

РАСТВОРИМЫЕ ФОРМЫ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ АНТИГЕНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ ГЕПАТИТОМ С

Вишневская Т.В., Масалова О.В., Шкурко Т.В. *,
Евсегнеева И.В. **, Птицына Ю.С. ***, Кравченко Г.А. **,
Речкина Е.А., Келли Е.И. *, Блохина Н.П. *,
Новиков В.В. **, Куш А.А.

Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, Москва

**Инфекционная клиническая больница №1, Москва*

***ННГУ им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород*

****ННИИЭМ им. И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия*

Резюме. Уровень растворимых форм (s-форм) мембранных дифференцированных антигенов может отражать состояние клеточного иммунитета и играть роль диагностических и прогностических маркеров при различных заболеваниях. Проводилось количественное определение содержания sFas (CD95), sCD38 и sHLA-DR в сыворотках больных острым и хроническим гепатитом С. Концентрацию растворимых антигенов определяли в сэндвич-варианте ИФА с использованием моноклональных и поликлональных антител к антигенам sFas, sCD38 и sHLA-DR. Полученные результаты были сопоставлены с вирусологическими и клинико-морфологическими данными. Было зарегистрировано повышение концентрации исследованных антигенов по сравнению с нормой как при остром, так и при хроническом течении инфекции. Установлено, что концентрации sFas и sHLA-DR прямо коррелируют с накоплением вирусных белков в печени и с первым генотипом вируса (1a и 1b), в целом не связаны со степенью некрозо-воспалительных изменений ткани печени и уровнем аланинаминотрансферазы, но значительно снижаются при фиброзе. Уровень sCD38 повышается в большей степени по сравнению с sFas и sHLA-DR как при остром, так и при хроническом гепатите, увеличивается при повышении гистологической активности гепатита и при инфицировании ВГС первого генотипа, но снижается при активной экспрессии белка NS4A в печени. Показано, что низкая концентрация sCD38 у пациентов с острым гепатитом С может являться благоприятным прогностическим признаком при оценке исхода заболевания. На основании полученных результатов можно заключить, что растворимые формы мембранных антигенов играют важную роль в патогенезе гепатита С.

Ключевые слова: растворимые формы дифференцированных антигенов, хронический гепатит С, острый гепатит С.

*Vishnevskaya T.V., Masalova O.V., Shkurko T.V., Evsegneeva I.V., Pitytzina Yu.S., Kravchenko G.A.,
Rechkina E.F., Kelly E.I., Blokhina N.P., Novikov V.V., Kushch A.A.*

SOLUBLE FORMS OF MEMBRANOUS ANTIGENS IN SERUM OF PATIENTS WITH HEPATITIS C

Abstract. The level of soluble forms (s-forms) of membranous antigens can reflect the cellular immunity state and play a role of diagnostic and predictive markers in various diseases. Quantitative detection of the serum levels of sFas (CD95), sCD38 and sHLA-DR was carried out in 135 patients with acute and chronic hepatitis C. The concentrations of soluble antigens were defined in a sandwich ELISA with the use of monoclonal and polyclonal antibodies to sFas, sCD38 and sHLA-DR antigens. The received results have been compared to the virological, clinical and morpho-

Адрес для переписки:

*Вишневской Т.В., 123098 г. Москва, ул. Гамалей, 16
НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН
Лаборатория клеточной инженерии
Тел.: 190-30-46, факс 190-28-67.
E-mail: t_vish77@mail.ru*

logical data. The increase in the levels of the investigated antigenes has been registered both in acute and chronic courses of the disease in comparison with healthy donors. It has been established, that sFas and sHLA-DR levels directly correlated with accumulation of virus proteins in a liver cells and with the first genotype of HCV (1a and 1b), were considerably reduced in liver fibrosis, but were not connected with a degree of necro-inflammatory changes in liver tissue and aminotransferase level. The sCD38 levels increased to the greater degree in comparison with sFas and sHLA-DR both in acute and in chronic hepatitis, it increased in high histologic activity of hepatitis and in the first genotype of HCV, but it was reduced in active expression of NS4A protein in liver cells. It was shown, that low sCD38 level in patients with acute hepatitis C can be favorable prognostic sign for the disease outcome. On the basis of the received results it is possible to conclude, that soluble forms of membranous antigenes play the important role in pathogenesis of hepatitis C. (*Med. Immunol.*, 2005, vol.7, № 1, pp 33-40)

Введение

Растворимые формы дифференцировочных антигенов – сравнительно недавно открытый класс иммунорегуляторных молекул. Известно, что уровень растворимых форм (s-форм) мембранных антигенов клеток иммунной системы может отражать состояние клеточного иммунитета и процессы активации иммунной системы [12]. В настоящее время большое внимание уделяется исследованию структуры, механизма образования, функций этого класса молекул, а также уровня их содержания и потенциальной роли при различных заболеваниях. Мембранные формы антигенов играют важную роль в инициации иммунного ответа, а их растворимые аналоги могут выступать в роли ограничителей активационных процессов, специфически ингибируя взаимодействие системы лиганд-рецептор на поверхности клетки, или, наоборот, содействуя передаче сигнала клетке [10].

