

На правах рукописи

НАСЛЕДНИКОВА
Ирина Олеговна

**ИММУНОПАТОГЕНЕЗ ПЕРСИСТЕНТНЫХ
ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ**

14.00.16 – патологическая физиология

03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Томск-2005

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Научные консультанты:

доктор медицинских наук, профессор,
Заслуженный деятель науки РФ,
академик РАМН

Новицкий Вячеслав Викторович

доктор медицинских наук

Рязанцева Наталья Владимировна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор

Федорова Татьяна Сергеевна

доктор медицинских наук, профессор,
член-корреспондент РАМН

Лишманов Юрий Борисович

доктор медицинских наук, профессор,
академик РАМН

Шкурупий Вячеслав Алексеевич

Ведущая организация:

ГУ НИИ полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН, г. Москва.

Защита состоится «___» _____ 2005 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при Сибирском государственном медицинском университете (634050, Томск, Московский тракт, 2)

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Сибирского государственного медицинского университета (634050, Томск, пр. Ленина, 107)

Автореферат разослан «___» _____ 2005 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Суханова Г.А.

Автор выражает глубокую признательность заведующему кафедрой инфекционных болезней ГОУ ВПО «СибГМУ Росздрава», д.м.н., профессору А.В. Лепехину, заведующей кафедрой терапии ФУВ и ППС ГОУ ВПО «СибГМУ Росздрава», д.м.н., профессору Э.И. Белобородовой, заведующему ЦНИЛ ГОУ ВПО «СибГМУ Росздрава», д.м.н., профессору А.Н. Байкову, главному врачу ГУЗ «Томский областной центр профилактики и борьбы со СПИД и другими инфекционными заболеваниями Департамента здравоохранения Администрации Томской области» А.С. Чернову, руководителю диагностической лаборатории ГУЗ «Томский областной центр профилактики и борьбы со СПИД и другими инфекционными заболеваниями Департамента здравоохранения Администрации Томской области», к.м.н. В.И. Решетникову, ассистенту кафедры госпитальной терапии ГОУ ВПО «СибГМУ Росздрава», к.м.н. Е.В. Белобородовой, врачу-гепатологу отделения гастроэнтерологии Томской областной клинической больницы Л.Е. Дунаевой, заведующей отделом гематологии ЦНИЛ ГОУ ВПО «СибГМУ Росздрава», с.н.с., к.м.н. Н.М. Шевцовой, с.н.с. ФГУП НПО «Вирион», к.т.н. А.А. Миллеру за проявленный интерес к работе, ценные теоретические и методические советы, а также за помощь в организации проведения исследований.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Клинический облик многих вирусных инфекций связан с длительным присутствием возбудителя в организме. Феномен вирусной персистенции является одной из наиболее актуальных проблем современной медицины [Dillon A.P., Dusheiko G.M., 1995; Ahmed R. et. al, 1996; Porh A., 1997; Маянский А.Н., 1999; Cerny A., Chisari F., 1999; Антонов П.В., Цинзерлинг В.А., 2001; Апросина З.Г., Серов В.В., 2001; Жукова О.Б. и соавт., 2003; Новицкий В.В. и соавт., 2003; Рязанцева Н.В. и соавт., 2003]. В ее основе лежит способность вирусов закрепляться в клеточных популяциях, используя для этого разнообразные приемы – от «замораживания» собственных генов в хромосомах клетки-хозяина до агрессивного вмешательства в систему индукторов и эффекторов иммунитета [Маянский А.Н. и соавт., 1998; Антонов П.В., Цинзерлинг В.А., 2001; Непомнящих Г.И. и соавт., 2001; Львов Д.К., 2004].

Понятие «персистенция» включает различные формы длительного взаимодействия вируса с клеткой или организмом. В настоящее время принято различать: латентное персистирование – длительное бессимптомное пребывание возбудителя в организме или в клеточной системе с затрудненным выделением вируса; хроническое персистирование возбудителя, сопровождающееся периодической манифестацией процесса; и собственно персистенцию – длительное пребывание возбудителя в организме или клеточной системе с регулярным выделением вируса [Ахмадулина Н. Б., 1990; Алгол В.И., 1997; Борисов Л.Б., 2001; Покровский В.И. и соавт., 2003]. Сегодня посредством молекулярно-генетических методов исследования вполне убедительно доказана способность большинства вирусов к длительной, нередко пожизненной персистенции в инфицированном организме [Маянский А.Н., 1999; Королюк А.М., Сбойчаков В.Б., 2002; Непомнящих Г.И., Толоконская Н.П., 2002].

Многие вирусы, в частности вирусы гепатита В и С, иммунодефицита человека, простого герпеса, Эпштейна-Барр, клещевого энцефалита, цитомегалии, гриппа, полиомиелита, ретровирусы, аденовирусы и др., обладающие способностью длительно сохраняться в макроорганизме, могут поражать различные органы и системы, вызывая хроническую форму инфекции [Алгол В.И., 1997; Амосов А.Д., 2002; Непомнящих Г.И. и соавт., 2003; Серов В.В. и соавт., 2003; Львов Д.К., 2004]. Исследования последних лет показали, что, несмотря на достигнутые успехи в изучении молекулярно-биологических основ длительной вирусной персистенции, на сегодня не существует единой концепции патогенеза данной инфекционной патологии [Хайтов Р.М., Пинегин Б.В., 2000, 2001; Антонов П.В., Цинзерлинг В.А., 2001; Игнатова Т.М., Серов В.В., 2001; Arbutnot P., Kew M., 2001].

Следует отметить, что факторы, позволяющие вирусам сохраняться в организме человека, и условия, способствующие развитию хронических форм бо-

лезней, также остаются недостаточно изученными [Ploegh H.L., 1998; Ивашкин В.Т. и соавт., 2000, 2001; Игнатова Т.М., Серов В.В., 2001; Новицкий В.В., Уразова О.И., 2004]. Несмотря на индукцию вирусспецифического иммунного ответа, у большинства инфицированных лиц это не приводит к элиминации возбудителя инфекции [Маянский А.Н., 1999; Долгих В.Т., 2000; Серов В.В., Мухин Н.А., 2000; Хаитов Р.М., 2001; Arbutnot P., Kew M., 2001; Mazzaro C. et al., 2001; Непомнящих Г.И., Толоконская Н.П., 2002].

В середине прошлого столетия была сформулирована концепция, согласно которой подверженность той или иной болезни обусловлена сочетанием в генотипе индивида определенных аллельных вариантов генов, формирующих неблагоприятный наследственный фон, реализующийся при взаимодействии с факторами среды патологического фенотипа [Falconer D. S., 1965]. В соответствии с этим одни индивиды обладают относительной резистентностью к инфицированию вирусами, тогда как другие – подвержены развитию болезни при контакте с ее возбудителем. Переход вирусного инфекционного заболевания в хроническую форму может быть вызван нарушением генетического контроля за иммунным ответом. На сегодняшний день картирован ряд генов, непосредственно определяющих высокую или низкую чувствительность организма к инфекционным агентам [Samuel C.E., 1991, 2001; Stark G.R. et al., 1998; Lio D. et al., 2003; Mueller T. et al., 2004; Ollier W.E., 2004].

По современным представлениям, генетическая детерминированность иммунного ответа макроорганизма предопределяет жизненный цикл инфекционного агента. Однако при этом нельзя не учитывать свойства вируса, действие которого направлено на модулирование защитных сил организма и «ускользание» от иммунного надзора [Петров Р.В. и соавт., 1981; Хаитов Р.М., Алексеев Л.П., 1998; Ploegh H.L., 1998; Mondelli M.U., Silini E., 1999; Петров Р.В., Хаитов Р.М., 2000; Игнатова Т.М., Серов В.В., 2001].

Несмотря на получение новых данных фундаментального характера о механизмах персистенции вирусов, неразрешенным остаётся вопрос: вирусоносительство – вариант «мирного сосуществования» возбудителя инфекции и макроорганизма либо скрытый патологический процесс? Следует признать, что единого мнения на этот счет нет. В любом случае внедрение вируса в клетку макроорганизма – прежде всего «сигнал опасности», активизирующий врожденные и адаптивные механизмы системы иммунитета, направленные на элиминацию инфектогена. При этом основной детерминантой патогенеза хронических персистентных вирусных инфекций, на наш взгляд, следует считать клеточно-опосредованный иммунитет.

Цель исследования: установить общие закономерности и особенности иммунопатогенеза персистентных вирусных инфекций разного генеза.

Задачи исследования:

1. Определить направленность клеточной дифференцировки и пролифератив-

ный потенциал лимфоцитов периферической крови у пациентов с персистентными вирусными инфекциями, вызванными вирусами гепатита В и С, клещевого энцефалита и простого герпеса.

2. Оценить роль дисбаланса иммунорегуляторных цитокинов в механизмах нарушения межклеточной кооперации иммунных клеток при персистентных вирусных инфекциях.
3. Дать комплексную оценку структурно-метаболических и функциональных свойств лимфоцитов периферической крови при длительной персистенции вирусов гепатита В и С, клещевого энцефалита, простого герпеса.
4. Выявить иммуногенетические критерии предрасположенности к хронизации вирусных гепатитов и резистентности к прогрессированию заболевания путем определения характера распределения аллельных вариантов промоторных регионов генов цитокинов IL2, IL4, IL10 среди лиц европеоидной популяции, а также степени их ассоциированности с уровнем продукции соответствующих цитокинов.
5. Определить клинко-иммунологические параллели при длительной персистенции вирусов гепатита В и С, клещевого энцефалита, простого герпеса.

Научная новизна. Впервые с привлечением комплекса современных гематологических, иммунологических и молекулярно-генетических методов исследования освещены пути реализации иммунопатогенеза персистентных вирусных инфекций. Установлено, что изменения реагирования системы иммунитета при длительной персистенции вирусов гепатита В и С, клещевого энцефалита, простого герпеса являются однонаправленными.

