

РОЛЬ НАРУШЕНИЯ ПРОДУКЦИИ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ АЛЬФА МОНОНУКЛЕАРАМИ КРОВИ В МЕХАНИЗМАХ МОДУЛЯЦИИ АПОПТОЗА ПРИ ГЕПАТИТЕ С

Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Жукова О.Б.,
Радзивил Т.Т., Белобородова Е.В., Зима А.П.,
Наследникова И.О., Литвак М.М., Михеев С.Л.

ГОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет МЗ РФ», г.Томск, Россия

Резюме. Хроническое течение инфекции, вызванной вирусом гепатита С, сопровождается повышением содержания Fas-положительных лимфоцитов периферической крови. При культивировании стимулированных фитогемагглютинином мононуклеаров у больных хроническим гепатитом С на фоне снижения продукции фактора некроза опухоли альфа и увеличения синтеза растворимого рецептора данного цитокина отмечена ингибция апоптотической реакции лимфоцитов крови. Предполагается вируспецифическое воздействие на механизмы регуляции апоптоза клеток-мишеней.

Ключевые слова: вирус гепатита С, лимфоциты, апоптоз, фактор некроза опухоли альфа.

Novitsky V.V., Rjasantseva N.V., Zhukova O.B., Radzivil T.T., Beloborodova E.V., Zima A.P., Naslednikova I.O., Litvak M.M., Mikheev S.L.

TNF α PRODUCTION AND APOPTOSIS REGULATION IN VIRAL HEPATITIS TYPE C

Abstract. Chronical course of infection caused by hepatitis C virus is accompanied by increase Fas-positive lymphocytes of peripheral blood. Cultivation of agglutinin-stimulated mononuclear blood cells of patients with chronic hepatitis C revealed inhibition of apoptotic reactions of blood lymphocytes. This fact correlated with decrease in production of TNF α and accelerated synthesis of soluble receptor for this cytokine. We suggest a virus-specific influence on apoptosis regulation of target cells. (*Med. Immunol.*, 2005, vol.7, № 4, pp 417-420)

Введение

Инфекция, вызванная вирусом гепатита С (HCV), является актуальной проблемой медико-биологической науки. Это, прежде всего, связано с высокой степенью хронизации инфекционного процесса, опасностью развития цирротического и канцерогенного перерождения ткани печени. Как правило, хронический гепатит С (ХГС) протекает без клинической симптоматики в течение многих лет, а сопутствующее ему поражение печени варьирует от слабовыраженной до среднетяжелой формы гепати-

та или цирроза печени [2]. Несмотря на существенный прогресс в области изучения HCV, до настоящего времени отсутствуют четкие данные о механизме персистенции данного вируса.

По мнению большинства исследователей, основная роль в развитии и исходе заболевания принадлежит дисбалансу Т-клеточного звена иммунной системы. При формировании хронического воспаления вирусы для обеспечения собственного выживания должны избегать элиминирующего действия иммунной системы. Одним из таких механизмов является вирусиндуцированная модуляция апоптоза иммунокомпетентных клеток. Дефект апоптоза является одной из причин сохранения жизнеспособности инфицированных вирусом клеток [9, 12], что приводит к хронизации процесса и обуславливает недостаточную эффективность терапии.

Известно, что процесс программированной клеточной смерти может быть реализован через специ-

Адрес для переписки:

Жуковой Оксане Борисовне, 634050, г. Томск,
Московский тракт, д. 2. СибГМУ, кафедра
фундаментальных основ клинической медицины,
Тел.: (3822) 52-97-47, факс (3822) 53-33-09.
E-mail: fmd@mail2000.ru

фические рецепторы, в частности Fas-рецептор (CD95) [1]. Апоптоз могут индуцировать также некоторые цитокины, в первую очередь фактор некроза опухоли альфа (TNF α) [8]. В условиях вирусной инфекции TNF-индуцированная гибель клеток может иметь доминирующее значение ввиду антигенной стимуляции секреции данного цитокина, обладающего провоспалительным действием [10] и являющимся ключевым регулятором интенсивности иммунного ответа.