Максимальные концентрации s-форм мембранных антигенов обнаруживаются в сыворотке крови и других биологических жидкостях организма при патологических состояниях, сопровождающихся длительной активацией клеток. Показано, что некоторые растворимые антигены клеток иммунной системы играют роль диагностических и прогностических маркеров при различных заболеваниях [8,10].

При гепатите С повышается содержание растворимых форм дифференцировочных антигенов, что указывает на их участие в патогенезе заболевания [3,8,17]. До настоящего времени не существует ясного понимания механизма повреждающего действия вируса гепатита С (ВГС) на клетки печени. Неясно, какие вирусные и хозяйские факторы определяют исход острого гепатита С (ОГС) – реконвалесценцию или хронизацию, и обуславливают тяжесть течения хронического гепатита С (ХГС). Большинство исследователей полагают, что нарушение Т-клеточного ответа может быть главным фактором в хронизации и прогрессировании заболевания. Практически отсутствуют данные о содержании s-форм мембранных антигенов при ОГС, данные при ХГС недостаточно полные и весьма противоречивые.

Целью настоящей работы явилось количественное изучение содержания антигенов sCD95 (Fas),

sCD38 и sHLA-DR в сыворотке крови у пациентов с острым (ОГС) и хроническим (ХГС) гепатитом С, а также сопоставление полученных результатов с вирусологическими и клинико-морфологическими данными.

Материалы и методы

Пациенты. Изучены сыворотки крови от 73 пациентов с ХГС и 62 пациентов с ОГС, поступивших в инфекционную клиническую больницу №1 г. Москвы в период 2000-2004 гг. В качестве отрицательного контроля исследовано 20 образцов сывороток от здоровых доноров крови. Функциональную активность печени оценивали по нескольким биохимическим параметрам, в частности по уровню сывороточной аланинаминотрансферазы (АЛТ). 24-ти пациентам с ОГС и 69-ти пациентам с ХГС была проведена пункционная биопсия печени (ПБП). Морфологические изменения в печени оценивали в баллах по модифицированной системе Knodell с определением индекса гистологической активности (ИГА) и индекса фиброза (ИФ).

Определение растворимых форм антигенов. Уровень растворимых форм мембранных антигенов определяли в твердофазном сэндвич – варианте ИФА с использованием моноклональных антител серии ИКО к sFas, sCD38 и sHLA-DR антигенам и поликлональных антител против антигенов мононуклеарных клеток периферической крови человека. Концентрацию s-форм мембранных антигенов выражали в условных единицах на мл сыворотки (УЕ/мл). У больных ХГС и ОГС уровень растворимых антигенов оценивали на момент ПБП или в срок около 1 месяца от начала болезни.

Детекция РНК ВГС. Определение РНК ВГС в сыворотках пациентов проводили методом ОТ-ПЦР. Генотипирование проводили по методу Ohno с соавторами [14].

Исход ОГС учитывали в среднем через $13,6 \pm 1,7$ месяцев после манифестации ОГС в 1-3 временных точках. Критериями предполагаемой реконвалесценции считали нормализацию печеночных ферментов и отсутствие РНК в сыворотке крови. Хронизацию

заболевания констатировали при выявлении РНК и/или повышении активности трансаминаз.

Детекция белков ВГС. Белки вируса гепатита С выявляли в криостатных срезах печеночных биоптатов методом иммунопероксидазного окрашивания при помощи оригинальных МКА к белкам core, NS3, NS4A, NS4B и NS5A, как описано ранее [2].

Определение Fas антигена на мембране проводили в ЛПК, которые выделяли из цельной венозной крови путем центрифугирования в градиенте фико-л-пак («Pharmacia»). Экспрессию поверхностных рецепторов Fas⁺, CD4⁺ на ЛПК оценивали с помощью непрямого иммунофлуоресцентного метода с применением моноклональных антител к соответствующим антигенам («Сорбент», Москва), долю положительных клеток выражали в %. В качестве отрицательного контроля были использованы препараты

ЛПК, полученные от 20 ВГС-негативных доноров крови.

