

АПОПТОЗ И ЕГО ВЗАИМОСВЯЗИ С ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНЫМ ПОВРЕЖДЕНИЕМ И НЕКОТОРЫМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ ЛОКАЛЬНОГО ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ HCV-ИНФЕКЦИИ

Скляр Л.Ф.¹, Маркелова Е.В.¹, Лукьянов П.А.²,
Сотниченко С.А.¹, Шур М.А.¹

¹ ГОУ ВПО «Владивостокский государственный медицинский университет»

² ГУ НИИ Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, г. Владивосток

Резюме. В настоящее время существуют противоречивые данные о роли апоптоза в патогенезе хронического вирусного гепатита С. Важное значение уделяется системе FAS/FAS-L в развитии апоптоза гепатоцитов. Исследовали уровень CD95⁺ на поверхности клеток гомогената печени. Зафиксировано достоверное снижение количества CD95⁺ клеток в гомогенатах печени у пациентов с более высокими показателями активности гепатита и фиброза. Установлена обратная корреляционная связь уровня CD95⁺ с концентрацией локальных цитокинов TNF α , IL-1 α , IL-10 и достоверная прямая корреляция с показателями IFN γ , IL-2, что указывает на срыв компенсаторных механизмов регуляции в системе иммунитета и преобладания антиапоптотического потенциала вируса над защитными клеточными реакциями.

Ключевые слова: хронический вирусный гепатит С, апоптоз, цитокины, биоптаты.

Sklyar L.Ph., Markelova E.V., Lukynov P.A., Sotnichenko S.A., Shur M.A.

APOPTOSIS SYSTEM AND ITS RELATIONS TO HEPATOCELLULAR DAMAGE AND SOME INDEXES OF LOCAL CYTOKINE PROFILE CHRONIC HCV INFECTION

Abstract. At present time, some conflicting data concern a possible importance of apoptosis in pathogenesis of chronic hepatitis C. A significant role is ascribed to FAS/FAS-L, as a factor of hepatocyte apoptosis. CD95⁺ levels at the cell surfaces were studied in liver homogenates. A significant decrease in CD95⁺ cells was revealed in liver samples from the patients with higher histological indexes of hepatitis activity and fibrosis. A reverse relationship between CD95⁺ level and local concentrations of cytokines (TNF α , IL-1, IL-10), as well as significant direct correlation with IFN γ , IL-2 values were detected, thus suggesting a failure of compensatory mechanisms of immune regulation, and predominance of anti-apoptotic viral potential over protective cellular responses. (*Med. Immunol.*, vol. 10, N 4-5, pp 415-422)

Введение

Роль апоптоза гепатоцитов при хронических вирусных гепатитах (ХВГ) неоднозначна. С одной стороны, запуск процессов апоптоза

при проникновении в гепатоцит вируса следует рассматривать как своего рода защитный механизм, т.к. в мертвой клетке репликация вируса становится невозможной. Поэтому «в интересах» вируса — подавить апоптоз и сохранить клетки жизнеспособными [1]. При вирусном гепатите апоптоз может быть как результатом прямого воздействия вируса, так и опосредованным иммунной реакцией [3]. Однако чаще причиной апоптоза при инфекции гепатотроп-

Адрес для переписки:

Скляр Лидия Федоровна

690105, г. Владивосток, ул. Русская, 74Б, кв. 18.

Тел.: (4232) 25-64-44, +79147916576.

