапливаются данные об ассоциации ВГС с лимфопролиферативными заболеваниями. Однако клеточные и молекулярные механизмы взаимодействия ВГС с клетками, выполняющими иммунные функции, остаются во многом невыясненными. Ранее было установлено, что ВГС обнаруживается в клетках периферической крови больных гепатитом С. В то же время точно не определено, в каком функциональном состоянии находится вирус в мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК) и какое влияние он оказывает на специфическую активность пораженных клеток внепеченочной локализации. Предполагают, что МКПК являются резервуаром ВГС и играют ключевую роль в возникновении рецидивов после IFN-терапии или трансплантации печени [9, 19].

Некоторые исследователи полагают, что присутствие вирусной РНК в мононуклеарных клетках объясняется пассивным включением вируса путем эндоцитоза [6] или контаминацией клеток циркулирующим вирусом [15]. В настоящее время основным доказательством репликации является обнаружение репликативной, или минус-цепи РНК ВГС, однако экспериментальные данные, полученные относительно минус-РНК ВГС, расходятся [16, 22]. Ключевым подходом в доказательстве вирусной репликации в клетках периферической крови может стать выявление вирусных белков, в особенности неструктурных (NS3, NS4, NS5), которые формируют репликативный комплекс и принимают непосредственное участие в репликации вируса. Данные по этому вопросу крайне немногочисленны.

Основным объектом настоящей работы были МКПК больных хроническим гепатитом С, находящихся на разных стадиях заболевания. Цель

исследования состояла в выявлении структурных и неструктурных белков ВГС, геномных и репликативных цепей РНК ВГС в МКПК, а также в сопоставлении полученных результатов с вирусологическими, иммунологическими и клинико-морфологическими данными.

Материалы и методы

Пациенты. В работе была использована венозная кровь от 83 больных хроническим гепатитом С (ХГС), наблюдавшихся в гепатологическом центре клинической инфекционной больницы № 1 Москвы в период с мая 2006 г. по июнь 2007 г. Диагноз ХГС ставился на основании общепринятых эпидемиологических и клинических данных, а также исключения других этиологических факторов. Наличие антител к ВГС и их спектр устанавливали с помощью тест-системы «ИФА-анти-ВГС-спектр» (НПО «Диагностические тест-системы», Н. Новгород). Все пациенты имели анти-ВГС антитела в сыворотке крови. Функциональную активность печени оценивали по уровню сывороточной аланинаминотрансферазы (АЛТ). Шестидесяти трем пациентам была проведена пункционная биопсия печени (ПБП). Проведение ПБП осуществлялось после информированного согласия пациентов. Морфологические изменения в печени оценивали в баллах по модифицированной системе Metavir с определением гистологической активности (A) и степени фиброза (F) [13]. Ни один из пациентов до исследования не получал специфическую противовирусную терапию. В качестве отрицательного контроля была исследована периферическая кровь от 20 анти-ВГС негативных добровольных доноров.

Приготовление препаратов МКПК. МКПК выделяли из 10 мл цельной крови с ЭДТА в градиенте фиколл-пак (Ficoll-Paque, «Pharmacia», Швеция). Полученные клетки были отмыты три раза и ресуспендированы в растворе 0,1 М фосфатно-солевого буфера, pH 7,4 (ФСБ). Для цитологических исследований часть МКПК центри-

фугировались на цитоцентрифуге (CytoFuge 2, «StatSpin», США), фиксировались ледяным метанолом 20 мин, высушивались и хранились в ФСБ при +4°. Для проведения ПЦР суспензию МКПК и сыворотку крови хранили при -70°С.

Иммуноцитохимическое окрашивание МКПК. Белки ВГС выявляли методом непрямого иммунопероксидазного окрашивания с использованием 17 оригинальных моноклональных антител (МКА) к 5 вирусным белкам, свойства которых описаны ранее [1, 3, 5]. Использовали как отдельные антитела, так и смеси МКА к индивидуальным белкам (таблицы 1, 2). В качестве отрицательного контроля при исследовании образцов от каждого пациента применяли МКА к белку ВИЧ-1. Все МКА к белкам ВГС были также протестированы с МКПК от 20 ВГС-негативных доноров.

