

УДК 616.6-006.6

ОСОБЕННОСТИ ФНО-ИНДУЦИРОВАННОГО АПОПТОЗА У БОЛЬНЫХ С ПАРЕНТЕРАЛЬНЫМИ ГЕПАТИТАМИ И ГЕРПЕТИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Хараева З.Ф., Иванова М.Р., Шевченко А.А.

ГОУ ВПО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х.М. Бербекова», Нальчик,
e-mail: irafe@yandex.ru

Проведено изучение показателей ФНО-индуцированного апоптоза в сыворотке крови пациентов с хроническими вирусными гепатитами и герпетической инфекцией. ФНО- α зависимые пути противовирусной защиты активированы во всех исследуемых группах больных с хроническими вирусными инфекциями, при этом уровень ФНО- α является показателем активности воспаления и коррелирует с тяжестью течения инфекционного процесса, что позволяет использовать его в качестве диагностического критерия при скрытых инфекциях. Уровень TRAIL снижен при ВПГ-1,2, ХВГВ и ХВГС и не изменен при цитомегаловирусной инфекции.

Ключевые слова: ФНО- α , апоптоз, вирусные гепатиты, герпетические инфекции

FEATURES OF TNF- α -INDUCED APOPTOSIS IN PATIENTS WITH PARENTERAL HEPATITIS AND HERPES INFECTION

Kharaeva Z.F., Ivanova M.R., Shevchenko A.A.

GOU VPO «Kabardino-Balkarian State University Berbekov's named», Nalchik, e-mail: irafe@yandex.ru

The study of the TNF- α -induced apoptosis in the blood serum of patients with chronic virus hepatitis and herpes infection was done. TNF- α dependent path of antiviral protection activated in all studied groups of patients with chronic virus infections, the level of TNF- α is an indicator of inflammation activity and correlates with the severity of the infection process, that allows to use it as a diagnostic criterion for the hidden infections. The TRAIL reduced by HSV-1,2 chronic virus hepatitis and not changed by cytomegalovirus infection.

Keywords: TNF- α , apoptosis, virus hepatitis, herpes infection

Фактор некроза опухоли (ФНО α) – один из основных цитокинов, способных оказывать прямое повреждающее действие на клетки-мишени и лизировать клетки, инфицированные вирусом [1, 4, 6]. ФНО α является необходимым и в то же время достаточным индуктором местных и системных воспалительных реакций [4, 5, 6]. Наиболее хорошо изучена последовательность событий, приводящих клетки к апоптозу в результате взаимодействия белков из семейства фактора некроза опухоли со специфическими рецепторами [5, 7, 8, 11, 13]. При хронических вирусных инфекциях апоптоз может являться как защитным, так и повреждающим фактором [2]. Исследование активности апоптоза и изучение путей регуляции программируемой смерти клетки должны служить основой для подбора патогенетической терапии.

Целью исследования было изучение показателей ФНО-индуцированного апоптоза в сыворотке крови пациентов с хроническими вирусными гепатитами и герпетической инфекцией.

Материалы и методы исследования

Под наблюдением находились пациенты с вирусными парентеральными гепатитами и герпетической инфекцией. 113 больных хроническими вирусными гепатитами в возрасте от 18 до 76 лет проходили стационарное лечение в ЦПБ СПИД и ИЗ МЗ КБР. Преобладали лица мужского пола (88%). Из них – 76 больных с хроническим вирусным гепатитом В (ХВГВ) и 37 пациентов с хроническим вирусным гепатитом С

(ХВГС). При хроническом гепатите В длительность заболевания к моменту поступления составляла 7,8 года, при хроническом гепатите С – 11,2 года. Из числа всех обследованных 48% пациентов были парентеральными потребителями наркотиков. У 75% пациентов отсутствовали указания на перенесенный острый гепатит в анамнезе. Все пациенты распределялись по уровню клинико-биохимической активности: 22 больных с минимальной активностью (0–1N АлТ), 57 – с умеренной степенью активности (2–4N АлТ) и 34 – с высокой степенью активности (> 4N АлТ). Больные получали симптоматическое лечение без включения противовирусных препаратов. Диагноз был выставлен на основании клинико-эпидемиологической и молекулярно-биохимической оценки. Всем пациентам проводилось определение маркеров вирусных гепатитов методом ИФА (тест-системы «Вектор-Бест», Россия), ДНК-ВГВ, РНК-ВГС, РНК-ВГД методом полимеразной цепной реакции с использованием тест-систем «АмплиСенс» (ЦНИИЭ, Москва), генотипирование вирусов проводилось методом полиморфизма длин рестриционных фрагментов.