E-mail: l_f_sklyar@bk.ru

ными вирусами служит не прямое цитотоксическое действие вируса, а иммунная реакция НК- и Т-лимфоцитов на его антигены, расположенные на поверхности инфицированных гепатоцитов [6]. Т-лимфоциты могут вызывать апоптоз в клетках печени двумя путями. Первый реализуется за счет выброса из Т-клеток перфорина, который образует поры в плазматических мембранах гепатоцитов. Через них в клетки проникают гранзимы — протеазы Т-лимфоцитарных гранул, вызывающие расщепление ряда внутриклеточных ферментов, в том числе каспаз, запускающих апоптозный каскад. Второй путь осуществления апоптоза под воздействием активированных Т-лимфоцитов связан со взаимодействием FAS-R—FAS-L [2]. Согласно последним сообщениям, экспрессия FAS-R существенно повышена на мембране гепатоцитов, инфицированных вирусом HCV-инфекции [4]. Особенно часто их обнаруживают на гепатоцитах, окруженных лимфоцитами на границе ступенчатого некроза и паренхимы преимущественно в перипортальной области, особенно в зонах активного воспаления [2, 14]. В свою очередь, на соответствующих лимфоцитах выявляется повышенная экспрессия FAS-L. В связи с этим можно полагать, что активация системы FAS/FAS-L при ХВГ может быть причиной гибели гепатоцитов, однако феноменология апоптоза как гепатоцитов, так и клеток инфильтрата, а также роль апоптоза в патогенезе ХВГ до конца не ясны [1, 3]. О связи экспрессии FAS и последующего апоптоза с действием вируса гепатита С свидетельствует и то, что после успешного лечения α -интерфероном количество FAS-положительных клеток резко уменьшается и коррелирует как со снижением активности трансаминаз, так и с уменьшением выраженности портальной и лобулярной лимфоидной инфильтрации ткани печени [15]. Наконец, продуцируемый преимущественно макрофагами в избыточных количествах $\text{TNF}\alpha$ также ведет к апоптозу клеток путем взаимодействия с соответствующим рецептором [6]. Вопрос о том, как вирусы гепатита С, находясь в клетках, вызывают увеличение экспрессии FAS, нуждается в дальнейшем изучении. В настоящее время существуют противоречивые данные о роли апоптоза в патогенезе хронического вирусного гепатита С. Так, S. Antonaci с соавторами (1998) и F. Farinati с соавторами (2001) при обследовании пациентов с ХВГС выявили, что экспрессия антигена CD95^+ была существенно повышена на мембране гепатоцитов, инфицированных HCV, и прямо коррелировала с гистологической активностью гепатита [11, 13]. Другие авторы, напротив, обнаружили достоверное снижение

количества клеток печени в состоянии апоптоза у пациентов с более высокими показателями индекса гистологической активности (ИГА) и аланинаминотрансферазы (АлАТ) [15]. В некоторых работах показано отсутствие корреляции между экспрессией CD95^+ и активностью ХВГС [7]. Кроме этого ряд исследований свидетельствует о том, что FAS-зависимому апоптозу при ХВГС подвержены не только гепатоциты, но и лимфоциты периферической крови, что подтверждает факт персистенции вирусов в клетках лимфоидной системы [5, 18]. Все вышесказанное подтверждает важное значение системы FAS/FAS-L в развитии апоптоза гепатоцитов и открывает новые возможности для изучения роли этой системы в патогенезе различных заболеваний печени и их лечении.

Целью нашего исследования являлось изучение некоторых показателей апоптоза гепатоцитов, их взаимосвязи с выраженностью гепатоцеллюлярного повреждения и параметрами локального цитокинового профиля в органе-мишени при хронической HCV-инфекции.

Материалы и методы

Объектом исследования были 40 пациентов с ХВГС в возрасте от 20 до 38 лет (в среднем $25,3 \pm 3,5$ года; 84% мужчин), никогда ранее не получавших лечения противовирусными препаратами. Предполагаемая давность инфицирования составляла от 2 до 5 лет. У 30% больных определить время инфицирования не представлялось возможным. Диагностика ХВГС складывалась из данных анамнеза, физического обследования, определения уровня трансаминаз, маркеров вирусной инфекции [a/bHCV-sum, a/bHCV-IgG, a/bHCV-IgM, a/bHCV-Ns(3-5)], вiremии по данным полимеразной цепной реакции (ПЦР) с генотипированием. Образцы ткани получали методом чрескожной пункционной биопсии печени иглой Менгини (исследование проводилось по индивидуальному протоколу для каждого пациента). Полученный материал в виде столбика биоптата не менее 20 мм заливался в парафин. С каждого блока готовилось около 25-30 срезов, смонтированных на нескольких стеклах по группам в зависимости от вида предполагаемой окраски. Оценивались параметры ИГА по R.G. Knodell с соавторами (1981) и индекса фиброза (ИФ) по V. Desmet с соавторами (1994) с использованием системы METAVIR [8, 12]. При гистологическом исследовании биоптатов печени у 25 (62,2%) пациентов была выявлена картина гепатита с минимальной и слабовыраженной активностью процесса (ИГА до 8 баллов), у остальных больных — с умеренной активностью (ИГА 9-12 баллов). Большинство

больных (24, или 60%) имели слабый и умеренный фиброз (ИФ-I и ИФ-II стадии), у 6 пациентов — тяжелый фиброз (ИФ-III) и у 10 пациентов (25%) признаки фиброза отсутствовали (ИФ-0).