Статистическая обработка результатов. Подсчёт средних значений, стандартных ошибок и коэффициентов корреляции проводили с использованием компьютерной программы «GraphPAD InStat v.1.12a» (Univ. of Washington, USA). Достоверность различий между изучаемыми параметрами оценивали по t-критерию Стьюдента, критерию Фишера, U-тесту Манн-Уитни, для анализа вариабельности применяли F-тест (ANOVA). Различия были статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Клинико-биохимические, морфологические и вирусологические данные пациентов. Постоянно нормаль-

Табл. 1. УРОВЕНЬ РАСТВОРИМЫХ ФОРМ МЕМБРАННЫХ АНТИГЕНОВ В СЫВОРОТКАХ БОЛЬНЫХ ХГС И ОГС

Исследуемая группа	Уровень антигена, М±m; (УЕ/мл)		
	sFas	sHLA-DR	sCD38
Доноры (n=20)	96±14 * (0-234)	83±6 (0-255)	21±6 (0-79)
ОГС (n=62)	345±59 (0-2500)	343±37 (0-3268)	203±32 (0-1075)
ХГС (n=73)	228±42 (0-2470)	251±45 (0-2700)	210±40 (0-1730)

Примечания:

* - среднее значение±стандартная ошибка;

** - диапазон значений; статистически достоверные различия с контрольной группой ($p < 0,05$) выделены жирным шрифтом

Табл. 2. СОДЕРЖАНИЕ s-ФОРМ МЕМБРАННЫХ АНТИГЕНОВ В СЫВОРОТКАХ БОЛЬНЫХ ХГС

Исследуемая группа		Уровень антигена, М±m; (УЕ/мл)		
		sFas	sHLA-DR	sCD38
ИГА (баллы)	1 – 3 (n=6)	219±112	232±91	104±30
	4 – 8 (n=40)	280±75	239±50	234±65
	9 - 12 (n=22)	197±43	311±127	215±52
ИФ (баллы)	(n=62)	260±50	286±60	233±50
	≥ 3 (n=11)	93±23	139±18	136±68
Уровень АЛТ	повышен (n=57)	242±52	251±53	224±49
	в норме (n=16)	173±45	247±93	156±43
РНК ВГС в сыворотке	+ (n=33)	201±75	164±20	214±56
	- (n=22)	212±55	349±124	137±41
Белки ВГС в печени	+ (n=39)	305±68	250±43	224±60
	- (n=13)	137±13	178±57	209±123
core	+ (n=12)	379±209 *	180±20	187±51
	- (n=35)	212±32 *	260±50	237±77
NS3	+ (n=12)	379±192 *	183±26	147±40
	-(n=20)	189±34 *	282±63	212±87
NS4A	+ (n=13)	174±24	296±94	116±3
	- (n=16)	198±44	160±32	198±106
NS4B	+ (n=34)	331±78 *	363±50	231±66
	- (n=17)	132±11 *	183±50	218±112
NS5A	+ (n=25)	344±103 *	290±64	260±87
	- (n=16)	166±18 *	198±46	221±105

Примечания: статистически достоверные различия между группами ($p < 0,05$) выделены жирным шрифтом; * корреляция между уровнем sFas и степенью накопления белков в печени статистически достоверна ($p < 0,05$)

ный уровень АЛТ (до 40 мкмоль/мин.л) наблюдался у 22% больных, у остальных он превышал норму в 1,5-5 раз. РНК ВГС выявлена в сыворотках 33 из 55 (60%) обследованных пациентов. При гистологическом исследовании биопсий печени у большинства пациентов с ХГС (59%) была выявлена картина гепатита со слабовыраженной активностью (ИГА 4-8 баллов), у 32% - с умеренной активностью (ИГА 9-12 баллов), у меньшей части (9%) - с минимальной активностью (ИГА до 4 баллов) (табл.2). Большинство больных (85%) имели слабый или умеренный фиброз печени, 15% - выраженный фиброз или цирроз печени (ИФ \geq 3). Белки ВГС были изучены в печени 52 пациентов и выявлены у 75%, индивидуальные белки core, NS3, NS4A, NS4B и NS5A обнаружены у 24, 38, 45, 67 и 61% больных, соответственно.

У всех пациентов с ОГС уровень АЛТ в начале заболевания превышал норму более чем в 10 раз, у большинства развилась желтуха. ПБП была проведена у 24 пациентов. Исследование биопсий печени показало, что около половины из них (46%) имели гистологические изменения, характерные для гепатита со слабовыраженной активностью, остальные - с умеренной активностью; пациенты с минимальными изменениями в печени отсутствовали (табл.3). Подавляющее большинство больных (85%) имели слабый или умеренный фиброз печени, однако у 3 пациентов обнаружены начальные признаки формирующегося фиброза. РНК ВГС выявлена в начале заболевания у всех исследованных пациентов, в срок около 1 месяца - у половины больных. Генотипирование РНК ВГС, проведенное у 15 больных, показало наличие субтипа 1b у 7 (47%), 1a - у 2 (13%), 2a - у 2 (13%) и 3a - у 4 пациентов (27%). Хотя бы один из белков ВГС в клетках печени обнаруживался у всех из 20 обследованных пациентов, индивидуальные белки выявлялись с частотой 89-95%. Исход ОГС можно было оценить у 22 пациентов, из них

у 5 (23%), вероятно, произошла биохимическая и вирусологическая ремиссия, у остальных пациентов ОГС хронизировался.