С хронической рецидивирующей генитальной герпесвирусной инфекцией (ВПГ-1,2) наблюдались 70 пациентов (48 женщин, 22 мужчин). Критериями выбора пациентов для обследования являлись:

- 1) наличие различной частоты рецидивов генитального герпеса – от 2 до 12 и более раз в год;
- 2) продолжительность генитальной герпес-вирусной инфекции более одного года;
- 3) обследование в фазе обострения процесса или в периоде продромы (не более 48 часов от момента появления высыпаний);
- 4) отсутствие приема иммуномодулирующей терапии в течение последних 3 месяцев.

Диагноз ВПГ-1,2 был верифицирован на основании клинической картины и данных лабораторного

обследования, согласно рекомендациям 5-го международного форума (ИМФ-1997) по диагностике генитального герпеса. По тяжести клинического течения ВПГ-1,2 инфекции легкой форма (1–2 рецидива в год) диагностирована у 10 пациентов (22,5%) исследуемой группы, средняя (3–5 рецидива в год) – у 40 (70,83%), тяжелая (6–12 и более рецидивов в год) – у 20 (6,67%).

Также наблюдались 40 человек с диагностированной цитомегаловирусной (ЦМВИ) инфекцией, из них 29 женщин и 11 мужчин. ЦМВИ в основном была выявлена при клинико-лабораторном обследовании при выявлении причин бесплодия (25%) и привычного невынашивания беременности (20%), 5% пациентов имели жалобы на частые рецидивирующие респираторные инфекции (от 4 до 8 раз в год).

Оценку содержания сывороточного растворимого Fas-рецептора (sFas) проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием стандартной тест-системы human sAPO-1/Fas ELISA BMS245 (Bender MedSystems). Определение уровня TRAIL в сыворотке крови также проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием стандартной тест-системы human TRAIL ELISA (Biosource). Исследование уровня фактора некроза опухоли α (ФНО α) в сыворотке крови пациентов проводили с помощью тест-системы «Протеиновый контур» (Санкт-Петербург, Россия). Все пробы исследовались в динамике (в течение 30 дней): с момента поступления в стационар (или рецидива инфекции) и спустя месяц после проводимой комплексной терапии (с подключением ациклических нуклеозидов и иммуномодуляторов – препаратов интерферонов и индукторов интерферонов). Результаты

проведенных исследований обработаны с помощью компьютерных программ «Microsoft Excel» и «Statistica» с применением метода вариационной статистики, регрессивного и корреляционного анализа.

Результаты исследования и их обсуждение

При изучении ФНО-индуцированного апоптоза у больных вирусным гепатитом В были выявлены следующие закономерности. При поступлении в стационар у больных с гепатитом В отмечалось существенное повышение концентрации ФНО α и sFas ($p > 0,01$) (таб. 1). На 30-е сутки после поступления на фоне комплексной терапии показатели sFas достоверно снижались, но не приходили в норму. Уровень провоспалительного иммуноцитокина ФНО α , несмотря на проведенную комплексную терапию, на 30 сутки выше, чем при поступлении в стационар ($p < 0,01$). У больных хроническим вирусным гепатитом С отмечались односторонние с пациентами с ХВГВ, но более выраженные изменения концентрации sFas. В отличие от полученных повышенных показателей sFas и ФНО в сыворотке крови у больных хроническими вирусными гепатитами, концентрация TRAIL во всех периодах обследования в при ХВГВ и ХВГС была достоверно снижена ($p < 0,01$) (таб. 1).