Показано, что у пациентов с хроническим вирусным гепатитом В, С и В+С, хроническим носительством антигена вируса клещевого энцефалита и хронической герпетической инфекцией развивается дизрегуляция антигенспецифического звена системы иммунитета, проявляющаяся нарушением процессов дифференцировки лимфоцитов (уменьшение количества CD3⁺, CD4⁺-клеток и снижение иммунорегуляторного индекса (CD4⁺/CD8⁺)), изменением пролиферативной активности и апоптотического потенциала лимфоцитарных клеток периферической крови.

Установлено, что персистентные вирусные инфекции сопровождается выраженный дисбаланс продукции иммунорегуляторных цитокинов. У пациентов с хроническим вирусным гепатитом В, С, В+С, хроническим носительством антигена вируса клещевого энцефалита и хронической герпетической инфекцией отмечается значительное повышение продукции IFN- γ мононуклеарными лейкоцитами периферической крови. При персистентных вирусных инфекциях увеличивается секреция IL-4, IL-6 и снижается продукция TNF- α , IL-2, IL-12 мононуклеарами крови. У больных хроническим вирусным гепатитом В, С и В+С продукция IL-10 мононуклеарными лейкоцитами увеличена.

Получены новые данные, указывающие на факт дезорганизации поверхностной архитектоники лимфоцитов периферической крови. Длительная персистенция вирусов гепатита В и С, а также антигенемия вируса клещевого энцефалита сопровождается структурной модификацией липидной фазы плазматической мембраны лимфоцитов в области белок-липидных контактов. Изменение метаболического статуса лимфоцитов периферической крови у пациентов с персистентными вирусными инфекциями характеризуется увеличением содержания внутриклеточных липидов и активностью неспецифической эстеразы.

Установлено, что степень риска прогрессирования и хронизации вирусных гепатитов среди лиц европеоидной популяции ассоциирована с аллелями промоторных регионов -330G гена IL2 и -592A гена IL10, а также с Т/Т генотипом полиморфного участка С-590Т гена IL4. Фактором резистентности к длительной персистенции вирусов гепатита В и С является генотип С/С промоторного региона С-592А гена IL10.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные данные фундаментального характера раскрывают новые патофизиологические, иммунологические и иммуногенетические аспекты развития персистентных вирусных инфекций. Показана значимая роль нарушений структурно-метаболического и функционального состояния лимфоцитарных клеток, цитокинпродуцирующей способности мононуклеаров периферической крови в механизмах формирования персистенции вирусов гепатита В и С, клещевого энцефалита, простого герпеса. Выявлены иммуногенетические факторы риска прогрессирования и резистентности к хронизации вирусных гепатитов В, С и В+С, ассоциированные с аллелями промоторных регионов генов IL2, IL4 и IL10. Положения исследования могут служить базисом не только для дальнейшего изучения патогенетических механизмов персистентных вирусных инфекций, но и для разработки новых подходов к прогнозированию клинического течения инфекционного процесса при гепатитах В, С, В+С, клещевом энцефалите, герпетической инфекции.

Положения, выносимые на защиту:

1. Персистентные вирусные инфекции (хронический вирусный гепатит В, С, В+С, хроническая антигенемия вируса клещевого энцефалита, хроническая герпетическая инфекция) сопровождаются угнетением Т-клеточного звена иммунитета, выраженным изменением процессов пролиферации и дифференцировки лимфоцитарных клеток, а также нарушением межклеточной кооперации иммунокомпетентных клеток.
2. Механизмы дисбаланса кооперативного взаимодействия иммуноцитов при персистентных вирусных инфекциях (хронический вирусный гепатит В, С и В+С, хроническая антигенемия вируса клещевого энцефалита, хроническая

герпетическая инфекция) сопряжены с поляризацией иммунного ответа в направлении Th2.

3. Персистентные вирусные инфекции сопровождаются выраженными изменениями структурно-метаболических свойств лимфоцитов периферической крови, к числу которых относятся дезорганизация поверхностной архитектоники, структурная модификация липидной фазы плазматической мембраны лимфоцитов в области белок-липидных контактов, увеличение содержания липидов и активности неспецифической эстеразы в лимфоцитарных клетках.
4. Иммуногенетическим фактором предрасположенности к длительной персистенции вирусов гепатита В и С среди лиц европеоидной популяции является генотип С/С промоторного региона С-592А гена IL10. Степень риска прогрессирования и хронизации вирусного гепатита В и С ассоциирована с аллелями промоторных регионов -330G гена IL2 и -592А гена IL10, а также с Т/Т генотипом полиморфного участка С-590Т гена IL4.
5. Общая направленность иммунопатологических расстройств (угнетение антигенспецифического звена иммунного ответа, дисбаланс кооперативного взаимодействия иммунцитов, дизрегуляция процессов пролиферации и дифференцировки иммунокомпетентных клеток, нарушение структурно-метаболических и функциональных свойств лимфоцитов периферической крови) при персистентных вирусных инфекциях (хронический вирусный гепатит В, С и В+С, хроническая антигенемия вируса клещевого энцефалита, хроническая герпетическая инфекция), проявляющихся стертым клиническим течением, не определяется таксономической принадлежностью возбудителя инфекции.

Апробация и реализация работы. Результаты исследования обсуждались на VI Российском съезде врачей-инфекционистов (Санкт-Петербург, 2003), Второй международной конференции «Патофизиология и современная медицина» (Москва, 2004), Выездном пленуме правления Научного общества гастроэнтерологов «Новые горизонты гастроэнтерологии» (Новосибирск, 2004), Четвертом съезде Научного общества гастроэнтерологов России (Москва, 2004), Третьем Российском конгрессе по патофизиологии с международным участием «Дизрегуляторная патология органов и систем» (Москва, 2004), Всероссийской конференции «Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии» (Санкт-Петербург, 2004), II Всемирном конгрессе по аллергологии и иммунологии (Москва, 2004 г.), Второй Всероссийской научно-практической конференции «Компенсаторно-приспособительные процессы: фундаментальные, экологические и клинические аспекты» (Новосибирск, 2004), VI Всероссийской научно-практической конференции «Вирусные гепатиты – проблемы эпидемиологии, диагностики, лечения и профилактики» (Москва, 2005).

Результаты исследования используются в курсе лекций по патологической физиологии (раздел «Патофизиология системы иммунитета», «Патофизиология инфекционного процесса», «Патофизиология клетки») на лечебном, педиатрическом и фармацевтическом факультетах ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава.

Исследование выполнено в рамках Федеральной научно-технической программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники 2002-2006 годов» по мероприятию «Развитие системы ведущих научных школ как среды генерации знаний и подготовки научно-педагогических кадров высшей квалификации. Проведение научно-исследовательских работ по приоритетным направлениям Программы» (№ РИ 112/001/158), а также при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации для поддержки ведущих научных школ Российской Федерации (№ НШ-1051.2003.4) «Молекулярные механизмы нарушений структуры, метаболизма и функций клеток при патологии» и Администрации Томской области (договор №136 от 23.09.2004) «Создание и внедрение панели молекулярно-генетических маркеров для прогнозирования течения и исхода вирусных гепатитов».

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 49 работ, из них 21 статья в журналах, рекомендованных ВАК РФ, одна монография в соавторстве и 27 статей и тезисов в сборниках научных трудов и материалов съездов, конгрессов и конференций.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 343 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов и списка литературы. Диссертация иллюстрирована 83 таблицами и 18 рисунками. Библиографический указатель включает 633 источников (354 – отечественных и 279 – иностранных).

ХАРАКТЕРИСТИКА КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящей работе приведены результаты комплексного клинико-лабораторного обследования 277 больных (168 мужчин и 109 женщин в возрасте от 18 до 50 лет, средний возраст - 31 ± 3 года) с длительной персистенцией вирусов гепатита В (HBV) и С (HCV), клещевого энцефалита (TBEV), простого герпеса (HSV) типов 1 и 2. Пациенты находились на диспансерном учете и стационарном лечении в отделении гастроэнтерологии Томской областной клинической больницы, инфекционном отделении клиник ГОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию», инфекционном отделении МЛПУ медико-санитарной части «Строитель» г. Томска и ГУЗ «Томский областной центр профилактики и борьбы со СПИД и другими инфекционными заболеваниями Де-

партамента здравоохранения Администрации Томской области». Контрольную группу составили 80 практически здоровых доноров с аналогичными характеристиками по полу и возрасту.

В зависимости от этиологического варианта инфекции обследованные пациенты были разделены на три группы: первую группу составили 158 больных хроническим вирусным гепатитом В, С и В+С, вторую – 79 пациентов с хроническим носительством вируса клещевого энцефалита, третью – 40 пациентов с хронической герпетической инфекцией. Обследование проводилось до назначения специфической противовирусной и иммунокорригирующей терапии. Клинически и анамнестически у всех обследованных лиц были исключены инфекционные заболевания другой этиологии, выраженные аутоиммунные проявления на фоне вирусной персистенции, обострение хронических воспалительных процессов, наследственные и психические болезни, а также злоупотребление алкоголем и наркотическая зависимость.

В программу исследования были включены 158 пациентов, страдающих вирусным гепатитом В, С и В+С (по МКБ-10 рубрики В18.0 – хронический вирусный гепатит В с дельта-антигеном, В18.1 – хронический вирусный гепатит В без дельта-антигена, В18.2 – хронический вирусный гепатит С, В18.8 – другой хронический вирусный гепатит). Все пациенты представляли группу риска по инфицированию парентеральными вирусными гепатитами (в анамнезе были указания о лечении или удалении зубов, оперативных вмешательствах с переливанием крови и ее компонентов, сексуальных и бытовых контактах с больными хроническим вирусным гепатитом, контактах с препаратами крови и больными хроническим вирусным гепатитом у медицинских работников).

Диагноз хронического вирусного гепатита основывался на выявлении синдромов гепато- и спленомегалии, холестаза, цитолиза (повышение уровня аланинаминотрансферазы (АлАТ), аспартатаминотрансферазы (АсАТ) в сыворотке крови), а также мезенхимально-воспалительного синдрома. Верификация диагноза проводилась на основании выявления в сыворотке крови ДНК HBV и РНК HCV методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), а также серологических маркеров HBV (HbeAg, HBsAg, анти-HBc IgM, анти-Hbcor) и HCV (анти-HCV IgG к core-, С-протеину, неструктурным белкам (NS3, NS4, NS5), анти-HCV IgM).