При исследовании сывороточных уровней растворимых дифференцировочных антигенов наблюдался большой разброс индивидуальных значений у пациентов как с ХГС, так и с ОГС, тогда как у здоровых доноров он был незначительным (табл.1). Концентрации s-форм в сыворотках больных ОГС, взятых в разные сроки от начала заболевания (от 16 дней до 2 лет), меньше различались между собой, чем между отдельными пациентами: вариабельность между группами (разными пациентами) была достоверно больше по сравнению с внутригрупповой (разные сроки) вариабельностью ($F=27$, $p<0,0001$). Сравнение уровней трех исследуемых s-форм показало, что у пациентов с ХГС концентрация sHLA-DR достоверно коррелировала с концентрациями sFas ($r=0,4$; $p<0,05$) и с sCD38 ($r=0,47$; $p<0,05$); у больных с ОГС высокая корреляция ($r=0,8$, $p<0,0001$) обнаружена между sHLA-DR и sFas. При ОГС уровень sFas достоверно коррелировал с количеством Fas+ на ЛПК ($r=0,4$; $p<0,05$), при ХГС связи между этими параметрами не установлено ($r<0,3$).

Сывороточный уровень sFas у пациентов с ХГС и ОГС. У пациентов с ХГС в среднем уровень sFas был повышен по сравнению с нормой, однако статистически достоверные различия обнаружены не были (табл.1). Зависимости концентрации sFas от вирусемии, уровня АЛТ и гистологической активности не наблюдалось (табл.2). Количество sFas было значительно ниже у больных ХГС с тяжелым фиброзом и циррозом печени, чем у пациентов с умеренными фиброзными изменениями. У пациентов с наличием белков ВГС в печени уровень sFas был выше по сравнению с больными, у которых белки ВГС выявлены не были (табл.2). Была обнаружена слабая, но статистически достоверная корреляция между степенью накопления белков core, NS3, NS4B и NS5A в

Табл. 3. СОДЕРЖАНИЕ s-ФОРМ МЕМБРАНЫХ АНТИГЕНОВ В СЫВОРОТКАХ БОЛЬНЫХ ОГС

Исследуемая группа		Уровень антигена, М \pm т; (УЕ/мл)		
		sFas	sHLA-DR	sCD38
ИГА (баллы)	1 - 3 (n=0)	—	—	—
	4 - 8 (n=11)	574 \pm 197	592 \pm 171	122 \pm 37
	9 - 12 (n=13)	437 \pm 188	598 \pm 249	225 \pm 69
ИФ (баллы)	0-1 (n=21)	564\pm148	619 \pm 161	156 \pm 38
	\geq 3 (n=3)	47\pm9	167 \pm 56	333 \pm 216
РНК ВГС	+ (n=15)	427 \pm 140	414 \pm 106	142 \pm 34
	- (n=15)	434 \pm 172	507 \pm 211	150 \pm 55
Генотип РНК ВГС	1a, 1b (n=9)	584 \pm 230	808 \pm 338	137 \pm 52
	2a, 3a (n=6)	128 \pm 37	277 \pm 55	50 \pm 18
Предполагаемый исход ОГС	хронизация (n=17)	414 \pm 130	545 \pm 187	167\pm48
	реконвалесценция (n=5)	300 \pm 126	265 \pm 203	9\pm5

Примечание: статистически достоверные различия между группами ($p<0,05$) выделены жирным шрифтом

печени и концентрацией sFas в сыворотках ($r=0,3$, $p<0,05$). У пациентов, в клетках печени которых были обнаружены указанные белки уровень sFas был в 1,8-2,5 раза выше по сравнению с пациентами, у которых не обнаруживалась экспрессия данных белков (для белка NS4B различия были статистически достоверны). Накопление белка NS4A в печени не сказывалось на концентрации sFas.

В сыворотках больных ОГС средний уровень sFas был выше, чем при ХГС и достоверно отличался от контроля (табл.1). Уровень sFas в сыворотках больных с генотипами 1a и 1b был значительно выше, чем в сыворотках пациентов с другими генотипами (табл. 3). Значимых отличий в уровнях sFas в зависимости от гистологической активности гепатита и наличия РНК ВГС выявлено не было. У трёх пациентов с начальными признаками формирующегося фиброза печени средняя концентрация sFas была на порядок ниже по сравнению с пациентами без выраженного фиброза ($p<0,05$). Степень накопления белков NS4A и NS5A в гепатоцитах прямо коррелировала с уровнем sFas ($r=0,3-0,4$), однако различия не достигали достоверных значений. Выявление остальных индивидуальных белков ВГС не оказывало влияния на концентрацию sFas. У пациентов с предполагаемой биохимической и вирусологической ремиссией концентрация sFas оказалась незначительно ниже по сравнению с больными с уже сформировавшимся ХГС (табл.3). Кроме того, обнаружена обратная корреляция между количеством CD4⁺ клеток периферической крови и уровнем sFas ($r=-0,52$; $p<0,05$).