Таблица 1

Показатели содержания ФНО- α , sFas и TRAIL в сыворотке крови у больных хроническими вирусными гепатитами, (пг/мл)

Группа пациентов		Показатель	При поступлении в стационар	Через 30 суток
Вирусные гепатиты	ХВГВ	ФНО α ($n = 30; 17$)	$55,0 \pm 1,6^{1,3}$	$64,0 \pm 2,1^{1,2,3}$
		sFas ($n = 46; 22$)	$1739,0 \pm 64,7^{1,3}$	$1652,0 \pm 123,5^{1,3}$
		TRAIL ($n = 29; 18$)	$119 \pm 13,0^{1,3}$	$107 \pm 16,2^1$
	ХВГС	ФНО α ($n = 20; 14$)	$41,0 \pm 3,3^1$	$35,0 \pm 1,2^1$
		sFas ($n = 20; 15$)	$2366,0 \pm 85,7^1$	$2317 \pm 74,6^1$
		TRAIL ($n = 15; 11$)	$55 \pm 19,6^1$	$78 \pm 22,4^1$
Здоровые доноры ($n = 15$)		ФНО α	$18,0 \pm 2,0$	-
		sFas	$1250,5 \pm 135,5$	-
		TRAIL	$199 \pm 5,3$	-

Примечания:

- ¹ – достоверность различий по отношению к показателям доноров, $p < 0,01$;
- ² – достоверность различий по отношению к показателям предыдущего периода, $p < 0,01$,
- ³ – достоверность различий к показателям у больных ХВГС, $p < 0,01$.

При исследовании пациентов с ВПГ 1,2 – инфекцией отмечалось повышение уровня sFas в момент рецидива при легкой степени на 42%, средней степени тяжести на 35%, тяжелой степени на 26% (таб. 2). Через 30 суток, на фоне проводимой терапии уровень sFas значительно снизился, но превышал уровень контрольной группы ($p < 0,01$). При ЦМВИ в момент рецидива значение sFas на 75% выше уровня контрольной группы и сохраняет свой уровень повышенным на 15% через 30 суток с момента лечения ($p < 0,01$).

Таким образом, при различных типах герпетической инфекции активируется

способность организма элиминировать вирус. В то же время способность к запуску апоптоза зараженных клеток при тяжелых формах ВПГ-1,2 инфекции меньше, чем при более легких формах (средней и легкой степени тяжести). Сывороточные концентрации TRAIL оказались близки к нормальным значениям лишь в группе пациентов с ВПГ-1,2 легкой степенью тяжести и ЦМВИ. Обращает на себя внимание выявленная тенденция к снижению TRAIL в сыворотке крови в случаях с более тяжелым течением инфекционного процесса (см. таб. 2).

Определение роли участия растворимых форм мембранных молекул иммунных кле-

ток и активации апоптоза в патогенетическом механизме развития хронических вирусных инфекций с высоким онкогенным риском является одним из этапов изучения патогенетической роли апоптоза при интегративной вирусной инфекции. Повышение концентрации ФНО- α в сыворотке крови при вирусных гепатитах было обнаружено во многих исследованиях, как маркера некробиотических процессов, развивающихся в ткани печени [3]. Наиболее высокие показатели получены у больных хроническим вирусным гепатитом В, что, по-видимому, отражает преобладание некротических процессов над апоптотическими механизмами у этой группы пациентов, о чем косвенно свидетельствуют более низкие показатели sFas и высокие

TRAIL у больных этой группы. Снижение интенсивности апоптоза, возможно, косвенно подтверждает и более высокий онкогенный потенциал этого вируса. С другой стороны, более высокое содержание sFas и низкое – TRAIL в сыворотке крови у больных хроническим вирусным гепатитом С может свидетельствовать об интенсивности образования домена смерти DR-5, который активно связывает TRAIL, в связи с чем снижается его концентрация в сыворотке крови. В процессе апоптоза происходит гибель и этих клеток, в связи с чем может повышаться концентрация Fas-лиганда, что лишний раз обосновывает необходимость исследования маркеров апоптоза в различных биологических объектах, помимо сыворотки крови.