В связи с вышеизложенным, представляется актуальным определить роль TNF-опосредованного апоптоза лимфоцитов крови в патогенезе хронической HCV-инфекции.

Материалы и методы

В программу исследования были включены 45 пациентов (31 мужчина и 14 женщин в возрасте от 18 до 45 лет) с хроническим вирусным гепатитом С. Диагноз устанавливали на основании данных клинико-эпидемиологического, инструментального (сцинтиграфического, ультразвукового и морфологического исследования печени), серологического (методом иммуноферментного анализа определяли анти-HCV_{core} IgG и анти-HCV_{ns3,5}) и молекулярно-генетического (методом полимеразной цепной реакции выявляли РНК HCV) методов исследования. По результатам гистологического исследования биоптатов печени у 27 больных была установлена минимальная степень активности инфекционного процесса, у 18 – умеренная степень активности. Критериями исключения из исследования являлись алкогольная и наркотическая зависимость пациентов, а также наличие инфекционных и воспалительных процессов иной этиологии. Все пациенты были обследованы до начала проведения лечения. Контрольную группу составили 19 практически здоровых доноров с сопоставимыми характеристиками по полу и возрасту. Материалом исследования являлась венозная кровь обследованных лиц, стабилизированная гепарином (25 Ед/мл).

Содержание лимфоцитов, несущих маркер апоптотической предуготовленности CD95⁺-рецептор, оценивали иммуноцитохимическим методом [6] с использованием набора реагентов «Dako» (Дания). Учёт результатов проводили в световом микроскопе, подсчитывая процент положительно окрашенных клеток на 200 лимфоцитов.

Апоптоз лимфоцитов оценивали путем регистрации экспрессии на внешней поверхности клеточной мембраны фосфатидилсерина с помощью аннексина V, меченого FITC («Caltag», США) [13]. Выделенные на градиенте плотности Ficoll-Paque («Pharmacia», Швеция) мононуклеарные клетки (2·10⁶ клеток/мл) культивировали в полной культуральной среде, содержащей 90% RPMI-1640,

10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, 0,3 мг/мл L-глутамин, 10 мМ HEPES («Flow», Великобритания), 100 мкг/мл гентамицина, без митогена или с добавлением 10 мкг/мл фитогемагглютина (ФГА) (Difco «BD») в течение 24 ч при температуре 37° и 5% CO₂. После инкубации разделяли клетки и культуральную жидкость. Клетки суспендировали (10⁶ в 1мл) в буфере («Caltag», США), содержащем аннексин V-FITC, в течение 10 мин, затем подвергали проточной цитофлуориметрии на цитометре Epics XL («Beckman Coulter», Франция). Анализировали параметры зеленой (FITC - 530 нм) флуоресценции в гейте лимфоцитарных клеток.

Концентрацию TNF α и растворимого рецептора к нему (sTNF-55P) определяли в супернатантах культуры мононуклеарных лейкоцитов с помощью твердофазного иммуноферментного анализа в соответствии с инструкцией, прилагаемой производителем тест-систем («Procon», Россия и «Cytimmune», США соответственно). Оптическую плотность растворов регистрировали на микропланшетном фотометре Multiscan EX («ThermoLabSystems», Финляндия). Концентрацию TNF α и pTNF-55P рассчитывали по калибровочной кривой.

Оценку нормальности распределения полученных результатов по каждой величине проводили с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Для статистической обработки данных применяли t-критерий Стьюдента (в случае нормального распределения) и U-тест Манна-Уитни (при отклонении распределения от нормального). Различия считали достоверными при значении $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В механизмах Т-киллинга вирусинфицированных клеток ключевое значение имеет рецептор-опосредованная клеточная гибель [5]. В результате оценки уровня экспрессии Fas-рецептора лимфоцитарными клетками периферической крови было обнаружено увеличение содержания CD95⁺-лимфоцитов у пациентов с ХГ-С по сравнению со средними значениями аналогичного параметра у здоровых лиц (Табл.). Повышение количества Fas-положительных клеток у больных можно рассматривать, по нашему мнению, как адекватную реакцию организма, направленную на элиминацию инфектогена. 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 могут выступать Fas-L цитотоксических Т-лимфоцитов, NK-клеток, а также некоторые цитокины и антигены [7].