Сывороточный уровень sHLA-DR у пациентов с ХГС и ОГС. Сывороточное содержание sHLA-DR у пациентов с ХГС значительно превышало уровень этого антигена у контрольной группы (табл.1). Концентрация sHLA-DR у пациентов с разной гистологической активностью ХГС, различной степенью фиброза и уровнем АЛТ существенно не отличалась (табл.2). У больных, в сыворотке которых была обнаружена РНК ВГС, уровень sHLA-DR был в 2 раза ниже, чем у пациентов без виремии. Значимых различий в уровнях sHLA-DR в зависимости от наличия белков ВГС в печени не обнаружено, однако выявление индивидуальных белков – NS4A и NS4B – ассоциировалось с более высоким уровнем sHLA-DR, для белка NS4B различия были статистически достоверны (табл. 2).

У пациентов с ОГС средний уровень sHLA-DR был наиболее высоким (табл.1), различия были достоверны в сравнении с нормой ($p<0,05$). У пациентов с признаками формирующегося фиброза печени средний уровень sHLA-DR был в 3,7 раза ниже, чем у пациентов с умеренными фиброзными изменениями (табл.3). Значительных различий в уровнях sHLA-DR в зависимости от гистологической активности ВГС, а также от наличия в сыворотках РНК

ВГС и уровня АЛТ выявлено не было. В сыворотках больных ОГС с генотипами ВГС 1a и 1b уровень sHLA-DR был почти в три раза выше, чем у пациентов с генотипами 2a и 3a. В группе предполагаемых реконвалесцентов среднее значение sHLA-DR было в 2 раза ниже, чем в группе больных сформировавшихся ХГС. Была обнаружена обратная корреляция между уровнем sHLA-DR и количеством CD4⁺ клеток ($r=-0,56$; $p<0,05$).

Сывороточный уровень sCD38 у пациентов с ХГС и ОГС. Содержание растворимой формы CD38 антигена у больных ХГС было достоверно выше, чем у здоровых доноров (табл.1). У пациентов с более выраженными морфологическими повреждениями уровень sCD38 был более чем в 2 раза выше, чем у пациентов с минимальной гистологической активностью (табл. 2). В зависимости от уровня АЛТ, наличия РНК, белков ВГС в печени и степени фибротических изменений в печени значимых различий в уровне sCD38 зафиксировано не было.

В сыворотках больных ОГС содержание sCD38 антигена также было достоверно повышено по сравнению с нормой (табл. 1). Концентрация sCD38 у пациентов с умеренной степенью гистологической активности была выше, чем у пациентов со слабо выраженным поражением печени (табл. 3). Зарегистрировано повышение содержания sCD38 у пациентов с признаками формирующегося фиброза печени. У пациентов с генотипами 1a и 1b содержание sCD38 было выше, чем в сыворотках больных с другими генотипами. При сравнении уровня sCD38 с наличием индивидуальных белков ВГС в печени была выявлена негативная корреляция средней степени ($r=-0,45$, $p<0,05$) с накоплением белка NS4A. Пациенты, у которых сформировался ХГС, характеризовались достоверно более высокой концентрацией sCD38 в начале заболевания в отличие от возможных реконвалесцентов (табл. 3).

Содержание Fas⁺ на мембранах лимфоцитов периферической крови. У половины пациентов с ХГС (54%) и с ОГС (51%) на поверхности ЛПК был обнаружен антиген Fas-зависимого апоптоза. Содержание Fas⁺ -ЛПК колебалось от 0 до 6%, составляя в среднем $1,7\pm0,3\%$ при ХГС и $1,5\pm0,3\%$ при ОГС, что достоверно отличалось от нормы: ни у одного человека в контрольной группе Fas⁺ лимфоциты не выявлены. У пациентов с ОГС обнаружена негативная корреляция между относительным количеством Fas⁺ ЛПК и степенью накопления белков NS3, NS4A и NS5A в печени ($r=-0,5$, $p<0,05$).

Обсуждение

При гепатите С Fas антиген экспрессируется главным образом на гепатоцитах, а FasL (лиганд) - на лимфоцитах. Растворимая форма Fas антигена (sFas)