По выраженности некроза паренхимы печени и воспалительной клеточной инфильтрации определяли степень активности вирусного гепатита: минимальная (1-4 балла), слабовыраженная (5-8 баллов), умеренная (9-12 баллов) и высокая (13-18 баллов), оценивая выраженность качественных и количественных изменений печеночной паренхимы с помощью индекса гистологической активности в соответствии с классификацией R. Knodell [1981]. Давность хронического вирусного гепатита составляла от 1 года до 18 лет (в среднем 7 ± 3 года).

В соответствии с классификацией, принятой Всемирным конгрессом гастроэнтерологов в Лос-Анджелесе [1994], были выделены следующие клинические группы: 1) больные хроническим гепатитом В слабовыраженной степени активности – 19 человек; 2) больные хроническим гепатитом В умеренной степени активности – 16 человек; 3) больные хроническим гепатитом С слабовыраженной степени активности – 36 человек; 4) больные хроническим гепатитом С умеренной степени активности – 58 человек; 5) больные хроническим микст-гепатитом В+С слабовыраженной степени активности – 13 человек; 6) больные хроническим микст-гепатитом В+С умеренной степени активности – 16 человек.

По результатам генотипирования HCV у 57% пациентов был выявлен 1b генотип HCV, у остальных обследованных – генотипы 2a и 3a.

Анализ клинической картины у пациентов с хроническими вирусными гепатитами умеренной степени активности показал, что наиболее часто у пациентов выявлялся астеновегетативный синдром (83%). Диспепсический синдром (непереносимость жирной пищи, тошнота, горечь во рту, изжога, метеоризм) встречался у 56% пациентов. Синдром холестаза (желтушное окрашивание кожи и склер, зуд, билирубинемия) чаще обнаруживался у больных хроническим гепатитом С (52%), чем у пациентов с хроническим гепатитом В (44%) и В+С (49%). В большинстве случаев гепато- и спленомегалия, выявленные физикально, подтверждались результатами ультразвукового исследования. При анализе биохимических показателей крови ведущим был синдром цитолиза. У пациентов с хроническим гепатитом В умеренной степени активности повышение АсАТ и АлАТ отмечалось в 82% случаев, у пациентов с хроническим гепатитом С – в 68%, у больных с микст-инфекцией – в 70%.

Пациенты с хроническими вирусными гепатитами слабовыраженной степени активности характеризовались отсутствием клинической симптоматики и ультразвуковых признаков поражения печени, нормальными значениями биохимических показателей. Астеновегетативный синдром выявлялся у 52% пациентов с хроническим вирусным гепатитом В, у 43% пациентов с хроническим вирусным гепатитом С и у 65% пациентов с хроническим вирусным гепатитом В+С. Диагноз основывался на данных анамнеза, а также результатах обнаружения серологических маркеров HBV- и HCV-инфекции (HBs-антигена и анти-HCV IgG соответственно). Метод молекулярно-генетического исследования подтверждал наличие в сыворотке крови у больных ДНК HBV и РНК HCV.

Пациенты, страдающие клещевым энцефалитом (по МКБ-10 рубрика А84.0), были объединены в группы на основании клинической классификации, предложенной Н.Г. Жуковой и соавт. [2000, 2002]. Верификацию диагноза проводили на основании данных эпидемиологического анамнеза (факт присасывания клеща, пребывание в эпидемическом очаге и др.), результатов лабораторного исследования (определение уровня специфических антител к антигену вируса клещевого энцефалита с помощью иммуноферментного анализа, реакции не-

прямой гемагглютинации; обнаружение вирусной РНК методом ПЦР), а также оценки неврологического статуса.

Первую группу обследованных составили 44 пациента с бессимптомным носительством вируса клещевого энцефалита (более 6 мес с момента инфицирования). У пациентов отсутствовали клинические симптомы заболевания, однако в крови обнаруживались РНК вируса клещевого энцефалита, а также повышенный уровень специфических антител IgM и IgG. Во вторую группу обследованных были включены 35 пациентов с хронической антигенемией вируса клещевого энцефалита с минимальными клиническими проявлениями нейроинфекции. Продолжительность заболевания у таких пациентов составляла от 8 до 30 мес. Примечательно, что после инфицирования вирусами клещевого энцефалита у 16 больных развивалась картина лихорадочной, у 19 – стертой форм нейроинфекции. Основными клиническими проявлениями длительной персистенции вируса клещевого энцефалита у таких пациентов были астеновегетативный синдром (головная боль, повышенная утомляемость) – в 81% случаев и остаточная неврологическая симптоматика (невралгия, миалгия, локальное снижение болевой чувствительности) – у 68% обследованных пациентов.

В исследование были включены пациенты, страдающие хронической герпетической инфекцией (по МКБ-10 рубрики B00.1 – герпетический везикулярный дерматит, вызванный вирусом простого герпеса; B00.5 – герпетическая болезнь глаз, вызванная вирусом простого герпеса; A60.0 – герпетические инфекции половых органов и мочеполового тракта). Верификацию диагноза проводили на основании клинико-эпидемиологических данных, результатов лабораторного исследования (определение антигерпетических IgM- и IgG-антител серотипов 1 и 2 с помощью иммуноферментного анализа, а также выявление ДНК вируса простого герпеса типов 1 и 2 с использованием ПЦР).

Первую группу обследованных составили 26 пациентов с хронической герпетической инфекцией в стадии обострения. Основным клиническим синдромом был астеновегетативный: 94% пациентов предъявляли жалобы на слабость, снижение работоспособности, головные боли, нарушение сна, потливость. Герпетическая сыпь у 12 пациентов была локализована вокруг рта и на губах (herpes labialis), у 8 обследованных был обнаружен кератоконъюнктивит, у 6 – герпетические поражения гениталий. Во вторую группу обследованных были включены 14 пациентов с хронической герпетической инфекцией в стадии ремиссии. У пациентов отсутствовали клинические симптомы заболевания, при этом в крови обнаруживалась ДНК вируса простого герпеса, а также повышенный уровень специфических антигерпетических антител IgM и IgG. Продолжительность межрецидивного периода у таких пациентов составляла от 2 до 17 мес. Примечательно, что при рецидивах герпетические высыпания поражали, как правило, одни и те же участки кожи и слизистых.

У пациентов с длительной персистенцией вирусов гепатита В и С, клещевого энцефалита, простого герпеса и здоровых доноров проводили комплексное исследование структурных, метаболических и функциональных свойств моонуклеаров, а также анализ полиморфизма генов цитокинов. Распределение здоровых доноров и больных с хронической персистенцией вирусов в соответствии с использованными методами исследования представлено в табл. 1.

Материалом исследования служила стабилизированная гепарином (25 Ед/мл) венозная кровь, взятая из локтевой вены утром натощак. Определение общего количества лейкоцитов и подсчет их отдельных морфологических форм проводили стандартными гематологическими методами. Мазки готовили из лейкоконцентрата венозной крови [Меньшиков В.В., 1987]. Для выделения лимфоцитов из крови в качестве градиента плотности использовали Ficoll-Paque («Pharmacia», Швеция) [Гольдберг Е.Д. и соавт., 1992].

Определение содержания CD3⁺-, CD4⁺-, CD8⁺-, CD22⁺-, CD56⁺-, CD95⁺-несущих лимфоцитов проводили иммуноцитохимическим методом с использованием набора реагентов фирмы «Дако» (Дания). При микроскопии идентифицировали окрашенный продукт иммуноферментной реакции, образовавшийся в местах связывания выявляемых антигенов. Положительно окрашенным считался лимфоцит, по окружности которого продукт реакции занимал не менее трети. Проводили подсчет 200 клеток, определяли процент положительно окрашенных клеток [Тотолян А.А. и соавт., 2002].

Пролиферативную активность лимфоцитарных клеток оценивали с использованием теста бластной трансформации лимфоцитов. В культуральную суспензию вносили фитогемагглютинин (ФГА) («Difco», Германия) в концентрации 0,01 мг/мл культуры. Результаты теста выражали в процентах неизменных, переходных и бластных форм лимфоцитов [Гольдберг Е.Д. и соавт., 1992].

Исследование поверхностной архитектоники лимфоцитов периферической крови проводили методом сканирующей электронной микроскопии [Козинец Г.И. и соавт., 1997, 2002]. Лимфоциты фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида, постфиксацию материала проводили в 1% растворе четырехоксида осмия и обезвоживали в серии водных растворов этилового спирта возрастающей концентрации. Дегидратированные лимфоциты наносили тонким слоем на алюминиевые подложки, препараты напыляли серебром в вакуумной установке JEE-4B («JEOL», Япония). Просмотр препаратов осуществляли в электронном микроскопе JEM-100 CX II с растровой приставкой ASID-4D («JEOL», Япония) при ускоряющем напряжении 20 кВ. Для получения количественной характеристики распределения морфологических форм лимфоцитов проводили подсчет не менее 100 произвольно выбранных клеток у каждого обследованного, используя при этом классификации Г.И. Козинца [1984, 2002] и Ю.А. Ровенского [1979]. Для получения электронных микрофотографий лимфоцитарных клеток выполняли фотосъемку лимфоцитарных клеток при увеличении от 4000 до 10000.