При исследовании реализации программируемой клеточной смерти с помощью аннексинового теста

Таблица. ПОКАЗАТЕЛИ АПОПТОЗА, ПРОДУКЦИИ TNF α И РАСТВОРИМОГО TNFR-1 В ИНТАКТНОЙ И ФГА-СТИМУЛИРОВАННОЙ КУЛЬТУРАХ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ С ($M \pm m$)

Характеристика групп обследованных	Количество CD95 ⁺ -лимфоцитов, %	Интактная культура лимфоцитов крови			ФГА-стимулированная культура лимфоцитов крови		
		Количество апоптотических клеток, %	Содержание TNF α , пг/мл	Содержание sTNFR-1, пг/мл	Количество апоптотических клеток, %	Содержание TNF α , пг/мл	Содержание sTNFR-1, пг/мл
Здоровые доноры	10,83 \pm 1,13	9,14 \pm 1,30	103,65 \pm 16,22	5,56 \pm 1,38	12,39 \pm 1,84	342,85 \pm 60,86	8,89 \pm 2,58
Больные хроническим гепатитом С минимальной степени активности	17,20 \pm 1,85*	9,11 \pm 0,94	36,70 \pm 3,37*	70,01 \pm 20,03*	6,56 \pm 0,80*	66,55 \pm 5,30*	22,50 \pm 5,61*
Больные хроническим гепатитом С умеренной степени активности	14,50 \pm 1,94*	11,56 \pm 2,35	39,48 \pm 2,92*	34,02 \pm 8,24* **	8,32 \pm 1,09*	96,70 \pm 11,49* **	26,07 \pm 7,08*

Примечание:

* - показаны достоверные различия по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров;

** — по сравнению с аналогичными параметрами у пациентов с хроническим гепатитом С минимальной степени активности.

было установлено, что уровень апоптоза в интактной культуре лимфоцитов у пациентов с ХГС соответствовал норме (Табл.). После действия Т-клеточного митогена ФГА в культуре стимулированных лимфоцитов при хронической HCV-инфекции было зарегистрировано достоверное снижение содержания апоптотических клеток (Табл.). Ингибция активационного апоптоза лимфоцитов у больных ХГС, несмотря на высокий уровень экспрессии Fas-рецептора, по-видимому, является результатом нарушения естественной реализации программируемой клеточной гибели.

Цитокины считаются наиболее многочисленной группой биологически активных веществ, влияние которых на процесс гибели клетки в последние годы интенсивно изучается и уже считается доказанным [4]. Известно, что TNF α подает «сигнал смерти» через рецептор TNFR-1 (CD120a или p55), инициирующий взаимодействие смертельных доменов рецептора с адаптерными протеинами FADD (FasR-associated death domain) и TRADD (TNFR-associated death domain) и каспазой-8 [11]. Результаты настоящего исследования свидетельствовали о снижении конституциональной и ФГА-индуцированной способности мононуклеарных лейкоцитов больных ХГС синтезировать TNF α . При этом минимальная степень активности HCV-ассоциированного гепатита характеризовалась более выраженным угнетением

ФГА-стимулированной продукции данного цитокина (табл.). Очевидно, что хроническая HCV-инфекция сопровождается нарушением регуляции рецептор-зависимого апоптоза иммунокомпетентных клеток, опосредованного TNF α .

Наряду с экспрессией мембранных рецепторов, активация лимфоцитов также сопровождается синтезом растворимых форм рецепторных молекул, являющихся мощными регуляторами активности цитокинов. Растворимый TNFR (sTNFR) продуцируется при альтернативном сплайсинге, утрачивая интрацеллюлярные и трансмембранные области. Этот растворимый белок конкурирует с мембранно-локализованным рецептором в связывании лиганда и может ингибировать TNF-опосредованный апоптоз [10]. В связи с этим нами была проведена оценка содержания sTNFR-1 с молекулярной массой 55 kDa в культуральных жидкостях мононуклеаров периферической крови. Анализ полученных данных показал, что ХГС сопровождается повышенной конституциональной и ФГА-стимулированной продукцией sTNFR-1 *in vitro*. Достоверно более высокий уровень базальной секреции данного рецептора был выявлен у больных ХГС с минимальной степенью активности инфекционного процесса по сравнению с соответствующим значением у пациентов с умеренной степенью его активности (Табл.).