Для оценки апоптоза изучили уровень маркера FAS-системы — CD95⁺ на поверхности клеток свежеприготовленного гомогената печени по А.А. Тотолян с соавт. (1999) методом иммунофлюоресценции с использованием набора моноклональных антител (НПЦ «МедБиоСпектр», Москва) [9]. Кроме этого, проводили определение доли апоптотических клеток и рассчитывали апоптотический индекс в свежеприготовленных гомогенатах ткани печени с помощью аннексина V-Биотина TACS (комплект «Apoptosis Detection Kits, catalog Number: TA4619», США), рассчитанного в ng AnnV/mln, согласно протоколам методик иммуногистохимических исследований, описанных в литературе [17]. Иммуногистохимическое окрашивание клеток биоптатов проводили с использованием комплекса пропидиум бромид — аннексин V-биотин. Для докраски ядер использовали обработку ФИТЦ-мечеными антителами к аннексину V-биотину и анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа параметры зеленой флуоресценции при увеличении 400 при длине волны 530–590 нм. Использовали систему визуализации Ixiover t-200 Zeiss (Германия). Уровень апоптоза рассчитывали в процентах при исследовании не менее 1000 клеток по отношению к общему количеству клеток в исследуемом образце, подсчитанных после окрашивания трепановым синим.

Анализировали содержание цитокинов — IL-1 α , IL-2, IL-10, TNF α , IFN γ в супернатанте биоптата печени пациентов ХВГС и здоровых добровольцев. Для этого 2–3 мм субстрата столбика биоптата гомогенизировали с добавлением физиологического раствора (5 мл), ресуспендировали и центрифугировали при 5000 об/мин на холоде в течение 10 мин. Полученный супернатант распределяли по 0,5 мл в эпиндорфы, замораживали и хранили до использования при –76°C. Применяли метод твердофазного ИФА с использованием диагностических наборов («R&D Diagnostics Inc.», США) с чувствительностью 1 пг/мл. Расчеты количества цитокинов проводили путем построения калибровочной кривой с помощью компьютерной программы и выражали в пг/мл.

В качестве контроля при исследовании указанных показателей использовались образцы печеночной ткани 7 добровольцев, не имеющих хронических заболеваний и маркеров инфицирования вирусами парентеральных гепатитов. Учитывая небольшие пределы разбросов показателей, мы сочли возможным ограничиться этим количеством исследований. Необходимо при-

нять во внимание также сложность и специфику забора материала. Результаты исследования обрабатывались с использованием программы «Биостат». Проверку нормальности выборок проводили с помощью оценок коэффициентов асимметрии и эксцесса, а также критериев χ^2 и Колмогорова–Смирнова. При нормальном распределении переменных проверку гипотезы о равенстве выборочных средних выполняли с использованием t-критерия Стьюдента для зависимых и независимых выборок. В случае отсутствия согласия данных с нормальным распределением для оценки различий между зависимыми и независимыми выборками применяли непараметрические критерии Вилкоксона и Манна–Уитни соответственно. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Степень зависимости между различными параметрами внутри исследуемых групп оценивали с помощью ранговой корреляции Спирмена.

Результаты и обсуждение

Локальный уровень цитокинов в ткани печени у больных с ХВГС в зависимости от ИГА представлен в таблице 1. Исследования показали, что содержание TNF α у больных ХВГС зависело от воспалительной активности в ткани печени ($48,3 \pm 6,8$ пг/мл при ИГА минимальной степени и $97,8 \pm 12,1$ пг/мл при ИГА умеренной степени активности, $p < 0,01$). Высокий уровень данного цитокина, который продуцируется моноцитами/макрофагами и Th1-лимфоцитами, знаменует активность клеточно-опосредованных реакций, обладающих альтеративными эффектами на дальнейшее течение инфекционного процесса с последующим формированием органной патологии. Также высоким был уровень IL-1 α и составлял $56,2 \pm 4,1$ пг/мл при ИГА 1–8 баллов и $100,1 \pm 13,8$ пг/мл при ИГА 9–12 баллов, что значительно отличалось от показателей у здоровых ($p < 0,05$). IL-1 α является индуцибельным белком и продуцируется в основном моноцитами/макрофагами, эндотелиальными клетками, и его гиперпродукция вызывает во многом сходные с TNF α эффекты. Уровень IL-10 в супернатантах гепатобиоптатов при ХВГС в зависимости от выраженности изменений воспалительной активности в ткани печени менялся менее показательно. У больных с минимальной степенью активности (ИГА 1–8 баллов) показатель IL-10 не отличался от значений в группе контроля ($p > 0,05$). При прогрессировании воспалительной активности до умеренно выраженной (ИГА 9–12 баллов) зафиксировано статистически достоверное увеличение локального уровня IL-10 по сравнению с контролем ($170 \pm 15,8$ и $139,4 \pm 13,2$ пг/мл соответственно, $p < 0,05$).