Таблица 1

Распределение здоровых доноров и больных с персистенцией вирусов гепатита, клещевого энцефалита и простого герпеса в соответствии с использованными методами исследования

№ п/п	Методы исследования	Группы обследованных			
		Здоровые доноры	Пациенты с хроническим вирусным гепатитом	Пациенты с персистенцией вируса клещевого энцефалита	Пациенты с хронической герпетической инфекцией
1	Исследование количественных показателей белой крови	53	138	79	40
2	Исследование структуры плазматической мембраны лимфоцитов периферической крови	39	88	41	–
3	Исследование поверхностной архитектоники и ультраструктурных особенностей лимфоцитов периферической крови	10	30	13	12
4	Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови	19	69	21	26
5	Исследование пролиферативной активности лимфоцитов периферической крови	16	80	24	26
6	Исследование метаболического статуса лимфоцитов периферической крови	26	88	22	32
7	Исследование цитокинпродуцирующей способности мононуклеаров периферической крови	10	68	17	18
8	Исследование полиморфизма генов цитокинов	48	103	–	–

Исследование ультраструктуры лимфоцитов осуществляли методом трансмиссионной электронной микроскопии. Фиксированные и дегидратированные лимфоциты пропитывали смолами [Уикли И.Б., 1975]. Ультратонкие срезы толщиной 30-60 нм готовили на ультрамикротоме Ultrotome-III («LKB», Швеция). Полученные срезы наносили на сетки-подложки с фарфоровым покрытием и контрастировали 2% раствором уранилацетата в 50% этаноле (20-30 мин при 37°C) и цитратом свинца (от 3 до 10 мин при комнатной температуре) по E. Reynolds [1963]. Полученные препараты просматривали в электронном микроскопе JEM-100 CXII («JEOL», Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. В каждом случае просматривали не менее 100 лимфоцитов и методом случайной выборки проводили фотосъемку клеток при увеличении от 5200 до 54000 [Уикли И.Б., 1975; Карупу В.Я., 1984].

Спектрофлуориметрическое исследование плазматической мембраны лимфоцитов выполняли с использованием флуоресцентного зонда пирен («Sigma», США). Взаимодействие мембран с зондом регистрировали на спектрофлуориметре MPF-4 («Hitachi», Япония). Микровязкость липидной фазы мембраны лимфоцитов оценивали по степени эксимеризации пирена, мигрирующего в ее гидрофобном компартменте, в среде следующего состава (мМ): NaCl-145, трис-HCl-10 (pH 7,4) при длине возбуждающего света 285 и 340 нм. Определяли коэффициент эксимеризации пирена, равный отношению максимумов интенсивностей флуоресценции эксимерной формы зонда (470 нм) к мономерной (370 нм), а также I_{370}/I_{390} при $\lambda_B=340$ нм для оценки полярности окружения молекул пирена. Рассчитывали показатель миграции энергии с триптофановых остатков белка на пирен [Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е., 1980].

Для получения супернатантов выделенные моноклеары культивировали в полной культуральной среде, состоящей из 90% RPMI-1640, 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки («ICN Biomedicals Inc.», США), 280 мг/л L-глутамина, 100 мг/л гентамицина, 2 мМ/л HEPES («Flow», Великобритания). Стандартизировали количество клеток в суспензии до $2,0 \times 10^6$ /мл. Для стимуляции секреторных способностей лимфоцитов в пробы вносили ФГА («Difco», Германия) в концентрации 0,01 мг/мл культуры. Клеточные суспензии в количестве 2 мл инкубировали при 37°C и 5% CO₂ на протяжении 24 ч [Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 2001].

Содержание гликогена и липидов, активность неспецифической эстеразы и кислой фосфатазы оценивали цитохимическими методами исследования [Хейхоу Дж., Кваглино Д., 1983; Меньшиков В.В., 1987; Почтарь М.Е. и соавт., 2003].

Определение уровней иммунорегуляторных цитокинов (IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 и IL-12) в супернатантах проводили с использованием твердофазного иммуноферментного «сэндвичевого» метода. Процедуру выполнения

иммуноферментного анализа проводили по инструкциям, предлагаемым производителями тест-систем («Procon», Россия; «Cytimmune», США). Учет результатов иммуноферментного анализа проводили с помощью фотометра для микропланшетов «Multiscan EX» («ThermoLabSystems», Финляндия) при длине волны 450 нм (для IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4 и IL-6) и 490 нм (для IL-10 и IL-12). Концентрацию цитокинов вычисляли по калибровочной кривой.

Выделение ДНК проводили методом фенольной экстракции с помощью коммерческого набора «ВектоДНКэкстракция» («Вектор-Бест», Россия). Генотипирование аллельных вариантов промоторных регионов генов цитокинов (T-330G IL2, C-590T IL4, C-592A IL10) осуществляли методом рестрикционного анализа продуктов амплификации специфических участков генома. Амплификацию проводили путем полимеразной цепной реакции, используя структуру праймеров (табл. 2) и параметры температурных циклов, описанных в литературе, и учитывая применение нами амплификатора Tercik MC2 («ДНК-технология», Россия).

Таблица 2

Характеристики исследованных полиморфизмов генов цитокинов

Имя гена	Полиморфизм	Структура праймера	Температура отжига (°C)	Фермент рестрикции
IL2	T-330G	5'-tattcacatgttcagtgtagttct-3' 5'-acattagcccacacttaggt-3'	48	Maе I
IL4	C-590T	5'-caggagagccaatcagt-3' 5'-atgatgtccagactccaggatct-3'	57	Bsm FI
IL10	C-592A	5'-atccaagacaacactactaa-3' 5'-taaatatcctcaaagttcc-3'	54	Rsa I

Результаты исследования обрабатывали с использованием стандартного пакета программ Statistica for Windows (2000, версия 6.0) фирмы «Statsoft Inc» и пакета программ Microsoft Excel (2003) корпорации «Microsoft». Для всех имеющихся выборок данных проверяли гипотезу нормальности распределения по критерию Колмогорова-Смирнова. Проверку гипотезы о равенстве средних выборочных величин проводили с использованием t-критерия Стьюдента, критериев Манна-Уитни и Вилкоксона [Бронштейн И.Н., 1986; Боровиков В.В., 2001].

Распределение генотипов по исследованным полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди-Вайнберга с помощью точного теста Фишера. Для сравнения частот аллелей между различными группами использовали критерий χ^2 Пирсона и точный тест Фишера [Флейс Дж., 1989; Боровиков

В.В., 2001]. Обработка результатов генетических исследований осуществлялась с помощью критерия отношения шансов OR с расчетом для него 95% доверительного интервала [Флейс Дж., 1989].

Для выявления функциональных взаимосвязей между группами изучаемых параметров использовался корреляционный анализ Спирмена. Сравнение многомерных группировок проводили с помощью дискриминантного анализа с применением алгоритма пошагового отбора информативных признаков [Лакин Г.Ф., 1980; Бронштейн И.Н., 1986; Боровиков В.В., 2001].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В патогенезе хронических вирусных инфекций принципиальны два основных фактора: биологическая стадия жизнедеятельности вируса и характер иммунного ответа макроорганизма [Игнатьева Г.А., 1997; Ferrari C. et al., 1998; Boyer N., 2000; Ярилин А.А., 2001; Freeman A.G. et al., 2001; Gomez I. et al., 2003]. Тяжесть течения вирусной инфекции при этом обусловлена не исключительно генетической организацией вируса, а сложным комплексом взаимодействия инфекта и хозяина. Состояние иммунной системы последнего играет столь же важную роль, что и таксономическая принадлежность микроорганизма. Одним из общих условий для патогенетически значимой активации вирусов является ослабление резистентности хозяина. Впрочем, и нормально функционирующая иммунная система не только не гарантирует защиты от клинически значимой персистенции вирусов, но и непосредственно участвует в реализации ее патогенетического потенциала. Это совершенно необходимо для вирусов, которые лишены собственной цитотоксичности, формально безвредны для изолированных клеток, но обретают болезнетворность, подключая эффекторы иммунитета [Koziel M. J., 1997; Абелев Г.И., 1998; Земсков А.М. и соавт., 2001; Серов В.В., 2001; Толоконская Н.П. и соавт., 2001; Маммаев С.Н., 2002; Непомнящих Г.И. и соавт., 2002; Пименов Е.В. и соавт., 2003].

Установлено, что пусковым моментом для включения специфического иммунного ответа является взаимодействие Т-хелпера (Th) с антигенпрезентирующей клеткой, на поверхности которой присутствует антигенный пептид, комплексированный с молекулой главного комплекса гистосовместимости (МНС) II класса [Madden D.R., 1995; Mach V. et al., 1996; Фрейдлин И.С., 1998; Хайтов Р.М., 2001; Мезенцева М.В. и соавт., 2002; Пащенко М.В. и соавт., 2002]. Это готовит клетку к пролиферации, лежащей в основе любых форм проявления активности лимфоцитов [Van Seventer G.A. et al., 1991; Janeway C.A., 1992; Lindsey P.S. et al., 1993; Lenshaw D.J. et al., 1996; Chambers C.A. et al., 1997; Хайтов Р.М., 2000, 2001; Корочкина О.В. и соавт., 2003; Симбирцев А.С., 2004].

По мнению ряда авторов, активность Т-клеточного звена иммунитета при хронической вирусной инфекции играет крайне важную роль [Koziel M. J., 1997; Mason D. et al., 1998; Chang K.M. et al., 2001; Аммосов А.Д., 2002; Маммаев С.Н. и соавт., 2002; Новицкий В.В. и соавт., 2002]. Результаты иммуноцитохимического исследования лимфоцитов у пациентов с персистенцией вирусов гепатита В и С, клещевого энцефалита и простого герпеса, полученные в ходе нашего исследования, носили однонаправленный характер и свидетельствовали о дефекте Т-клеточного звена иммунитета как в количественном, так и в качественном составе клеток.

Так, у больных хроническим вирусным гепатитом В слабовыраженной и умеренной степеней активности статистически значимо снижалось (по сравнению с контролем) относительное содержание зрелых CD3+-клеток ($54,14 \pm 3,71\%$, $p < 0,05$ и $54,86 \pm 3,52\%$, $p < 0,05$, соответственно), абсолютное и относительное число CD4+-лимфоцитов (соответственно $0,42 \pm 0,11$ Г/л, $p < 0,05$ и $22,14 \pm 2,47\%$, $p < 0,01$; $0,37 \pm 0,12\%$, $p < 0,01$ и $20,56 \pm 2,03\%$, $p < 0,01$) и натуральных киллеров ($0,19 \pm 0,02$ Г/л, $p < 0,01$ и $5,57 \pm 0,61\%$, $p < 0,01$; $0,34 \pm 0,02\%$, $p < 0,01$ и $10,11 \pm 1,51\%$, $p < 0,05$), а также иммунорегуляторный индекс (CD4+/CD8+) ($0,84 \pm 0,15$, $p < 0,05$ и $0,97 \pm 0,15$, $p < 0,05$). При анализе параметров, характеризующих субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови, у пациентов с длительной персистенцией вирусов гепатита С, клещевого энцефалита и простого герпеса были выявлены изменения аналогичного характера.