Дисбаланс между уровнями экспрессии мембранной и растворимой форм рецептора может быть обусловлен воздействием вирусных факторов, направленных на супрессирование программируемой гибели зараженной клетки, как защитной реакции макроорганизма. Многие вирусы, влияя на гены-промоторы, способны индуцировать синтез мутантных (растворимых) форм рецепторов смерти. Ранее было показано достоверное увеличение содержания растворимой формы Fas-рецептора (sFas) в сыворотке крови больных гепатитами В и С [3].

Таким образом, хроническое течение гепатита С сопровождается дизрегуляторными изменениями продукции ключевого иммунорегуляторного цитокина – TNF α и экспрессии его рецептора, что может обуславливать вирусиндуцированное нарушение реализации рецептор-зависимого апоптоза иммунокомпетентных клеток крови и способствовать длительной персистенции возбудителя.

Благодарности

Исследование выполнено при финансовой поддержке Совета по грантам при Президенте Российской Федерации для поддержки ведущих научных школ Российской Федерации № НШ-1051.2003.4 и гранта Администрации Томской области (договор №306 от 23.09.2004 г.).

Список литературы

1. Барышников А.Ю., Шишкин А.В. Иммунологические проблемы апоптоза. - М.: Эриториал УРПС, 2002. - 320 с.
2. Ивашкин В.Т., Маммаев С.Н, Буеверов А.О., Шульпекова Ю.О. Взаимодействие вирусов гепатита В и С с клетками иммунной системы макроорганизма // Клиническая лабораторная диагностика. - 2001. - №7. - С.45-48.
3. Митрикова Л.Ц. Растворимый Fas-антиген в сыворотке крови больных острыми гепатитами В //

Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2003. - №3. - С.34-36.

4. Потапнев М.П. Апоптоз клеток иммунной системы и его регуляция цитокинами // Иммунология. - 2002. - №4. - С.237-243.

5. Сепиашвили Р.И., Шубич М.Г., Колесникова Н.В. Апоптоз в иммунологических процессах // Аллергология и иммунология. - 2000. - №1. - С.15-23.

6. Тотолян А.А., Балдуева 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 человека // Клиническая лабораторная диагностика. - 2002. - №1. - С. 44-50.

7. Фильченков А.А., Степанов Ю.М., Липкин В.М., Кушлинский Н.Е. Участие системы Fas/Fas-лиганд в регуляции гомеостаза и функционировании клеток иммунной системы // Аллергология и иммунология. - 2002. - №1. - С.24-35.

8. Ярилин А.А. Апоптоз: природа феномена и его роль в норме и при патологии // Актуальные проблемы патофизиологии / Под ред. Б.Б.Мороза. - М.: Медицина, 2001. - С.13-56.

9. Hay S., Kannourakis G. A time to kill: viral manipulation of the cell death program // J. of General Virology. - 2002. - Vol.83. - P. 1547-1564.

10. Herbein G., O'brein W.A. Tumor necrosis factor (TNF)- α and TNF receptors in viral pathogenesis // Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. - 2000. - Vol. 223. - P.241-257.

11. Hsu H, Xiong J, Goeddel D.V. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation // Cell. - 1995. - Vol.81. - P.495-504.

12. Kountouras J., Zavos C., Chatzopoulos D. Apoptosis in Hepatitis C // J. Viral. Hepat. - 2003. - Vol. 10. - P.335-342.

13. Van Engeland M., Nieland L.J.W., Ramaekers F.C. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure // Cytometry. - 1998. - Vol.31. - P. 1-9.

поступила в редакцию 19.01.2005
принята к печати 10.02.2005