Приготовленные препараты инкубировали с 3% H₂O₂ 20 мин при 37°С для блокирования эндогенной пероксидазы. Затем наносили 50 мкл очищенных МКА в концентрации 100 мкг/мл в ФСБ, содержащем 1% БСА, и инкубировали 1 ч при 37°С во влажной камере. После отмывки наслаивали конъюгат – кроличьи антитела к мышиным иммуноглобулинам, меченные пероксидазой хрена (ДАКО, Дания), в растворе ФСБ, содержащем 1% БСА. Инкубировали 1 ч при 37°С во влажной камере. Затем проявляли реакцию, добавляя раствор субстрата (DAB, «Sigma», США). После каждой инкубации препараты тщательно промывали раствором ФСБ. Ядра докрашивали гематоксилином Карачи. Результаты иммуногистохимического окрашивания оценивали с помощью светового микроскопа «Opton» (Германия). Подсчет клеток проводили в 10 полях зрения при увеличении х400, учитывали относительную интенсивность окрашивания и количество окрашенных клеток. Доля окрашенных клеток оценивалась в процентах от общего числа клеток.

Проточная цитофлуориметрия. Для детекции белков ВГС в МКПК исследована кровь 83 пациентов с ХГС и 20 анти-ВГС негативных доноров. МКА к белкам core (клоны D4, 1a12), NS4 (клоны 3f12, 6b11, 1d11) и NS5A (клон 1c5) конъюгировали с ФИТЦ. Использовали 2 смеси МКА, меченных ФИТЦ: к core-белку (два МКА) и к неструктурным белкам NS4 и NS5 (четыре МКА), в конечной концентрации 20 мкг/мл. Кровь обрабатывали реактивами Fix&Perm GAS-003 («CALTAG», США). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACS CALIBUR («Becton Dickinson», США), с использованием программного обеспечения Cell Quest. Идентификацию клеток крови проводили по параметрам светорассеяния. Наличие белков ВГС внутри клеток оценивали по интенсивности флуоресценции

ФИТЦ. Положительными пробами считали те, в которых значения флуоресценции превышали таковые у нормальных доноров с учетом двух стандартных отклонений.

Детекция и генотипирование РНК ВГС. Определение РНК ВГС в сыворотках пациентов проводили методом ОТ-ПЦР с использованием праймеров на 5'-НТР, согласно Okamoto et al. [18]. Плюс- и минус-цепи РНК ВГС выявляли в лизатах МКПК 37 из 83 пациентов с ХГС с использованием праймеров, описанных ранее [14]. Генотипирование проводили по методу Ohno et al. [17].

Статистический анализ. Для обработки данных использовали программу «Биостатистика» (версия 4.03). Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента, критерию Фишера или χ^2 , зависимость между признаками оценивалась по коэффициенту линейной регрессии. Различия считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Результаты иммуноцитохимического окрашивания МКПК пациентов с ХГС с использованием 17 индивидуальных МКА и смесей МКА приведены в таблицах 1 и 2. МКА выявляли вирусные белки с разной эффективностью. Количество окрашенных клеток и интенсивность окраски у отдельных пациентов сильно варьировали. Наиболее активно с белками ВГС взаимодействовали МКА 1c5, 1d11, 3f12, 2c9 (табл. 2). Максимально белки ВГС хотя бы одним МКА были выявлены у 71 из 83 пациентов с ХГС (86%). Наиболее часто обнаруживался белок NS5A – в 61% случаев, остальные белки выявлялись с частотой

ТАБЛИЦА 1. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКОГО ВЫЯВЛЕНИЯ CORE-БЕЛКА ВГС В МКПК БОЛЬНЫХ ХГС С ПОМОЩЬЮ ПАНЕЛИ МКА

Белок	МКА	Количество АГ+ пациентов	Содержание АГ+ клеток, %
core	1a12	6/54 (11%)	1±0,8 (0,1-5)*
	1f9	9/44 (20%)	1,5±0,5 (0,1-4)
	27	12/60 (20%)	2±0,9 (0,1-10)
	D4	11/48 (23%)	1,7±1 (0,1-10)
	4g5	8/43 (19%)	0,9±0,5 (0,1-5)
	Максимальное выявление**		36/82 (44%)

Примечания: * – среднее значение; ± – стандартная ошибка относительного количества АГ+ клеток в популяции мононуклеаров крови, в скобках – диапазон значений; ** – белок выявлялся с помощью хотя бы одного МКА или смеси МКА к данному белку.