продуцируется гепатоцитами, в меньшей степени - мононуклеарными клетками периферической крови [12]. В настоящем исследовании изучали уровень sFas в сыворотке больных ХГС и ОГС. Полученные данные о повышении уровня sFas у больных ХГС согласуются с результатами других авторов [9,19]. Ранее были получены данные, согласно которым уровень sFas у пациентов с ОГС незначительно отличался от нормы [3]. В нашем исследовании уровень sFas у больных ОГС был достоверно выше, чем у здоровых доноров. Вероятно, это расхождение возникло из-за разного количества пациентов и оценки уровня sFas в различные сроки от начала болезни. Более высокая концентрация sFas у больных острой формой заболевания, возможно, является следствием значительно более активной экспрессии белков ВГС в печени при ОГС по сравнению с ХГС (100% против 74%), на что указывают результаты настоящей работы и данные, полученные ранее [18]. Обнаруженные более низкие значения sFas у пациентов с циррозом печени, вероятно, являются следствием частичного замещения печеночной ткани на соединительную и, соответственно, снижением экспрессии Fas антигена на гепатоцитах. Ранее была показана корреляция между уровнем экспрессии Fas на гепатоцитах и концентрацией sFas [7], что косвенно подтверждает наши предположения. Подобная тенденция была обнаружена также у пациентов с ОГС. Данные о влиянии белков ВГС на апоптоз, полученные при изучении модельных клеточных систем противоречивы. Существуют мнения как об активирующем, так и об ингибирующем действии белков ВГС [11,15,17]. Данные о роли вирусных белков на экспрессию Fas антигена и sFas при естественном инфекционном процессе практически отсутствуют. Ранее было показано, что экспрессия Fas антигена увеличена на мембранах ВГС-инфицированных гепатоцитов [1]. Проведенные нами исследования впервые показали, что при ХГС существует прямая корреляция между степенью накопления белков ВГС (core, NS3, NS4B, NS5A) в клетках печени и образованием растворимой формы Fas антигена. При ОГС также наблюдалась аналогичная тенденция, но различия оказались статистически недостоверными. Вероятно, при ОГС определенный вклад в продукцию sFas могут вносить ЛПК, о чем свидетельствует обнаруженная корреляция между концентрацией sFas и относительным количеством ЛПК, несущих маркер Fas. У больных ХГС этой связи не выявлено. Полученные ранее результаты показали, что у пациентов с ХГС накопление вирусных белков в печени оказывает ингибирующее действие на экспрессию Fas антигена на лимфоцитах периферической крови [2]. В настоящей работе сходная закономерность обнаружена при ОГС. Можно предположить, что белки ВГС, стимулируя повышение концентрации

sFas, ингибируют элиминацию вирус-инфицированных клеток печени и ЛПК вследствие связывания FasL на активированных CTL циркулирующими молекулами sFas. Наряду с описанными ранее механизмами ингибирования апоптоза вирусными белками [11,17], этот путь также может участвовать в патогенезе гепатита С. Повышенная продукция sFas у пациентов с первым генотипом ВГС, может объяснять более тяжелое течение гепатита С за счет описанного выше механизма. Негативная корреляция между уровнем sFas и количеством CD4+ рецептора на лимфоцитах периферической крови может свидетельствовать о влиянии sFas на гибель CD4+ клеток путём апоптоза. Более высокий уровень sFas у пациентов с хронизацией процесса говорит о том, что значительное повышение уровня sFas является неблагоприятным признаком течения гепатита С. Этот показатель и может служить одним из факторов, который регулирует апоптотическую гибель клеток и способствует персистенции гепатита С.

Представляет интерес выяснить роль растворимой формы sHLA-DR при гепатите С. Молекулы HLA II класса (DR, DQ, DP) экспрессируются на поверхности клеток, участвующих в представлении антигена: дендритных, активированных макрофагов, В-лимфоцитов, на активированных эндотелиальных, эпителиальных и тучных клетках, Т-лимфоцитах. Повышение уровня sHLA-DR наблюдается при различных инфекционных и воспалительных заболеваниях и является маркером активации иммунной системы. Значительное повышение уровня sHLA-DR у пациентов с ХГС и с ОГС можно расценивать как показатель участия s-формы данного антигена в патогенезе гепатита С и активации иммунитета, более выраженной при остром течении. К такому же выводу пришли также авторы, обнаружившие у пациентов с ХГС повышенный сывороточный уровень sHLA-DR по сравнению со здоровыми донорами [8]. Аналогичные исследования при ОГС не проводились. В настоящей работе показано, что уровень sHLA-DR не отражает степень воспалительной активности в ткани печени (по результатам ИГА и АЛТ), что согласуется с другими исследованиями [8]. Аналогично с sFas, у больных с тяжелым фиброзом печени, уровень sHLA-DR был ниже, чем у пациентов со слабовыраженным фиброобразованием, что может свидетельствовать о снижении активности иммунной системы по мере прогрессирования болезни. Впервые показана прямая связь уровня sHLA-DR и накопления NS4B, что может свидетельствовать о более интенсивном иммунном ответе при усилении экспрессии данного белка. Роль белка NS4B в репликации ВГС точно не установлена. Известно, однако, что этот белок активно участвует в формировании репликативного комплекса [5]. Более того, предполагают, что

NS4В играет ключевую роль в вирус-индуцированной модификации клеточных мембран. Показано, что белок NS4 наиболее обильно накапливался в клетках печени пациентов с ХГС [18]. В данный момент однозначно оценить эти результаты сложно, так как до конца не ясны ни функция NS4В, ни функция sHLA-DR. Предполагают, что растворимые HLA-DR антигены могут связываться с комплексом TCR-CD4, конкурируя со своими мембраносвязанными гомологами. Возможно, sHLA-DR индуцируют апоптоз CD4⁺, модулируя, таким образом, иммунные реакции [16]. Обнаруженная нами обратная корреляция уровня sHLA-DR и количества CD4⁺ клеток у больных с ОГС подтверждает эту точку зрения. Интересно, что у больных ХГС такой зависимости выявлено не было, что является дополнительным доказательством в пользу различного функционирования иммунной системы при острой и хронической формах гепатита С. Повышенный уровень sHLA-DR у больных с ВГС генотипов 1а и 1b, вероятно, может отражать более высокую скорость репликации ВГС первого генотипа, как отмечено ранее [7]. Более высокое среднее значение sHLA-DR у больных с хронизацией процесса в сравнении с пациентами, перешедшими в стадию вероятной ремиссии, свидетельствует, что значительное повышение концентрации sHLA-DR неблагоприятным образом сказывается на исходе ОГС.