Отсутствие эффективного Т-клеточного ответа у пациентов с длительной вирусной персистенцией может быть обусловлено низким уровнем репликации вируса, что вызывает низкую экспрессию лейкоцитарных антигенов человека (HLA) и других вспомогательных молекул на поверхности инфицированных клеток (ниже порога индукции Т-клеточного ответа). В частности, известно, что HCV способен влиять на процесс активации CD4+-Т-лимфоцитов, нарушая взаимодействие антигенпрезентирующих клеток с Т-лимфоцитами. В ряде исследований показана также возможность процессинга неиммуногенных фрагментов core-белка, которые нарушают распознавание core-протеина и ингибируют активацию CD4+-клеток [Bartenschlager R., Lohman V., 2000; Otsuka M. et al., 2002]. С другой стороны, дефект популяции зрелых Т-клеток и CD4+-лимфоцитов может быть опосредован развивающимся в ходе длительной персистенции дисбалансом продукции цитокинов [Arai K. et al., 1990; Павлова Л.Е. и соавт., 2000; Freeman A.G. et al., 2001; Собчак Д.М., Монакова Э.А., 2004].

Основной результат активации Т-клеток состоит в индукции экспрессии генов ростовых факторов и их рецепторов. ИЛ-2, являясь основным аутокринным ростовым фактором Т-лимфоцитов, обеспечивает их клональную экспансию при ответе на антиген. Распознавание специфического антигена TCR в сочетании с сопутствующими сигналами костимуляции индуцирует вступление Т-

лимфоцита в G₁-фазу клеточного цикла и активацию нескольких факторов транскрипции [Мищенко В. А. и соавт., 1994; Симбирцев А.С., 1998, 2004; Eckels D.D. et al., 1999; Хайтов Р.М., 2001; Корочкина О.В. и соавт., 2003; Gomez I. et al., 2003]. Контроль транскрипции гена IL2 связан с определенными зонами 5'-области, где расположены участки связывания энхансеров транскрипции NF-AT1, NF-κB, AP-1, egr-1. Транскрипционные факторы играют ключевую роль в регуляции экспрессии гена IL2, являющегося аутокринным ростовым фактором лимфоцитов, и α-цепи его рецептора [Симбирцев А.С., 1998, 2002, 2004; Gomez I. et al., 2003].

Установлено, что блокада экспрессии белка NF-AT, представляющего собой важнейшее звено сигнального пути регуляции экспрессии гена IL2, в Т-лимфоцитах сопровождается снижением активности промотора IL-2 и угнетением синтеза цитокина. Все сайты, находящиеся в промоторном регионе, необходимы для полноценной активации в ответ на стимуляцию лимфоцита. Полагают, что способность стимулировать экспрессию имеют все присутствующие в лимфоцитах NF-AT-белки – NF-AT1, NF-AT2, NF-AT3, NF-AT4. Причем промотор гена IL2 низко селективен в отношении типа NF-AT, инициирующего транскрипцию. Вероятно, этим объясняется отсутствие влияния на экспрессию данного интерлейкина блокады экспрессии одного из факторов NF-AT-семейства при условии доступности NF-AT2 и /или NF-AT4 [Симбирцев А.С., 1998; Jia H. et al., 2003.]. Однако транскрипции гена недостаточно для продукции цитокина, индукция которой нуждается в сигнале, полученном через молекулу CD28, стабилизирующую мРНК IL-2, что способствует увеличению синтеза иммунного медиатора в десятки раз. При связывании Т-клеточного рецептора (TCR) и CD28 происходит кооперация сигналов посредством JNK, фосфорилирующей фактор c-jun, что является необходимым для образования AP-1. Сигнал от CD28 принимает участие в активации и другого фактора транскрипции NF-κB. Установлено, что в регуляторном участке гена IL2 локализован элемент, отвечающий на CD28-CD28RE/MFRS, с которым связывается NF-κB. Связывание CD28 ведет к активации факторов транскрипции в 3 раза, при этом продукция IL-2 активированными Т-лимфоцитами возрастает в 100 раз [Eckels D.D. et al., 1999].

Проведенное в нашей лаборатории исследование цитокинпродуцирующей функции мононуклеаров периферической крови у пациентов с длительной персистенцией вирусов гепатита В, С, клещевого энцефалита и простого герпеса показало, что индуцированная ФГА продукция IL-2 была достоверно ниже, чем у здоровых доноров. Вполне закономерно, что угнетение стимулированной продукции IL-2 у больных хроническим вирусным гепатитом умеренной степени активности (121,11±16,86 пг/мл) носило более выраженный характер, нежели у пациентов с гепатитом слабовыраженной степени активности (168,40±14,85 пг/мл, p<0,05). При этом у лиц с хронической герпетической инфекцией в стадии

ремиссии уровень стимулированной секреции данного цитокина оказался достоверно выше, чем у пациентов в стадии рецидива ($150,50 \pm 6,00$ и $122,50 \pm 6,05$ пг/мл соответственно, $p < 0,05$).

Механизмы подавления индуцированного синтеза IL-2 при персистентных вирусных инфекциях остаются недостаточно изученными. По-видимому, имеет место не один, а несколько типов ингибирования продукции данного иммунорегуляторного белка [Симбирцев А.С., 1998; Eckels D.D. et al., 1999]. Особенности действия, уровень продукции цитокина и его биологическая активность находятся под влиянием различных факторов: соотношения рецепторов – агонистов и антагонистов («ловушек»), связи с компонентами внеклеточного матрикса и белками плазмы, в частности с α_2 -макроглобулином, способствующим инактивации циркулирующего цитокина, величины рН и антиоксидантного потенциала [Ивашкин В.Т. и соавт., 2002].

Имеются сведения, например, что белковые продукты HCV могут блокировать внутриклеточную передачу сигналов от рецепторов IFN и снижать секрецию IL-2 и IFN- γ активированными Т-лимфоцитами. Это вызывает смещение баланса в пользу Th2, что является частью стратегии выживания вируса [Large M.K. et al., 1999]. Снижение стимулированной ФГА продукции IL-2, одного из основных ростовых факторов для Т-клеток, вероятно, способствовало истощению популяции Т-лимфоцитов.

В ходе специфического иммунного ответа Т-хелперы дифференцируются из CD4+-клеток вслед за их пролиферацией. Различают три клона Т-хелперов: Th0, Th1 и Th2. Стимулированные вирусной инфекцией макрофаги, продуцируя IL-12, способствуют дифференцировке Th0 в Th1, отвечающие в основном за реакции клеточного иммунитета. Th1, в свою очередь, также продуцируют цитокины, среди которых особое значение имеют IL-2 и IFN- γ . IFN- γ стимулирует цитотоксические Т-лимфоциты и естественные киллеры (NK). NK-клетки также способны продуцировать IFN- γ , который, в свою очередь, вновь активировать макрофаги к продукции IL-12 [Корочкина О.В. и соавт., 2003; Симбирцев А.С., 2004].

Th2 отвечают за развитие гуморального иммунитета. Дифференцировка Th0 в Th2 происходит под влиянием IL-4. В то же время IL-4 подавляет продукцию IL-12, предотвращая пролиферацию Th1. Th2 отвечают за гуморальное звено иммунитета, а продуцируемые ими цитокины – IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 – принято относить к числу противовоспалительных цитокинов [Кетлинский С.А., 2002; Лебедев К.А., Понякина И.Д., 2003]. Вирусная инфекция и внутриклеточные паразиты активируют макрофаги к продукции IL-12 и, соответственно, дифференцировке клеток-хелперов в Th1, тогда как бактериальные антигены и аллергены – в Th2 [Кашкин К.П., 1998; Fan X.G. et al., 1998; Носик Н.Н., 2000; Громова Е.Г. и соавт., 2002] (рис. 1).