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ В СУПЕРНАТАНТАХ ГЕПАТОБИОПТАТОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИНДЕКСА ГИСТОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ (ИГА)

Цитокины (пг/мл)	Здоровые (n = 7)	ИГА (1-8 баллов) (n = 25)	ИГА (9-12 баллов) (n = 15)
TNF α	4,9 \pm 1,4	48,3 \pm 6,8* $p_1 < 0,05$	97,8 \pm 12,1**
IL-1 α	16,4 \pm 2,9	56,2 \pm 4,1* $p_1 < 0,05$	100,1 \pm 13,8*
IL-10	139,4 \pm 13,2	128,8 \pm 21,7 $p_1 < 0,05$	170 \pm 15,8*
IL-2	29,0 \pm 2,8	11,9 \pm 4,7* $p_1 > 0,05$	8,8 \pm 2,9*
IFN α	64,4 \pm 2,9	17,9 \pm 2,7** $p_1 < 0,05$	9,1 \pm 3,5**

Примечания. 1) различия в сравнении с контрольной группой достоверны: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; 2) достоверность различий между группами больных при разных уровнях ИГА: p_1 – с минимальной степенью активности (ИГА 1-8 баллов) и умеренной степенью активности (ИГА 9-12 баллов).

Как известно, увеличение продукции IL-10 ведет к снижению противоинфекционной защиты и хронизации инфекций вследствие изменения баланса Th-лимфоцитов в сторону Th2-типа [10]. IL-2 является своеобразным иммуномодулятором антиинфекционной защиты, ключевым звеном, определяющим развитие клеточного и гуморального иммунитета. Совместно с IL-4 он играет роль дифференцировочного фактора для цитотоксических CD8. Как главный индуктор синтеза IFN γ , IL-2 препятствует развитию иммунологической толерантности и предохра-

няет активированные Т-лимфоциты от апоптоза. Изучение локального уровня IL-2 в группах с разной степенью выраженности воспалительной активности в ткани печени показало различия статистически достоверными ($p < 0,05$). Сниженное содержание IL-2, по всей видимости, прямо связано с недостаточной активностью CD4 $^{+}$ клеток и нарушением реализации их функций по выработке, прежде всего IFN γ , а также свидетельствует о преобладании при ХВГС Th2-типа иммунного ответа. IFN γ по праву считается главным активатором макрофагов в от-

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ (пг/мл) В СУПЕРНАТАНТАХ ГЕПАТОБИОПТАТОВ У БОЛЬНЫХ ХВГС С РАЗЛИЧНОЙ СТАДИЕЙ ФИБРОЗА (ИФ)

Группы обследованных	TNF α	IL-1 α	IL-10	IL-2	IFN γ
ИФ-0	10,1 \pm 1,5* $p_2 < 0,01$ $p_3 < 0,01$ $p_4 < 0,001$	20,0 \pm 3,5 $p_2 < 0,01$ $p_3 < 0,01$ $p_4 < 0,01$	150,1 \pm 30,1 $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,01$ $p_4 < 0,01$	30,1 \pm 3,1 $p_2 > 0,01$ $p_3 < 0,01$ $p_4 < 0,01$	70,5 \pm 12,5 $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$ $p_4 < 0,01$
ИФ-I	59 \pm 2,8* $p_1 < 0,01$ $p_3 < 0,01$ $p_4 < 0,001$	70,0 \pm 11,2* $p_1 < 0,01$ $p_3 > 0,05$ $p_4 < 0,01$	170 \pm 18,5* $p_1 > 0,05$ $p_3 < 0,05$ $p_4 < 0,01$	20,5 \pm 5,1 $p_1 < 0,001$ $p_3 < 0,001$ $p_4 < 0,001$	30,1 \pm 9,5* $p_1 < 0,05$ $p_3 > 0,05$ $p_4 > 0,05$
ИФ-II	100 \pm 15,9* $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,01$ $p_4 < 0,01$	75 \pm 10,8* $p_1 < 0,01$ $p_2 > 0,05$ $p_4 < 0,05$	240 \pm 70,8* $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,05$ $p_4 < 0,01$	10,5 \pm 1,5* $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,01$ $p_4 > 0,05$	30,8 \pm 8,1* $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_4 > 0,05$
ИФ-III	200 \pm 20,8* $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,01$	100 \pm 21,5* $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,01$ $p_3 > 0,05$	450,5 \pm 80,0* $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,01$ $p_3 < 0,01$	8,3 \pm 1,1* $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,01$ $p_3 > 0,05$	25,3 \pm 7,5* $p_1 < 0,01$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$
Контроль	4,9 \pm 1,4	16,4 \pm 2,9	139,4 \pm 13,2	29,0 \pm 2,8	64,4 \pm 2,9

Примечания. Достоверность различий изучаемого показателя по сравнению с: * – контрольной группой ($p < 0,05$); p_1 – группой с ИФ-0; p_2 – группой с ИФ-I; p_3 – группой с ИФ-II; p_4 – группой с ИФ-III.