ТАБЛИЦА 2. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКОГО ВЫЯВЛЕНИЯ НЕСТРУКТУРНЫХ БЕЛКОВ ВГС В МКПК БОЛЬНЫХ ХГС С ПОМОЩЬЮ МКА

Белок	МКА	Количество АГ+ пациентов	Содержание АГ+ клеток, %
NS3	5b2	8/38 (21%)	8±4 (0,1-36)*
	2g12	8/33 (24%)	1,4±1,2 (0,1-10)
	5g2	4/14 (28,5%)	0,65±0,2 (0,1-1)
	6e9	2/7 (28,5%)	1,1±0,9 (0,2-2)
	4h8	4/24 (17%)	10,8±6 (1-30)
	Максимальное выявление**	29/83 (35%)	6,3±3,5 (0,1-36)
NS4A	3f12	32/80 (40%)	15,6±3,2 (0,1-73)
NS4B	6b11	3/10 (30%)	23,1±18 (0,3-59)
	1d11	6/8 (75%)	9,8±5 (1-36)
	Максимальное выявление**	34/78 (43%)	19,6±2,4 (0,3-59)
NS5A	2c9	18/46 (39%)	10,4±3,6 (0,2-57)
	1c5	20/40 (50%)	14,8±4 (0,1-57)
	3f4	15/51 (29%)	7,7±2,2 (0,1-30)
	6d12	5/37 (13,5%)	1,2±0,6 (0,1-3)
	Максимальное выявление**	51/83 (61%)	13,1±2,3 (0,1-57)

Примечания: те же, что и в таблице 1.

35-44%. Доля антиген-позитивных (АГ+) клеток в препаратах широко варьировала и различалась при выявлении отдельных белков ВГС. В среднем, наибольшее количество АГ+ клеток было обнаружено при выявлении неструктурных белков NS4A и NS4B (табл. 2), наименьшее – структурного белка core (табл. 1).

Вирусные антигены были обнаружены исключительно в цитоплазме клеток. Белки чаще всего обнаруживались в более крупных клетках, по морфологии сходных с моноцитами. Однако в случае большого количества окрашенных клеток АГ-позитивными были также и более мелкие мононуклеарные клетки, по-видимому, лимфоциты. МКА к белкам ВИЧ-1 не окрашивали клетки изученных больных. При окрашивании МКПК от ВГС-негативных доноров антителами к белкам ВГС результаты также были отрицательными.

Данные, полученные при иммуноцитохимическом окрашивании, были подтверждены при по-

ТАБЛИЦА 3. ВЫЯВЛЕНИЕ БЕЛКОВ ВГС В ЛЕЙКОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ ХГС МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИИ

Популяция клеток крови	Частота выявления белков ВГС	Количество АГ+ клеток
Моноциты	52% (11/21)	6,1-32,2%
Лимфоциты	19% (4/21)	1,6-4,9%
Гранулоциты	38% (8/21)	2,9-5,6%

Примечание: выявление белков ВГС в лейкоцитах периферической крови проводили у 21 из 83 пациентов с ХГС.

мощи метода проточной цитофлуориметрии. Выявление неструктурных белков методом проточной цитофлуориметрии прямо коррелировало с данными иммуноцитохимии ($r = 0,6$; $p < 0,05$). Белки ВГС обнаруживались преимущественно в моноцитах, количество ВГС-позитивных лимфоцитов и гранулоцитов было существенно ниже (табл. 3).

Изучение плюс-цепи РНК ВГС в сыворотках крови 83 пациентов с ХГС показало, что 78% образцов были положительными. В МКПК 37 больных ХГС исследовали плюс- и минус-цепи РНК ВГС. Плюс-цепи РНК ВГС были найдены в 35 образцах (95%). Минус-цепи выявлялись значительно реже – у 19 больных (51%). Наличие или отсутствие РНК ВГС в МКПК не зависело от наличия плюс-РНК в сыворотке ($p > 0,05$, по критерию χ^2). У 14 пациентов РНК присутствовала и в сыворотке, и в МКПК (как плюс-, так и минус-цепи), у одного пациента РНК не была выявлена ни в одном из исследуемых образцов (табл. 4).