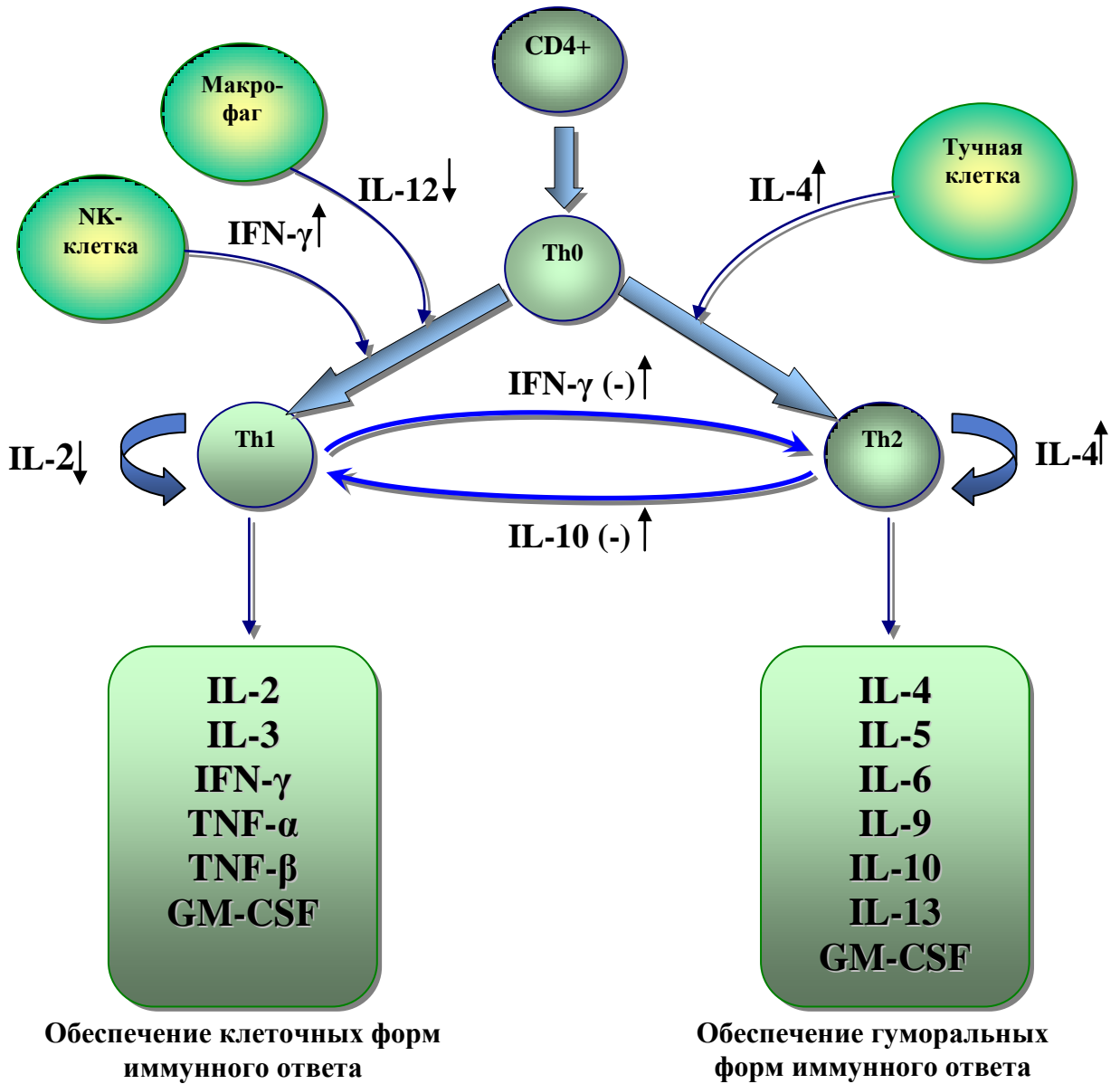


Рис. 1. Механизмы межклеточной кооперации иммунокомпетентных клеток при персистентных вирусных инфекциях

CD4+ - T-клетка с *CD4* фенотипом; *Th0*, *Th1*, *Th2* – субпопуляции T-хелперов; *IFN* – интерферон; *TNF* – фактор некроза опухолей; *GM-CSF* – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

По мнению современных авторов, нарушение баланса продукции цитокинов с превалированием медиаторов Th1 либо Th2 пути иммунного ответа играет ключевую роль в иммунопатогенезе персистентных вирусных инфекций [Bertolletti A. et al., 1997; Romagnani S., 1997; Fan X.G. et al., 1998; Игнатова Т.М., Серов В.В., 2001; Ивашкин В.Т. и соавт., 2002; Маммаев С.Н. и соавт., 2002; Масалова О.В. и соавт., 2003; Приймаги Л.С. и соавт., 2003]. Сведения о преобладании цитокинов Th1 или Th2 при хронических вирусных инфекциях в литературе довольно противоречивы. По некоторым данным, у больных хроническим вирусным гепатитом и циррозом печени, ассоциированных с HCV, определялась

повышенная продукция IL-4 и IL-10, низкая – IFN- γ [Собчак Д.М., Монакова Э.А., 2004]. Как показали результаты исследования Н.П. Пироговой [2004], хроническая персистенция возбудителя клещевого энцефалита сопровождается гиперпродукцией IL-12 и глубоким дефицитом синтеза IL-4. Небезынтересно отметить, что инфекция, вызванная HSV, характеризуется угнетением синтеза продуктов Th1-лимфоцитов, а именно снижением уровня IL-1 и IL-2 [Исаков В.А. и соавт., 1999; Shcheglovitova O.N., Maksianina E.V., 2004].

Как показали результаты проведенного нами исследования, у пациентов с длительной персистенцией вирусов гепатита В и С, клещевого энцефалита и простого герпеса ФГА-индуцированная продукция IL-12, отражающая резервные возможности мононуклеарных лейкоцитов, оказалась значительно снижена. Однако базальный синтез IL-12 увеличивался лишь у больных хроническим вирусным гепатитом В+С ($80,39 \pm 4,15$ пг/мл при $65,80 \pm 4,44$ пг/мл у здоровых доноров, $p < 0,05$) и у пациентов с хронической герпетической инфекцией ($98,79 \pm 4,23$ пг/мл, $p < 0,01$).

Нами было установлено, что длительная персистенция вирусов гепатита В и С, клещевого энцефалита и простого герпеса сопровождается повышением спонтанной продукции IFN- γ мононуклеарными лейкоцитами периферической крови относительно соответствующих показателей у здоровых индивидов. При этом стимулированная ФГА секреция IFN- γ , свидетельствующая о резервных возможностях мононуклеаров продуцировать IFN- γ , оказалась выше (чем в контроле) лишь у больных хроническим вирусным гепатитом В ($385,70 \pm 47,37$ пг/мл, $p < 0,01$), В+С ($372,81 \pm 37,78$ пг/мл, $p < 0,05$) и у пациентов с хронической антигемией вируса клещевого энцефалита ($339,55 \pm 21,08$ пг/мл, $p < 0,05$).

Согласно современным представлениям, IFN- α/β , IFN- γ , TNF- α и IL-12 принято объединять в группу противовирусных цитокинов благодаря их способности стимулировать транскрипцию IFN в инфицированной клетке, нарушать работу вирусного генома и вирусных протеинов (рис. 1). Однако экспериментальное изучение механизма действия IFN- γ на вирусную репликацию в культуре клеток показало, что цитокин обладает слабым антирепликативным эффектом, блокируя самые ранние этапы репродукции вируса, снижая активность вирусной ДНК-полимеразы и других α - и β -вирусных белков [Кирдей Е.Г., 2000; Хаитов Р.М., 2001; Samuel C. E., 2001].

С другой стороны, протективный эффект IFN- γ в значительной степени обусловлен его иммуномодулирующей активностью, нежели непосредственно противовирусным действием. Роль IFN- γ в противовирусном иммунном ответе связана с его активирующим влиянием на фагоцитарную активность макрофагов, прямую цитотоксичность Т-лимфоцитов, антителоопосредованный лизис инфицированных клеток макрофагами и полиморфноядерными лейкоцитами [Samuel C. E., 1988, 1991, 2001].

В результате экспериментальных исследований в литературе накоплены весьма противоречивые сведения о синтезе IFN- γ при хронических вирусных инфекциях. По мнению одних исследователей, длительная персистенция вирусов сопровождается угнетением продукции IFN- γ . При этом более значительно продукция цитокина подавлена у лиц с тяжелым течением хронического заболевания [Smith P.L. et al., 2005]. В работах ряда зарубежных ученых было продемонстрировано достоверное увеличение содержания IFN- γ в сыворотке крови у больных хроническим вирусным гепатитом В и С [Eckels D.D. et al., 1999; Jia H. et al., 2003]. Однако исследованиями X.G. Fan et al. [1998] показано, что уровень IFN- γ при хронической HCV-инфекции достоверно не изменялся, а при хронической инфекции, вызванной HBV, было выявлено увеличение уровня указанного цитокина в сыворотке крови. А.В. Исаковым и соавт. [1999] было продемонстрировано, что при хронической вирусной инфекции на фоне сниженного уровня сывороточного IFN отмечалась повышенная способность лейкоцитов к продукции индуцированного IFN- α / β и IFN- γ . Однако, несмотря на активную интерферонпродуцирующую способность мононуклеаров, у лиц с HSV-инфекцией регулярно регистрировались рецидивы заболевания.

Полноценность ответной реакции организма на вирусную инфекцию определяется также достаточной продукцией Th1-лимфоцитами TNF- α [Фрейдлин И.С., 1996; Ярилин А.А., 1999]. У обследованных нами пациентов с длительной персистенцией вирусов гепатита В, С и клещевого энцефалита отмечалось выраженное угнетение конституциональной и индуцированной способности мононуклеаров периферической крови продуцировать TNF- α по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров. Однако у пациентов с хронической герпетической инфекцией способность мононуклеаров секретировать TNF- α практически не отличалась от таковой в норме [Новицкий В.В. и соавт., 2005].

Снижение продукции TNF- α – ключевого провоспалительного цитокина, обладающего выраженным противовирусным потенциалом, во многом обуславливает неэффективность иммунной защиты организма в ответ на действие инфекта (рис. 1) [Хаитов Р.М., 2001]. С одной стороны, ограничение продукции TNF- α в условиях длительной вирусной персистенции можно расценивать как реакцию системы иммунитета, направленную на предотвращение реализации проапоптотического потенциала вирусов и развития необратимого повреждения органов и тканей, обусловленного действием этого цитокина Th1 пути. Например, показано прямое апоптозиндуцирующее действие HCV на гепатоциты. Центральную роль в индукции апоптоза этим вирусом играет его взаимодействие с рецепторными и сигналпередающими системами клетки [Буеверов А.О., 2001; Ивашкин В.Т. и соавт., 2002].

С другой стороны, известен феномен защиты от апоптоза клеток, инфицированных HSV, HIV, аденовирусами. Снижение продукции TNF- α можно расценивать как способ предотвращения вирусами Fas-индуцированного апоптоза [Сепиашвили Р.И. и соавт., 2000]. «Ускользание» вирусов из-под иммунного надзора в значительной степени обусловлено их способностью нейтрализовать биологические эффекты цитокинов хозяина, воспроизводить аналоги цитокинов и цитокиновых рецепторов, а также белки, нейтрализующие действие защитных молекул [Koziel M.J., 1999; Ивашкин В.Т. и соавт., 2001].