ношении выполнения деструктивных процессов инфицированных тканей. Содержание $IFN\gamma$ в супернатантах гепатобиоптатов обследованных больных ХВГС характеризовалось низким уровнем по сравнению с контролем как в группе больных с минимальной степенью воспалительной активности в ткани печени, так и в группе с умеренно выраженной активностью ($17,9 \pm 2,7$ и $9,1 \pm 1,8$ пг/мл против $64,4 \pm 2,9$ пг/мл соответственно, $p < 0,01$).

Из таблицы 2 видно, что количество провоспалительных цитокинов $IL-1\alpha$ и $TNF\alpha$, а также противовоспалительного цитокина $IL-10$ значительно повышается в супернатанте гепатобиоптатов по мере прогрессирования фиброза. При этом имеется статистически значимое отличие показателей содержания уровней цитокинов в группах пациентов с разными стадиями фиброза. Содержание $IL-1\alpha$ и $TNF\alpha$ у больных с ИФ-II и ИФ-III достоверно выше их уровня в группе больных без признаков фиброза (ИФ-0). Не определено достоверных различий между концентрацией исследуемых цитокинов в группах с ИФ-0 и начальными его проявлениями (ИФ-I) ($p > 0,05$). При сравнении содержания исследуемых цитокинов у больных с разными стадиями фиброза отмечено, что статистически значимые различия определялись в группе больных с ИФ-III ($p < 0,01$). По мере прогрессирования фиброза обнаружены значительные повышения уровней $IL-10$. Самый низкий локальный уровень провоспалительных и Th1-маркерных цитокинов наблюдался при ИФ-I для $IFN\gamma$ ($p < 0,01$) и при ИФ-II для $IL-2$ ($p < 0,05$). Содержание $IL-1\alpha$ в супернатанте печени достоверно не отличалось между показателями в группах с ИФ-II и ИФ-III ($75,0 \pm 10,8$ и $100,0 \pm 21,5$ пг/мл соответственно, $p > 0,05$). Локальный уровень $TNF\alpha$ в исследуемых группах достоверно возрастал при прогрессировании фиброза и, в отличие от сывороточного уровня, был достоверно повышен в группе с ИФ-I против ИФ-0 ($59,0 \pm 2,8$ и $10,1 \pm 1,5$ пг/мл соответственно, $p < 0,01$). Не определяется различий между уровнями локального цитокина $IL-10$ в группах пациентов с отсутствием фиброза (ИФ-0) и фиброзом ИФ-I ($p > 0,01$).

В результате исследования выявлено резкое увеличение содержания клеток печени, несущих маркер $CD95^+$ у больных ХВГС: $30,3 \pm 2,2\%$ против $7,4 \pm 1,2\%$ у здоровых доноров ($p < 0,05$). Как видно из таблицы 3, у пациентов с минимальной и слабовыраженной активностью процесса уровень клеток, содержащих на своей поверхности маркер — $CD95^+$, составил $33,0 \pm 1,2\%$, что достоверно выше, чем при умеренной активности ($23,4 \pm 5,1\%$, $p < 0,05$). При этом зафиксиро-

ТАБЛИЦА 3. СОДЕРЖАНИЕ $CD95^+$ КЛЕТОК В ГОМОГЕНАТАХ ПЕЧЕНИ С УЧЕТОМ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИНДЕКСА ГИСТОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ (ИГА) И ИНДЕКСА ФИБРОЗА (ИФ) У БОЛЬНЫХ ХВГС

Показатели	$CD95^+$, %	p
ИГА (1-8 баллов) n = 25	$33,0 \pm 1,2$	$< 0,001$
ИГА (9-12 баллов) n = 15	$23,4 \pm 5,1$ $p_1 < 0,05$	$< 0,001$
ИФ-0 n = 10	$20,3 \pm 3,4$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,05$	$< 0,01$
ИФ-I-II n = 24	$22,5 \pm 4,8$ $p_4 < 0,05$	$< 0,01$
ИФ-III n = 6	$13,5 \pm 3,2$	$< 0,05$
Контроль	$7,4 \pm 1,2$	—

Примечания. p – достоверность различий с группой контроля. Достоверность различий между группами: p_1 – ИГА (1-8) и ИГА (9-12); p_2 – ИФ-0 и ИФ-I-II; p_3 – ИФ-0 и ИФ-III; p_4 – ИФ-I-II и ИФ-III.