Результаты выявления белков ВГС и плюс-цепей РНК ВГС в МКПК совпали в 86% случаев. У одного пациента не обнаруживались ни белки, ни РНК ВГС; пациенты, у которых при наличии белков не выявлялись плюс-цепи РНК, отсутствовали. Достоверной корреляции между этими параметрами обнаружено не было. У пациентов, в МКПК которых были обнаружены минус-цепи РНК ВГС, по сравнению с больными, в клетках которых репликативная РНК не обнаруживалась, достоверно чаще и в большем количестве клеток выявлялись белки core (72% и 29% пациентов,

ТАБЛИЦА 4. ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ РНК ВГС В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И МКПК БОЛЬНЫХ ХГС

РНК ВГС в сыворотке	Плюс-цепь РНК ВГС в МКПК			Минус-цепь РНК ВГС в МКПК		
	Обнаружена	Не обнаружена	Всего	Обнаружена	Не обнаружена	Всего
Обнаружена	23	1	24	14	10	24
Не обнаружена	12	1	13	5	8	13
Всего	35	2	37	19	18	37

соответственно) и NS5A (78% и 35% пациентов, соответственно; $p < 0,05$). Совпадение между обнаружением репликативной РНК и указанных белков составило 71%. Корреляции между наличием РНК ВГС в сыворотке крови и выявлением белков в МКПК не зафиксировано.

Для решения вопроса о взаимосвязи между выявлением вирусных антигенов в МКПК и клиническими, биохимическими, морфологическими и иммунологическими параметрами был проведен статистический анализ. Установлено, что вирусные белки достоверно чаще обнаруживались в МКПК пациентов с повышенным уровнем АЛТ (> 40 мкМ/мин·л), чем у больных с постоянно нормальным (≤ 40 мкМ/мин·л) уровнем фермента (91% и 65%, соответственно; $p < 0,05$). При сопоставлении пациентов с разной гистологической активностью гепатита показано, что core-белок выявлялся чаще в МКПК пациентов с тяжелым гепатитом ($A = 3$) по сравнению с больными, у которых наблюдались умеренные или слабовыраженные морфологические изменения в печени ($p < 0,05$). Core-белок также достоверно чаще обнаруживался в МКПК пациентов с тяжелым фиброзом и циррозом печени ($F \geq 3$), чем у больных со слабовыраженными фиброзными изменениями ткани печени (рис. 1). Интересно, что в группе больных с более высокой активностью гепатита ($A = 3$) не обнаружен белок NS4A в МКПК. У больных с продвинутой стадией болезни ($F \geq 3$) в МКПК не экспрессировались белки NS4A и NS4B.

Анализ клеток крови методом проточной цитометрии показал, что у большинства больных наблюдался дисбаланс в соотношении числа лимфоцитов и моноцитов. У 20 ВГС-негативных доноров отношение общего числа лимфоцитов к общему числу моноцитов в 1 мл крови составило $4,0 \pm 1,5$ (95% доверительный интервал 3,3-4,7), тогда как у пациентов с ХГС аналогичный индекс был значительно ниже (у 6 из 21 обследованных) или выше (у 8 из 21) нормы. Установлено, что присутствие в МКПК структурных и неструктурных белков ВГС достоверно коррелировало со снижением общего количества мононуклеаров, в том числе и лимфоцитов: $r = -0,66$, $p = 0,0011$ и $r = -0,64$, $p = 0,0019$, соответственно. При иммуноцитохимическом окрашивании показана достоверная обратная корреляция между количеством

МКПК, содержащих белок NS4B, и количеством мононуклеарных клеток крови в целом ($r = -0,49$, $p < 0,05$) и лимфоцитов, в частности ($r = -0,51$, $p < 0,05$). Для остальных белков ВГС также была выявлена подобная тенденция, однако различия не были достоверными.

Связь между присутствием вирусных белков в МКПК и другими изученными характеристиками пациентов (пол, возраст, способ инфицирования, длительность заболевания, употребление наркотиков и алкоголя) не установлена.

Обсуждение

Полученные данные показали, что наиболее активно взаимодействовали с белками ВГС МКА 1c5, 1d11, 3f12, 2c9 (табл. 2). Следует отметить, что именно эти МКА были самыми эффективными при выявлении вирусных антигенов в ткани печени больных ХГС [3]. Это свидетельствует о том, что эпитопы, выявляемые данными МКА на неструктурных белках NS4 и NS5A, являются иммунодоминантными и заслуживают внимания при разработке вакцин. Важно отметить, что последовательности, опознаваемые указанными МКА, картированы [1, 5].