Внутриклеточная передача эффекторного сигнала TNF- α опосредуется разнообразными мессенджерами (тирозинкиназы, серинтреонинпротеинкиназы и др.), что объясняет широкий спектр биологических эффектов данного цитокина. TNF- α при взаимодействии с рецептором TNF-RI, имеющим функциональную связь с каскадом сериновых каспаз, может вызывать апоптоз как инфицированных, так и не инфицированных вирусом клеток-мишеней [Seder R.A., Paul W.E., 1994; Ramadori G., Christ B., 1999]. Известно, что действие TNF- α на клетку, опосредованное TNF-RI, неоднозначно. На одни клетки основным эффектом действия TNF- α является активация транскрипционных факторов NF- κ B и JNK, ведущих к индукции провоспалительных и иммуномодулирующих генов. В других клетках активация TNF-RI-рецептора ведет к запуску запрограммированной клеточной гибели. Следует отметить, что в отличие от FasL TNF- α реже самостоятельно индуцирует апоптоз. Несмотря на это, TNF-рецептор часто становится мишенью при патологических процессах. Так, при HIV-инфекции определена усиленная экспрессия TNFRI-рецептора и его взаимосвязь с уровнем апоптоза инфицированных клеток [Zylberberg H. et al., 1999]. Кроме того, показано, что увеличение уровня TNF- α – индуктора запрограммированной гибели клеток – при хронической HBV-инфекции может опосредовать усиленный апоптоз гепатоцитов [Ивашкин В.Т. и соавт., 2002; Маммаев С.Н. и соавт., 2002].

Логично предположить, что еще одним из возможных механизмов снижения уровня TNF- α может быть возрастание содержания «ловушек» цитокинов, в роли которых могут выступать растворимые формы их рецептора sTNF-R. Как свидетельствуют данные, полученные ранее в нашей лаборатории, хронический вирусный гепатит С сопровождается увеличением содержания растворимого рецептора к TNF- α с молекулярной массой 55 кДа [Наследникова И.О. и соавт., 2004; Рязанцева Н.В. и соавт., 2005]. Активация лимфоцитов наряду с экспрессией мембранных рецепторов также сопровождается синтезом растворимых форм рецепторных молекул, являющихся мощными регуляторами активности цитокинов. Внеклеточные домены рецепторов при действии ферментов способны за счет ограниченного протеолиза отщепляться от поверхности клеточных мембран и связываться со свободными молекулами цитокинов вне клетки, препятствуя ассоциации цитокина с мембранными рецепторами непосредственно на

клетке-мишени. Тем самым нарушается проведение сигнала и предотвращается реализация эффекта. Растворимые рецепторы могут также выполнять функцию конкурирующих антагонистов, выступая в роли переносчиков цитокинов, защищая их от разрушения протеазами и удлинняя время существования в системном кровотоке, а также участвуя в доставке цитокинов в очаг поражения и выведении их из организма [Ивашкин В.Т. и соавт., 2001; Рязанцева Н.В. и соавт., 2005].

Известно, что две основные группы лимфокинов, продуцируемых соответственно Th1- и Th2-лимфоцитами, оказывают положительное взаимное влияние. Причем ростовыми факторами для Th1- и Th2-клеток являются продуцируемые ими цитокины (соответственно IL-2 и IL-4) [Ярилин А.А., 1997; Хаитов Р.М., 2001]. Доказано, что, обладая выраженными контрвоспалительными свойствами, IL-4 и IL-10 стимулируют преимущественно гуморальное звено иммунитета, способствуя дифференцировке по Th2 пути иммунного ответа [Хаитов Р.М., 2001].

Как показали результаты настоящего исследования, хроническое носительство вирусов гепатита В, С, клещевого энцефалита и простого герпеса сопровождается значительным повышением как конституциональной продукции IL-4, так и резервных возможностей к индуцированной секреции одного из основных противовоспалительных цитокинов. Следует также учитывать и тот факт, что спонтанная и стимулированная ФГА продукция IL-10 у больных хроническим вирусным гепатитом В, С и В+С значительно увеличивалась. Однако синтез этого цитокина у пациентов с длительной персистенцией вирусов клещевого энцефалита и простого герпеса практически не изменялся [Наследникова И.О. и соавт., 2005].

Одним из свойств HCV, сформировавшихся в результате длительной эволюции, как раз и является его способность модулировать иммунный ответ, в том числе и в пользу реакций Th2 типа во время ранней фазы заболевания, а также склонять течение инфекции в сторону ее хронизации, чем, вероятно, и объясняется феномен его длительной персистенции в макроорганизме [Мезенцева М.В. и соавт., 2002; Приймаги Л.С. и соавт., 2002; Корочкина О.В. и соавт., 2003].

При изучении продукции цитокинов мононуклеарными лейкоцитами периферической крови в ответ на core-антиген HCV было отмечено, что у здоровых доноров в ответ на core-антиген продуцируются цитокины Th1 типа, тогда как у больных хроническим вирусным гепатитом С отмечается повышенная продукция IL-10. Авторы делают заключение о том, что хронический вирусный гепатит С сопровождается недостатком функции Th1 типа [Fan X.G. et al., 1998; Ягода А.В., 2003]. Подтверждением этому тезису служит работа N. Kurushita et al. [1997], в которой показано, что спонтанная продукция IL-4 и IL-10 мононуклеарными клетками периферической крови у пациентов с хроническим ви-

русным гепатитом С и циррозом печени оказалась значительно выше, чем у здоровых индивидов.

Обнаруженная нами положительная корреляционная зависимость между способностью мононуклеаров продуцировать ИЛ-4 ($r=0,84$, $p<0,01$) и ИЛ-10 ($r=0,67$, $p<0,05$), с одной стороны, и стадией хронизации вирусного гепатита – с другой, является подтверждением того, что указанные противовоспалительные цитокины являются медиаторами процессов регенерации и фиброгенеза [Friedman S.L., 1999; Ивашкин В.Т. и соавт., 2004].

Проведенное нами исследование способности мононуклеарных лейкоцитов периферической крови секретировать ИЛ-6, также являющегося цитокином Th2 пути иммунного ответа, позволило зарегистрировать значительное увеличение его базальной продукции у пациентов с хронической инфекцией, вызванной HBV, HCV, TBEV и HSV [Наследникова И.О. и соавт., 2005]. Кроме того, у больных хроническим вирусным гепатитом В отмечалось статистически значимое повышение и стимулированной секреции данного интерлейкина по сравнению с контролем ($477,11\pm 25,76$ пг/мл, $p<0,05$).

ИЛ-6, обладающий провоспалительными свойствами, по направленности действия значительно отличается от классических провоспалительных цитокинов TNF- α и ИЛ-1 [Ивашкин В.Т. и соавт., 2002]. В первую очередь это связано с тем, что ИЛ-6 наряду с ИЛ-10 и ИЛ-4 является цитокином Th2 пути иммунного ответа и участвует в поддержании роста и созревания В-лимфоцитов в антителопродуцирующие клетки (рис. 1) [Хаитов Р.М., 2001].

Проведенные недавно исследования показали относительное преобладание количества Th2 над числом Th1 в воспалительных клеточных инфильтратах при хронизации вирусного гепатита С и обратное соотношение их уровней в случае выздоровления. Низкий уровень ИЛ-1, ИЛ-2 и TNF- α у больных хроническим вирусным гепатитом С свидетельствовал о слабом иммунном ответе, что способствовало длительной циркуляции вируса, его активной репликации и, следовательно, формированию хронических форм болезни [Буеверов А.О., 1998; Ивашкин В.Т., 1998, 2000; Корочкина О.В. и соавт., 2003].

Необходимо подчеркнуть, что действие цитокинов как участников сложной многофункциональной сети при ряде хронических вирусных инфекций зависит от многих причин, к числу которых относятся индивидуальные различия в продукции иммунорегуляторных медиаторов, обусловленные рядом генетических особенностей [Игнатова Т.М., Серов В.В., 2001; Ивашкин В.Т. и соавт., 2002; Маммаев С.Н. и соавт., 2002; Приймаги Л.С. и соавт., 2003].

Большой интерес, на наш взгляд, представляют полученные в ходе иммуногенетического исследования данные по распределению частот аллельных вариантов полиморфизма T-330G гена ИЛ2 среди больных хроническим вирусным гепатитом. Так, установлено превышение частоты аллельного варианта T-330G

гена IL2 среди пациентов с хроническим вирусным гепатитом, заключающееся в доминировании гетерозиготного варианта T/G (48,98%) над гомозиготой T/T (44,90%). Степень риска дальнейшего прогрессирования и неблагоприятного исхода хронического вирусного гепатита В и С была положительно ассоциирована с T/G генотипом, в то время как хронического вирусного гепатита В+С – с G/G вариантом полиморфного региона T-330G гена IL2. Примечательно, что генотип G/G промоторного региона T-330G гена IL2 был связан с риском хронизации вирусного гепатита (II и III степень фиброза).

Точечная замена С-590Т обуславливает повышенную по сравнению с аллельным вариантом -590С активность промотора и как результат этого – увеличенную экспрессию IL4 и продукцию интерлейкина [Arai N. et al., 1990; Kanemitsu S. et al., 1999; Пузырев В.П. и соавт., 2002]. Результаты настоящего исследования продемонстрировали положительную ассоциацию T/T генотипа полиморфного участка С-590Т гена IL4, обнаруженного у 17,53% больных, с риском прогрессирования и неблагоприятного исхода хронического вирусного гепатита. Проведенные нами исследования ассоциированности генотипа клеток продуцентов IL-4 с уровнем его спонтанной и индуцированной продукции показали, что генотип С/Т чаще выявляется среди индивидов с высоким уровнем продукции цитокина, что логично укладывается в концепцию о конкурентных отношениях Th1/Th2-зависимых звеньев иммунитета.