ровано достоверное снижение количества $CD95^+$ клеток в гомогенатах печени у пациентов с более высокими показателями ИГА и фиброза. Так, при тяжелом фиброзе (ИФ-III) уровень $CD95^+$ клеток был минимальным в гомогенате печени по сравнению с группой пациентов со слабым и умеренным фиброзом (ИФ-I-II), а также с отсутствием фиброзных изменений (ИФ-0), что соответствовало $13,5 \pm 3,2\%$ против $22,5 \pm 4,8\%$ ($p < 0,05$) и $20,3 \pm 3,4\%$ ($p < 0,05$). Выявлена обратная корреляция уровня $CD95^+$ с ИГА и фиброзом ($r = -0,57$, $p < 0,01$ и $r = -0,34$, $p < 0,01$ соответственно), т.е. минимальные уровни исследуемого показателя имели больные с наивысшим ИГА и выраженным фиброзом.

На рис. 1 и 2 представлены данные окрашивания клеток печени для исследования апоптоза с помощью используемого метода у больного с высоким уровнем апоптоза. Видно, что клетки в состоянии апоптоза отличаются яркой зеленой флюоресценцией при окрашивании. При исследовании реализации программируемой клеточной смерти в данном тесте было установлено, что у больных ХВГС количество аннексина V для связывания его с клетками печени было выше по сравнению со здоровыми ($1,32 \pm 0,32$ ngAnnV/mln против $0,53 \pm 0,02$ ngAnnV/mln соответственно, $p < 0,01$). При этом его количество достоверно уменьшалось по мере прогрессирования некрозовоспалительных повреждений в ткани печени (табл. 4). Обнаруженные более низкие значения антигена $CD95^+$ в клетках гомогенатов печени у пациентов с выраженным фиброзом, вероят-

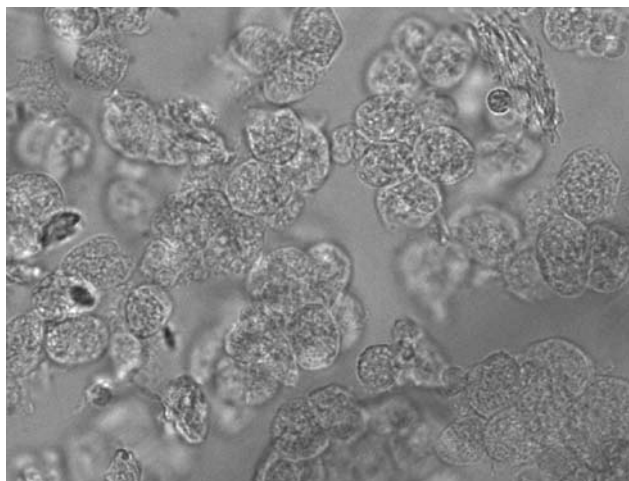


Рисунок 1. Окраска клеток биоптата печени трепановым синим. Определяется 95% жизнеспособных клеток, х600

но, являются следствием частичного замещения печеночной ткани на соединительную и, соответственно, снижением экспрессии Fas-антигена на гепатоцитах.

При изучении биоптатов печени методом световой микроскопии установлено, что у больных ХВГС с минимальной и слабовыраженной степенью активности количество апоптотических телец (телец Каунсилмена – клеток с разной степенью разрушения ядер) в 1 поле зрения в среднем составляло $4,81 \pm 0,66$, что достоверно выше, чем при умеренной активности ($2,31 \pm 0,4$, $p < 0,05$). Одновременно с увеличением количества апоптотических телец у больных с минимальной и слабовыраженной активностью наблюдалось усиление регенераторной активности печеночных клеток, что проявлялось достоверным повышением уровня полиплоидных и двуядерных гепатоцитов – $35,32 \pm 6,5$ против $12,62 \pm 2,3$ при умеренной активности процесса. Увеличение количества апоптотических телец не коррелировало со степенью некротической и воспалительной активности процесса в печени ($r = 0,01$).