Мембранный CD38 антиген служит маркером активации Т-лимфоцитов, обладает ферментативной функцией и функцией молекулы адгезии. CD38 может участвовать в передаче сигнала активации в Т, В и NK клетках, индуцировать продукцию и секрецию цитокинов, регулировать передвижение лейкоцитов, в том числе, выход моноцитов в очаг воспаления [4,6]. Растворимая форма CD38 образуется путём шеддинга с мембраны активированных мононуклеарных клеток и может влиять на эти важнейшие процессы. Исследования в этой области находятся на начальном этапе и данные крайне скудны. Повышение уровня sCD38 в сыворотках больных, зарегистрированное как в настоящем исследовании, так и другими авторами [3], свидетельствует об активном участии данного антигена в патогенезе как острого, так и хронического гепатита С. Ранее при исследовании уровня sCD38 при других заболеваниях были получены данные о связи этого антигена с прогрессированием болезни. Выявленная в нашей работе тенденция к повышенному содержанию sCD38 в сыворотке крови лиц с более высокой активностью гепатита может свидетельствовать о сходной тенденции и при гепатите С. Зависимости концентрации sCD38 от виремии и гиперферментемии выявлено не было, как при ОГС, так и при ХГС. Аналогично с другими s-фор-

мами, повышение уровня sCD38 наблюдалось у пациентов с первым генотипом ВГС. При ОГС была зафиксирована достоверная негативная корреляция между уровнем sCD38 и накоплением белка NS4А в печени. Ранее нами была обнаружена более активная экспрессия белка NS4А при ОГС по сравнению с ХГС [2], что может отражать повышенный уровень репликации вируса в острую фазу заболевания. Ранее было установлено, что предполагаемая реконвалесценция ассоциирована с увеличением количества клеток печени, содержащих белок NS4А. Можно предположить, что для долговременного контроля за репликацией ВГС необходим высокий уровень экспрессии данных вирусных белков на ранних стадиях инфицирования, что способствует их более эффективной презентации иммунокомпетентным клеткам, активации Т-лимфоцитов по Th-1 типу и активной продукции гамма-интерферона и других провоспалительных цитокинов. Соответственно, менее высокий уровень sCD38 при увеличении экспрессии NS4А может служить признаком благоприятного течения инфекции. В пользу сделанного предположения свидетельствуют результаты настоящей работы о значительно меньшем уровне (20-кратном) sCD38 у возможных реконвалесцентов. Напротив, повышенный уровень sCD38 антигена можно рассматривать как показатель неблагоприятного прогноза. Одним из возможных механизмов, ответственных за прогрессирование заболевания, является взаимодействие избыточных молекул растворимой формы CD38 антигена с соответствующим лигандом, которое оказывает иммунорегуляторное действие, ограничивая иммунный ответ при вирусном гепатите С.

На основании полученных результатов можно заключить, что растворимые формы мембранных антигенов играют важную роль в патогенезе гепатита С, о чём свидетельствует повышение их содержания у больных острым и хроническим гепатитом С. Причины значительных различий в уровне растворимых форм исследованных антигенов у изученных больных неясны. Возможно, они связаны с индивидуальными особенностями иммунного статуса пациентов. Установлено, что концентрации sFas и sHLA-DR прямо коррелируют с накоплением белков ВГС в печени и с генотипом 1 ВГС, в целом, не связаны с активностью гепатита, но значительно снижаются при фиброзе ткани печени. Уровень sCD38 повышается в большей степени по сравнению с sFas и sHLA-DR, увеличивается при повышении активности гепатита и при инфицировании генотипами 1а и 1b, но снижается при активной экспрессии белков NS4А и NS3 в печени. Концентрация sCD38 в сыворотке крови пациентов с ОГС может иметь прогностическое значение при оценке исхода заболевания.