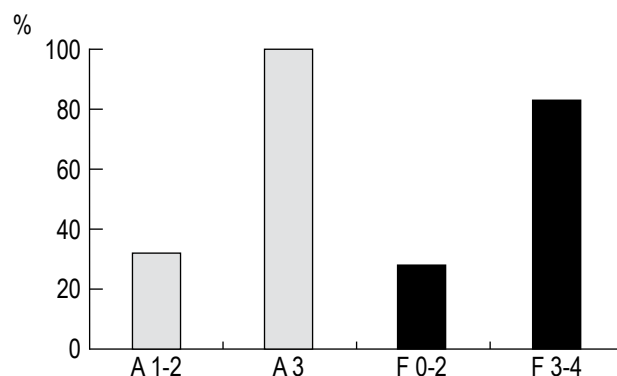


Рисунок 1. Частота выявления core-белка в МКПК пациентов с ХГС в зависимости от гистологической активности и стадии гепатита

Примечания. А – гистологическая активность гепатита:

A = 1 – слабовыраженная активность, A = 2 – умеренная активность, A = 3 – тяжелый гепатит;

F – стадия фиброза печени: F = 0 – отсутствие фиброза,

F = 1 – слабовыраженный фиброз, F = 3 – тяжелый фиброз,

F = 4 – цирроз печени.

Представляло интерес выяснить, в какой именно популяции мононуклеарных клеток, моноцитах или лимфоцитах, экспрессируются белки ВГС. Полученные при помощи проточной цитометрии данные подтвердили результаты иммуноцитохимии. Показано, что в основном белки ВГС локализируются в моноцитарной фракции периферической крови. Данные исследователей о преимущественной локализации ВГС во фракциях клеток крови расходятся. Белки ВГС выявляют преимущественно в моноцитах [11], однако работы, посвященные детекции белков, единичны. Минус-цепи РНК ВГС одни исследователи обнаруживают исключительно в В- и Т-лимфоцитах [8], тогда как другие – одновременно в лимфоцитах, в моноцитах и гранулоцитах [10].

Одной из основных задач настоящей работы было выяснение способности ВГС реплицироваться в МКПК. Данные опубликованных ранее работ значительно расходились: минус-цепи РНК ВГС либо не удавалось обнаружить в МКПК [4], либо они выявлялись у 70-80% больных ХГС [16]. Полученные нами результаты показали, что репликативная цепь РНК ВГС присутствовала у 51% пациентов, что согласуется с данными работ [12, 23]. Представляет интерес тот факт, что присутствие минус-цепей РНК ВГС в МКПК достоверно коррелировало с обнаружением белков core и NS5A. Следует отметить, что у пациентов с ХГС накопление core-белка в печени также прямо коррелировало с выявлением репликативной формы РНК ВГС [2]. Таким образом, этот белок может быть маркером активной репликации вируса. Не менее важна обнаруженная связь между наличием минус-РНК ВГС и экспрессией белка NS5A в МКПК. Этот белок наиболее часто обнаруживался нами в МКПК. Доказано, что этот неструктурный белок входит в состав репликативного комплекса и участвует в репликации ВГС [7]. Таким образом, выявление в МКПК NS5A, как и других неструктурных белков, исключает пассивную адсорбцию вирионов из периферической крови и доказывает активную репликацию ВГС в этих клетках.

Репликация вируса гепатита С в МКПК может играть важную роль при хронизации заболевания и в механизмах ускользания от иммунного ответа хозяина. Размножение вируса в иммунокомпетентных клетках может приводить к нарушению их иммунологической функции, дисфункции иммунной системы и персистенции в печеночной ткани [12]. Более ранние исследования, основанные на выявлении минус-РНК, не показали связи между репликацией ВГС в МКПК и активностью гепатита [20]. В данной работе в результате изучения белков ВГС удалось

обнаружить влияние репликации ВГС в МКПК на клиническое течение и активность заболевания. Так, белки ВГС достоверно чаще обнаруживались в МКПК пациентов с повышенным уровнем АЛТ. Core-белок достоверно чаще выявлялся в группах пациентов с более сильными некрозо-воспалительными повреждениями ткани печени ($A = 3$) и значительным фиброзным перерождением гепатоцитов ($ИФ \geq 3$). Белок NS4A, напротив, не обнаруживался в МКПК у больных с максимально тяжелыми гистологическими изменениями. Интересно, что этот белок также не выявлялся в клетках печени пациентов с терминальными стадиями ХГС [2].