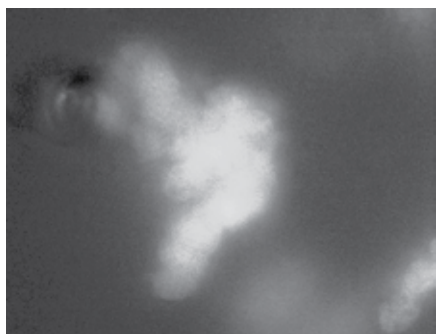


Рисунок 2. Зеленое флюоресцентное свечение апоптотических клеток при обработке ФИТЦ-мечеными антителами к анексину V, х600

ТАБЛИЦА 4. СОДЕРЖАНИЕ АНЕКСИНА V ДЛЯ СВЯЗЫВАНИЯ АПОПТОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК В ГОМОГЕНАТАХ ПЕЧЕНИ С УЧЕТОМ ИНДЕКСА ГИСТОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ (ИГА) И ИНДЕКСА ФИБРОЗА (ИФ) У БОЛЬНЫХ ХВГС (ng AnnV/mln)

Группы больных	Анексин V	p
ИГА (1-8 баллов)	$1,58 \pm 0,1$	$< 0,01$
ИГА (9-12 баллов)	$1,09 \pm 0,14$ $p_1 < 0,05$	$< 0,01$
ИФ-0	$3,1 \pm 0,2$ $p_2 < 0,01$ $p_3 < 0,01$	$< 0,001$
ИФ-I-II	$2,5 \pm 0,2$ $p_4 < 0,05$	$< 0,001$
ИФ-III	$1,97 \pm 0,1$	$< 0,01$
Контроль (здоровые)	$0,53 \pm 0,02$	–

Примечания. p – достоверность с группой контроля. Достоверность различий между группами: p_1 – ИГА (1-8) и ИГА (9-12); p_2 – ИФ-0 и ИФ-I-II; p_3 – ИФ-0 и ИФ-III; p_4 – ИФ-I-II и ИФ-III.

Результаты исследования свидетельствуют о повышенном количестве $CD95^+$ клеток в гомогенатах печени у больных ХВГС. По нашему мнению, повышение количества FAS-положительных клеток у больных правильно рассматривать как адекватную реакцию организма, направленную на элиминацию вируса. Однако наличие на поверхности клетки FAS-рецептора вовсе не означает обязательной реализации клеткой заложенной программы гибели. Для этого необходимо связывание рецептора со специфическим лигандом, в качестве которого может выступать FAS-лиганд. Это указывает на существенную роль механизмов программированной гибели клеток в патогенезе ХВГС. Снижение их апоптотической активности играет роль в прогрессировании некротических повреждений печени и может свидетельствовать об усилении дисфункции иммунной системы, связанной с нарушением равновесия в активации $CD4^+$ лимфоцитов по пути доминирования Th2-ответа. Исход HCV-инфекции, с одной стороны, связан со способностью возбудителя блокировать апоптотический потенциал инфицированной клетки, а с другой – с интенсивностью активации процесса физиологической гибели инфицированной клетки как составной части защитного механизма организма. Соответственно, патогенетическая роль $CD95^+$ зависимых механизмов гибели клеток печени носит двойственный характер: с одной стороны, это ограничение иммунного воспаления и цитотоксичности в отношении гепатоцитов, с другой стороны – уменьшение интенсивности противовирусного иммунитета

и ускользание вируса от эффекторных механизмов иммунной системы [6, 7]. Исходя из этого представляет интерес оценка взаимоотношений между состоянием апоптоза и локальным цитокиновым профилем непосредственно на органном уровне, в органе-мишени, печени при хронической HCV-инфекции.

Полученные данные свидетельствуют о том, что повышенный уровень клеток, несущих маркер апоптоза CD95⁺ в гомогенатах печени имеет обратную зависимость и коррелирует с концентрацией локальных цитокинов TNF α ($r = -0,34$, $p < 0,01$), IL-1 α ($r = -0,56$, $p < 0,01$) и IL-10 ($r = -0,66$, $p < 0,05$) по мере выраженности воспалительной активности и фиброза печени. Вероятно, противовирусная активность TNF α в условиях персистенции HCV-инфекции недостаточна, что может быть обусловлено, например, повышенной секрецией растворимых рецепторов, связывающих TNF α [13, 15]. Выявленные изменения могут быть результатом вирусиндуцированного срыва компенсаторных механизмов регуляции в системе иммунитета и преобладания антиапоптотического потенциала вируса над защитными клеточными реакциями.

Установлена достоверная прямая корреляция между концентрацией локальных цитокинов IFN γ , IL-2 и количеством проапоптотических CD95⁺ клеток ($r = 0,5$, $p < 0,01$ и $r = 0,25$, $p < 0,05$ соответственно), что, вероятно, свидетельствует о снижении противовирусной защиты на органном уровне с усилением антиапоптотических механизмов, способствующих персистенции HCV-инфекции.