Список литературы

1. Масалова О.В., Абдулмеджидова А.Г., Моргунов К.В., Грищенко С.В., Шкурко Т.В., Лакина Е.И., Келли Е.И., Львов Д.К., Куш А.А. Измерение показателей гуморального и клеточного иммунитета у пациентов с хроническим гепатитом С различной тяжести // *Вопр. вирусологии.*-2003.-Т.48.-№3.-С.15-19.
2. Масалова О.В., Абдулмеджидова А.Г., Шкурко Т.В., Келли Е.И., Атанадзе С.Н., Завалишина Л.Е., 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. Птицына Ю.С. Сывороточный уровень растворимых форм мембранных антигенов клеток иммунной системы при вирусных гепатитах В, С и G // Автореферат диссертации на соискание учёной степени кандидата биологических наук. -2003,
4. Deaglio S., Zubiaur M., Gregorini A., Bottarel F., Ausiello C.M., Dianzani U., Sancho J., Malavasi F. Human CD38 and CD16 are functionally dependent and physically associated in natural killer cells // *Blood.*-2002.-Vol.99.-P.2490 – 2498.
5. Egger D., Wolk B., Gosert R., Bianchi L., Blum H.E., Moradpour D., Bienz K. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alteration including a candidate viral replication complex // *J. Virol.*-2002.-Vol.76.-P.5974-6984.
6. Ferrero E., Malavasi F. The metamorphosis of a molecule from soluble enzyme to the leukocyte receptor CD38 // *J. of Leuk. Biol.*-1999.-Vol.65.-P.151 – 161.
7. Hoofnagle J.H. Course and outcome of hepatitis C // *Hepatology.*-2002.-Vol.36.-P.21-29.
8. Hosoi K., Hagihara M., Kagawa T., Watanabe N., Matsuzaki S. The serum soluble HLA-DR antigens as a predictive marker the response to interferon-alpha treatment in patients with chronic hepatitis C // *Tokai J. Exp. Clin. Med.*-2000.-Vol.25.-P.117-124.
9. Iio S., Hayashi N., Mita E., Ueda K., Mochizuki K., Hiramatsu N., Kanto T., Sasaki Y., Kasahara A., Hori M. Serum levels of soluble Fas antigen in chronic hepatitis C patients // *J. Hepatology.*-1998.-Vol.29.-P.517-523.
10. Jodo S., Kobayashi S., Nakajima Y., Matsunaga T., Nakayama N., Ogura N., Kayagaki N., Okumura K., Koike T. Elevated serum levels of soluble Fas/APO-1 (CD95) in patients with hepatocellular carcinoma // *Clin Exp Immunol.*-1998.-Vol.112.-P.166-171.
11. Kountouras J., Zavos C., Chatzopoulos D. Apoptosis in hepatitis C // *J. Viral. Hepat.* -2003.-Vol.10.-P.335-342.
12. Krams S.M., Fox C.K., Beatty P.R., Cao S., Villanueva J.C., Esquivel C.O., Martinez O.M. Human hepatocytes produce an isoform of FAS that inhibits apoptosis // *Transplantation.*-1998.-Vol.65.-P.713-721.
13. Ohkawa K., Hiramatsu N., Mochizuki K., Mita E., Iio S., Yoshihara H., Kato M., Masuzawa M., Kasahara A., Sasaki Y., Hori M., Hayashi N. Significance of serum soluble Fas antigen level in chronic hepatitis C patients treated with interferon: Relationship to the therapeutic response // *J. of Gastroenterology and Hepatology.*-2001.-Vol.16.-P.1009-1014.
14. 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, 5, 5a and 6a // *J. of Clinical Microbiol.*-1997.-Vol.35.-№1.-P.201-207.
15. Realdon S., Gerotto M., Dal Pero F., Marin O., Granato A., Basso G., Muraca M., Alberti A. Proapoptotic effect of hepatitis C virus CORE protein in transiently transfected cells is enhanced by nuclear localization and is dependent on PKR activation // *J. Hepatology.*-2004.-Vol.40.-P.77-85.
16. Rebmann V., Ronin-Walknowska E., Sipak-Szmigiel O., Miklaszewicz A., Czajkowska E., Grosse-Wilde H. Soluble HLA-DR and soluble CD 95 ligand levels in pregnant women with antiphospholipid syndromes // *Tissue Antigens.*-2003.-Vol.62.-P.536-541.
17. Sacco R., Tsutsumi T., Suzuki R., Otsuka M., Aizaki H., Sakamoto S., Matsuda M., Seki N., Matsuura Y., Miyamura T., Suzuki T. Antiapoptotic regulation by hepatitis C virus core protein through up-regulation of inhibitor of caspase-activated DNase // *Virology.*-2003.-Vol.317.-P.24-35.
18. Sansonno D., Iacobelli A.R., Cornacchiulo V., Distasi M., Dammacco F. Immunohistochemical detection of hepatitis C virus-related proteins in liver tissue // *Clin. Exp. Rheumatol.*-1995.-Vol.13.-P.29-32.
19. Toyoda M., Kakizaki S., Horiguchi N., Sato K., Takayama H., Takagi H., Nagamine T., Mori M. Role of serum soluble Fas/ soluble Fas ligand and TNF-alpha response to interferon-alpha therapy in chronic hepatitis C // *Liver.*-2000.-Vol.20.-P.305-311.

поступила в редакцию 10.11.2004

принята к печати 15.12.2004