Впервые показана достоверная обратная корреляция между накоплением белков ВГС в МКПК и количеством мононуклеаров периферической крови в целом, и лимфоцитов, в частности. Возможно, обнаруженный дисбаланс в соотношении лимфоцитов и моноцитов объясняется накоплением белков ВГС в этих клетках. Данные микроскопии позволили конкретизировать эти результаты и установить достоверную связь между выявлением белка NS4B и сокращением количества МКПК. Ранее было показано, что ВГС-инфекция МКПК может индуцировать Fas-зависимый апоптоз [21]. Возможно, накопление белка NS4B играет важную роль в индукции апоптоза в лимфоцитах периферической крови.

Полученные данные показывают, что в МКПК активно экспрессируются структурные и неструктурные белки ВГС, а также обнаруживаются геномные и репликативные цепи РНК ВГС. Следовательно, мононуклеары периферической крови могут быть не только резервуаром для ВГС, но также местом активной репликации вируса, что может вызывать иммунные расстройства и ассоциироваться с более тяжелым течением ХГС.

Работа выполнена при частичной поддержке Роснауки, проект № 02.512.11.2179.

Список литературы

1. Масалова О.В., Абдулмеджидова А.Г., Атаназе С.Н., Уланова Т.И., Бурков А.Н., Худяков Ю.Е., Fields Н., Куш А.А. Характеристика панели моноклональных антител и эпитоппное картирование белков вируса гепатита С // Доклады Академии Наук. – 2002. – Т. 383 (4). – С. 545-550.
2. Масалова О.В., Абдулмеджидова А.Г., Шкурко Т.В., Келли Е.И., Атаназе С.Н., Завалишина Л.Э., Франк Г.А., Кузина О.В., Львов Д.К., Куш А.А. Анализ белков вируса гепатита С в клетках печени больных хроническим гепатитом С // Вопр. вирусологии. – 2003. – Т. 48, № 1. – С. 9-14.