Таким образом, нарушение баланса цитокинов приводит к апоптотической гибели гепатоцитов, что имеет ведущую роль в повреждении печеночной клетки при ХВГС. Чрезмерная гибель клеток, осуществляющих реализацию противовирусного иммунитета, обуславливает дефект Т-звена и неадекватность иммунного ответа, что позволяет вирусу длительно сохраняться в организме с формированием инфекционного процесса. Стратегия выживания HCV, вероятно, направлена на активное блокирование FAS-опосредованной гибели инфицированных клеток как защитной реакции организма на патоген, что способствует поддержанию хронической персистенции возбудителя.

Список литературы

1. Дмитриева Е.В., Москалева Е.Ю., Буевров А.О. Апоптоз клеток лимфоцитарного инфильтрата и клеток печени при хронических вирусных гепатитах // Успехи клинической иммунологии и аллергологии / Под ред. А.В. Караулова. — М., 2002. — Т. 3. — С. 14-33.
2. Дмитриева Е.В., Москалева Е.Ю., Коган Е.А. Роль системы Fas/FasL в индукции апоптоза гепатоцитов при хронических вирусных гепатитах // Арх. патологии. — 2003. — № 3. — С. 33-37.
3. Ивашкин В.Т., Лапина Т.Л., Бондаренко О.Ю. Процессы апоптоза и пролиферации при патологии желудочно-кишечного тракта и печени // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. — 2002. — Т. 13, № 6. — С. 38-43.
4. Матанина Н.В. Роль апоптоза при вирусных гепатитах А, В и С // Инфекционные болезни. — 2005. — Т. 3, № 1. — С. 51-54.
5. Нелюбов М.В., Абидов М.Т., Нагоев Б.С. Количество CD95⁺ лимфоцитов в крови пациентов с хроническим вирусным гепатитом С // Immunology. — 2004. — Т. 9, № 1. — С. 174.
6. Потапнев М.П. Апоптоз клеток иммунной системы и его регуляция цитокинами // Иммунология. — 2002. — № 4. — С. 237-243.
7. Сапронов Г.В., Коган Е.А., Турьянов М.Х. Цитокины апоптоза при вирусном гепатите С // Материалы VI Российского съезда врачей-инфекционистов. — СПб., 2003. — С. 339-340.
8. Серов В.В., Севергина Л.О. Морфологические критерии оценки этиологии, степени активности и стадии процесса при вирусных хронических гепатитах В и С // Арх. патологии. — 1996. — № 4. — С. 61-64.
9. Тотолян А.А., Балдавцева И.А., Бубнова Л.Н., Закревская А.В., Зуева Е.Е., Калинина Н.М., Лисицина З.Н. Стандартизация методов иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга // Мед. иммунология. — 1999. — Т. 1, № 5. — С. 21-43.
10. Тотолян А.А., Фрейдлин И.С. Клетки иммунной системы. I-II — СПб.: Наука, 2000. — 231 с.
11. Antonaci S., Schiraldi O. Costimulatory molecules and cytotoxic T cells in chronic hepatitis C: defence mechanisms devoted to host integrity or harmful events favoring liver injury progression? A review // Immunopharmacol. Immunotoxicol. — 1998. — Vol. 20. — P. 455-472.
12. Bedossa P., Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The META-VIR Cooperative Study Group // Hepatology. — 1996. — Vol. 24, N 2. — P. 769-773.
13. Farinati F., Cardin R., Fiorentino M. Imbalance between cytoproliferation and apoptosis in hepatitis C virus related chronic liver disease // J. Viral. Hepat. — 2001. — Vol. 8, N 1. — P. 34-40.
14. Kountouras J., Zavos C., Chatzopoulos D., Kountouras J. Apoptosis in hepatitis C // J. Viral. Hepat. — 2003. — Vol. 10. — P. 335-342.
15. Ohkawa K., Hiramatsu N., Mochizuki K. Significance of serum soluble Fas antigen level in chronic hepatitis C patients treated with interferon: Relation-

ship to the therapeutic response // J. Gastroenterol. Hepatol. — 2001. — Vol. 16. — P. 1009-1014.

16. Rodrigues C.M., Brites D., Serejo F. Apoptotic cell death does not parallel other indicators of liver damage in chronic hepatitis C patients // J. Viral Hepatit. — 2000. — Vol. 7. — P. 175-183.

17. Saile Mih B., Ramodori F.J. Apoptosis // Mediana Viral Join. — 2003. — Vol. 69, N 1. — P. 50-58.

18. Taya N., Torimoto Y., Shindo M. Fas-mediated apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in patients with hepatitis C // Br. J. Haematol. — 2000. — Vol. 110. — P. 89-97.

поступила в редакцию 30.04.2008

отправлена на доработку 23.05.2008

принята к печати 10.06.2008