Таблица 2

Фактор некроза опухоли- α и растворимый лиганд sFas в сыворотке крови пациентов с герпетической инфекцией, пг\мл

Группа пациентов	sFas		ФНО- α		TRAIL		
	В момент рецидива	Через 30 сут.	В момент рецидива	Через 30 сут.	В момент рецидива	Через 30 сут.	
ВПГ-1,2 типа	Легкая степень	1780,0 \pm 120,0 ¹	1380,0 \pm 110,0	38,0 \pm 2,0 ¹	24,0 \pm 2,0	189,5 \pm 13,0	157,5 \pm 16,0 ^{1,2}
	Средняя степень	1880,0 \pm 110,0 ¹	1780,0 \pm 100,0 ¹	42,0 \pm 4,0 ¹	30,0 \pm 3,0 ¹	154,5 \pm 13,0 ¹	105,0 \pm 9,2 ^{1,2}
	Тяжелая степень	1820,0 \pm 130,0 ¹	1680,0 \pm 140,0 ¹	45,0 \pm 5,0 ¹	32,0 \pm 3,0 ¹	129,0 \pm 13,0 ¹	100,0 \pm 6,0 ^{1,2}
ЦМВИ	2150,0 \pm 170,0 ¹	1450,5 \pm 115,5 ¹	25,0 \pm 2,0	21,0 \pm 1,0	179,5 \pm 10,0	180,5 \pm 15,0	
Доноры	1250,5 \pm 135,5	-	18,0 \pm 2,0	-	199,0 \pm 5,3		

Примечание. ¹ Достоверность различий ($p < 0,01$) по сравнению с контрольной группой.

При герпетической инфекции наиболее выраженные изменения выявлены при тяжелых формах течения ВПГ-1,2 типа. Причинами тяжелого течения инфекционного процесса могут служить сниженный иммунитет и угнетение защитных противовирусных апоптозозависимых процессов. В крови отмечено повышение количества sFas. Полученные результаты можно объяснить лимфотропным действием вируса, так как продуктивная вирусная инфекция приводит к гибели лимфоцитов, что может являться также одной из причин повышения sFas [1]. Таким образом, наиболее выраженные изменения апоптоза обнаружены при хронических гепатитах с парентеральным механизмом инфицирования и герпетической инфекцией средней и тяжелой степеней тяжести. ФНО- α зависимые пути противовирусной защиты активированы во всех исследуемых группах больных с хроническими вирусными инфекциями, при этом уровень ФНО- α является показателем активности воспаления и коррелирует с тяжестью течения инфекционного процесса, что позволяет использовать его в качестве диагностического критерия при скрытых инфекциях.

Работа поддержана федеральной целевой программой «Научные и научно-педаго-

гические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы», (НК-193П)

Список литературы

1. Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В. Иммунологические проблемы апоптоза. – М.: Наука, 2002. – 327 с.
2. Белушкина Н.Н. Особенности регуляции апоптоза при опухолевых, вирусных и аутоиммунных заболеваниях: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – М., 2005. – 32 с.
3. Котович М.М. Роль этиотропной и патогенетической терапии в клинической и морфологической эволюции хронических гепатитов у детей: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – М., 2003. – 27 с.
4. Новиков В.В., Барышников А.Ю., Караулов А.В. Растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы // Иммунология. – 2007. – № 4. – С. 249–253.
5. Bodmer J. TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8 // Nature Cell Biology. – 2000. – Vol. 2. – P. 241–243.
6. Guo Y., Srinivasula S.M., Druilhe A. et al. Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria // J. Biol. Chem. – 2002. – Vol. 277. – P. 13430–13437.
7. Holler N., Tardivel A., Kovacsics-Bankowski M. et al. Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex // Mol. Cell Biol. – 2003. – Vol. 23, № 4. – P. 1428–1440.
8. Huang X., Lin T., Gu J. et al. Combined TRAIL and Bax gene therapy prolonged survival in mice with ovarian cancer xenograft // Gene Ther. – 2002. – Vol. 9(20). – P. 1379–1386.

Рецензенты:

Михальчик Е.В., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории биофизических методов исследования НИИ Физико-химической медицины, г. Москва;

Иванов А.Б., д.б.н., профессор, зав. кафедрой нормальной и патологической физиологии, «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х. М. Бербекова», г. Нальчик.