3. Масалова О.В., Куш А.А. Моноклональные антитела к белкам вируса гепатита С – инструмент для картирования антигенных детерминант, диагностики гепатита С и изучения вирусного патогенеза // Рос. биотерапевтический журн. – 2003. – № 3. – С. 7-23.
4. Лакина Е.И., Самохвалов Е.И., Левченко О.Г., Масалова О.В., Климова Е.А., Знойко О.О., Юшук Н.Д., Львов Д.К., Куш А.А. Выявление положительных (геномных) и отрицательных (репликативных) цепей РНК вируса гепатита С в сыворотке крови, лимфоцитах и ткани печени больных хроническим гепатитом С с помощью полимеразной цепной реакции // Вопр. вирусологии. – 2000. – Т. 45, № 4. – С. 37-42.
5. Речкина Е.А., Денисова Г.Ф., Масалова О.В., Лидеман Л.Ф., Денисов Д.А., Леснова Е.И., Атауллаханов Р.И., Гурьянова С.В., Куш А.А. Картирование антигенных детерминант белков вируса гепатита С при помощи технологии фагового дисплея // Молекуляр. биология. – 2006. – Т. 40, № 2. – С. 357-368.
6. Agnello V., Abel G., Elfahal M., Knight G.B., Zhang Q.X. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 1999. – Vol. 96. – P. 12766-12771.
7. Appel N., Schaller T., Penin F., Bartenschlager R. From structure to function: new insights into hepatitis C virus RNA replication // J. Biol. Chem. – 2006. – Vol. 281. – P. 9833-9836.
8. Baré P., Massud I., Parodi C., Belmonte L., García G., Nebel M.C., Corti M., Pinto M.T., Bianco R.P., Bracco M.M., Campos R., Ares B.R. Continuous release of hepatitis C virus (HCV) by peripheral blood mononuclear cells and B-lymphoblastoid cell-line cultures derived from HCV-infected patients // J. Gen. Virol. – 2005. – Vol. 86. – P. 1717-1727.
9. Cavalheiro N. de P., Filgueiras T.C., Melo C.E., Morimitsu S.R., Araújo E.S., Tengan F.M., Barone A.A. Detection of HCV by PCR in serum and PBMC of patients with hepatitis C after treatment // Braz. J. Infect. Dis. – 2007. – Vol. 11. – P. 471-474.
10. Crovatto M., Pozzato G., Zorat F., Pussini E., Nascimben F., Baracetti S., Grandi M.G., Mazzaro C., Reitano M., Modolo M.L., Martelli P., Spada A., Santini G. Peripheral blood neutrophils from hepatitis C virus-infected patients are replication sites of the virus // Haematologica. – 2000. – Vol. 85, N 4. – P. 356-361.
11. El-Awady M.K., Tabll A.A., Redwan el-R.M., Youssef S., Omran M.H., Thakeb F., el-Demelawy M. Flow cytometric detection of hepatitis C virus antigens in infected peripheral blood leukocytes: binding and entry // World J. Gastroenterol. – 2005. – Vol. 11. – P. 5203-5208.
12. Gong G.Z., Lai L.Y., Jiang Y.F., He Y., Su X.S. HCV replication in PBMC and its influence on interferon therapy // World J. Gastroenterol. – 2003. – Vol. 9. – P. 291-294.
13. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. The French METAVIR Cooperative Study Group // Hepatology. – 1994. – Vol. 20. – P. 15-20.
14. Lanford R.E., Chavez D., Chisari F.V., Sureau C. Lack of detection of negative-strand hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells and other extrahepatic tissues by the highly strand-specific rTth reverse transcriptase PCR // J. Virol. – 1995. – Vol. 69. – P. 8079-8083.
15. Meier V., Mihm S., Braun Wietzke P., Ramadori G. HCV-RNA positivity in peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic HCV infection: does it really mean viral replication? // World J. Gastroenterol. – 2001. – Vol. 7. – P. 228-234.
16. Navas S., Castillo I., Bartolome J., Marriott E., Herrero M., Carreno V. Positive and negative hepatitis C virus RNA strands in serum, liver and peripheral blood mononuclear cells in anti-HCV patients: relation with the liver lesion // Hepatology. – 1994. – Vol. 21. – P. 182-186.
17. Ohno O., Mizokami M., Wu R.R., Saleh M.G., Ohba K., Orito E., Mukaide M., Williams R., Lau J.Y. New hepatitis C virus (HCV) genotyping system that allows for identification of HCV genotypes 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5a, and 6a // J. Clin. Microbiol. – 1997. – Vol. 35, N 1. – P. 201-207.
18. Okamoto H., Okada S., Sugiyama Y., Tanaka T., Sugai Y., Akahane Y., Machida A., Mishiroy S., Yoshizawa H., Miyakawa Y. Detection of hepatitis C virus RNA by a two-stage polymerase chain reaction with two pairs of primers deduced from the 5'-noncoding region // Jpn. J. Exp. Med. – 1990. – Vol. 60. – P. 215-222.
19. Pugnale P., Latorre P., Rossi C., Crovatto K., Paziienza V., Gottardi A.D., Negro F. Real-time multiplex PCR assay to quantify hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells // J. Virol. Methods. – 2006. – Vol. 133. – P. 195-204.
20. Sansonno D., Iacobelli A.R., Cornacchiulo V., Iodice G., Dammacco F. Detection of hepatitis C virus (HCV) proteins by immunofluorescence and HCV RNA genomic sequences by non-isotopic in situ hybridization in bone marrow and peripheral blood mononuclear cells of chronically HCV-infected patients // Clin. Exp. Immunol. – 1996. – Vol. 103. – P. 414-421.
21. Taya N., Torimoto Y., Shindo M., Hirai K., Hasebe C., Kohgo Y. Fas-mediated apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in patients with hepatitis C // Br. J. Haematol. – 2000. – Vol. 110. – P. 89-97.

22. Tian D., Yang D., Wang W., Xia Q., Shi S., Song P., Theilmann L. Extrahepatic and intrahepatic replication and expression of hepatitis C virus // J. Tongji Med. Univ. – 1998. – Vol. 18. – P. 149-152.
23. Willems M., Peerlinck K., Moshage H., Deleu I., Van den Eynde C., Vermylen J., Yap S.H. Hepatitis C virus-RNAs in plasma and in peripheral blood mononuclear cells of hemophiliacs with chronic hepatitis C: evidence for viral replication in peripheral blood mononuclear cells // J. Med. Virol. – 1994. – Vol. 42. – P. 272-278.

поступила в редакцию 04.02.2008
отправлена на доработку 18.02.2008
принята к печати 10.06.2008