Выявлено, что полиморфизм в промоторе гена IL10 имеет прогностическое значение для течения персистентных вирусных инфекций, в частности для гепатита С [Vidigal P.G. et al., 2002; Abbott W.G. et al., 2004]. Показано, что саморазрешающаяся HCV-инфекция связана с -592AA генотипом IL10, персистирующая инфекция – с -1082GG генотипом IL10, а стойкий ответ на интерферонотерапию – с -1082GG генотипом и GCC гаплотипом IL10. Генотип IL10 -1082AA и АТА/АТА и АСС/АСС гомозиготный гаплотип чаще всего встречались у пациентов с быстро развивающимся фиброзом, IL10 -1082 G/C генотип был связан с хронизацией инфекции, а АСС/АТА генотип – с длительной персистенцией HCV [Vidigal P.G. et al., 2002; Barrett S. et al., 2003; Knapp S. et al., 2003; Авдошина В.В., Коненков В.И., 2004]. Следует отметить, что среди больных хроническим вирусным гепатитом нами было выявлено преобладание гетерозиготного варианта С/А полиморфного региона гена IL10 в участке С-592А (97,09%), положительно связанного с риском дальнейшего прогрессирования и неблагоприятного исхода заболевания (OR = 9,91). Обращало на себя внимание отсутствие среди больных хроническим вирусным гепатитом лиц с гомозиготным генотипом по аллелю С.

Бесспорно, что ключевую роль в механизмах развития хронической персистенции вирусов играет генетически детерминированное состояние иммунной системы. Многочисленными исследованиями последних лет установлено, что структурные особенности белковых продуктов полиморфных генов цитокинов

ведут к различному качеству иммунного ответа, а также к различным течению и исходу инфекции.

Лимфоциты, активированные связыванием антигена, вступают в цикл клеточного деления. Они экспрессируют новые рецепторы, позволяющие им реагировать на секретируемые другими клетками цитокины, которые служат сигналами к пролиферации, дифференцировке в клетки памяти и плазматические клетки, способные вновь активироваться при повторной встрече с антигеном [Антонова Т.В. и соавт., 1999; Фрейдлин И.С., 2001; Рязанцева Н.В. и соавт., 2003]. Взаимодействуя со специфическими рецепторами поверхности лимфоцитов и активируя клетки, митоген или антиген способен индуцировать каскад биохимических изменений, определяющих дальнейшую морфофункциональную эволюцию и приводящих лимфоциты к митозу [Козинец Г.И. и соавт., 2002; Phatak P.D. et al., 1998].

Для уточнения представлений о функциональных свойствах лимфоцитарных клеток нами была проведена оценка способности лимфоцитов к бласттрансформации при индукции митогеном ФГА. В отличие от специфического воздействия антигенов ФГА неспецифически стимулирует лимфоциты к бласттрансформации. При взаимодействии с ФГА лимфоциты увеличиваются в размерах, в них усиливается синтез ДНК, РНК и белка, появляются многочисленные митозы [Козинец Г.И., 1997].

Как показало проведенное нами исследование, у пациентов с хроническим вирусным гепатитом В, С и В+С, хроническим носительством вируса клещевого энцефалита и хронической герпетической инфекцией пролиферативный потенциал лимфоцитов периферической крови оказался достоверно выше, чем у здоровых доноров [Наследникова И.О. и соавт., 2004].

Известно, что уровень пролиферации лимфоцитов при ФГА-стимуляции в определенной степени отражает активность иммунного ответа организма на действие вируса, т.е. эффективность иммунной защиты [Дергунова Н.Н. и соавт., 2003]. Так, ранее проведенное в нашей лаборатории исследование функциональной активности лимфоцитов при персистенции вируса Эпштейна-Барр (EBV) у детей показало, что в острый период инфекции (инфекционный мононуклеоз) ФГА-стимулированный пролиферативный потенциал лимфоцитарных клеток был снижен, однако через месяц после инфицирования он нормализовался [Уразова О.И. и соавт., 2002; Новицкий В.В. и соавт., 2003].

Длительная персистенция вируса – своеобразный способ его сосуществования с клетками макроорганизма, выработанный в ходе продолжительной коэволюции. В вирусинфицированных иммунокомпетентных клетках способны развиваться не только патологические процессы, направленные на деградацию и разрушение, но и реакции адаптации, обуславливающие выживание клеток, содержащих вирусные частицы [Авцын А.П., Шахламов В.А., 1979; Phatak A. et al., 1998].

Постоянная антигенная стимуляция при длительной персистенции вирусов несомненно приводит к активации лимфоцитов, сопровождающейся изменением их метаболической активности. Кинетика иммунного ответа характеризуется серией взаимодействий и сменой взаимосвязей различных клеточных систем, в том числе системы внутриклеточных лимфоцитарных энзимов и субстратов, осуществляющих и регулирующих эффекторную фазу иммунного ответа [Гольпяпин Д.В., 1998; Почтарь М.Е. и соавт., 2003]. Таким образом, в условиях длительной персистенции вирусов лимфоциты, как центральное звено иммунной системы, обеспечивая реализацию иммунного ответа, характеризуются изменением метаболической активности.

Осуществление лимфоцитами сложных и многообразных функций возможно благодаря структурным особенностям и высокой активности метаболических процессов, обеспечивающих клетку энергией и пластическим материалом [Хейхоу Дж., Кваглино Д., 1983; Гольпяпин Д.Б., 1998]. Вирусные агенты, действуя как модуляторы функциональной активности лимфоцитов, прежде всего изменяют метаболизм клетки, переключая субстратный поток с одного метаболического пути на другой, влияя на энергетический потенциал клетки и синтетические процессы. Именно в клетке начинается формирование ответных реакций на внешнее воздействие, позволяющее составить представление об иммунной стратегии, избранной организмом [Хейхоу Дж., Кваглино Д., 1983; Новицкий В.В. и соавт., 2003].

Проведенное нами цитохимическое исследование лимфоцитарных клеток у пациентов с длительной персистенцией вирусов гепатита В и С, клещевого энцефалита и простого герпеса позволило зарегистрировать изменение метаболизма лимфоцитов периферической крови. У всех обследованных нами пациентов отмечалось увеличение содержания липидов в лимфоцитах, обусловленное, вероятнее всего, механизмами восполнения энергопродукции клетки [Гольпяпин Д.Б., 1998]. Проведенное нами ранее цитохимическое исследование лимфоцитов периферической крови у детей с длительной персистенцией EBV выявило аналогичные изменения. Характерное для развернутой клинико-гематологической картины инфекции (инфекционный мононуклеоз) увеличение содержания липидов в лимфоцитарных клетках периферической крови сохранялось и в отдаленный период после инфицирования [Уразова О.И. и соавт., 2001].

Вместе с тем установлено, что многие инфекционные заболевания сопровождаются изменениями метаболизма липидов в клетках [Хейхоу Дж., Кваглино Д., 1983; Гольпяпин Д.Б., 1998; Новицкий В.В. и соавт., 2001]. Известно, что при активации лимфоцитов в результате их взаимодействия с вирусными антигенами усиливается интенсивность клеточного метаболизма. Обнаруженное нами увеличение содержания липидов связано, по всей видимости, с повышением скорости их синтеза в активированных клетках вследствие увеличения энергетических нужд, необходимых для осуществления метаболических и пластиче-

ских реакций лимфоцитов [Робинсон М.В. и соавт., 1986; Гольтяпин Д.Б., 1998; Почтарь М.Е. и соавт., 2003].

У пациентов с хроническим вирусным гепатитом, хронической антигенемией вируса клещевого энцефалита и хронической герпетической инфекцией активность неспецифической эстеразы в лимфоцитах также была значительно увеличена. С одной стороны, усиление активности неспецифической эстеразы, являющейся гидролитическим лизосомальным ферментом, могло быть связано, на наш взгляд, с непосредственным влиянием вируса на активность метаболических процессов, происходящих в клетке. Повышение активности неспецифической эстеразы, обеспечивающей реакции кислого гидролиза биополимеров, процессы молекулярного обновления клетки, участие в реакциях клеточного иммунитета могут быть результатом внутриклеточной перестройки, вызванной влиянием вирусов на метаболическую активность инфицированных клеток [Гольтяпин Д.Б., 1998]. С другой стороны, поскольку фермент локализован в лизосомах и очень мелких гранулах цитоплазмы, увеличение их числа, необходимое для реализации протеолитических реакций, могло оказаться причиной повышения активности неспецифической эстеразы в клетках. Являясь маркером лимфоцитарной популяции, неспецифическая эстераза катализирует разрушение различных метаболитов и антигенов в клетке, принимает участие в обеспечении киллерной функции Т-клеток и метаболизме белков [Хейхоу Дж., Кваглино Д., 1983; Почтарь М.Е. и соавт., 2003].

Возможно, что именно увеличением числа лизосом объясняется и повышение активности другого лизосомального фермента – кислой фосфатазы, выявленное у больных хроническим вирусным гепатитом В+С слабовыраженной степени активности ($1,78 \pm 0,14$ усл. ед. при $1,14 \pm 0,04$ усл. ед. у здоровых лиц, $p < 0,01$), у пациентов с хроническим вирусным гепатитом В умеренной степени активности ($1,39 \pm 0,09$ усл. ед., $p < 0,05$) и при хронической герпетической инфекции в стадии ремиссии ($1,77 \pm 0,08$ усл. ед., $p < 0,001$).

Известно, что стимулом к повышению активности кислой фосфатазы является иммунологическая и митогенная активация. Наиболее выраженное увеличение активности этого фермента в лимфоцитах обусловлено в первую очередь активацией В-лимфоцитов в направлении образования плазматических клеток [Хейхоу Дж., Кваглино Д., 1983]. В то же время, по данным ряда авторов, активность кислой фосфатазы, являющейся цитохимическим маркером зрелости циркулирующих Т-лимфоцитов, положительно коррелирует с количеством лимфоцитов, обладающих хелперной активностью [Блиндарь В.Н. и соавт., 1993; Шиффман Ф.Дж., 2000]. Неспецифическая эстераза маркирует в Т-хелперах структуры, содержащие лимфокины, необходимые при взаимодействии Т-хелперов и В-лимфоцитов [Гольтяпин Д.Б., 2003]. Кроме того, высокая активность неспецифической эстеразы в лимфоцитах регистрируется при хронических диффузных поражениях печени, достигая максимума в фазу репликации

HBV-инфекции, что подтверждает полученные нами данные об увеличении активности этого фермента при хроническом вирусном гепатите [Новицкий В.В. и соавт., 2003].

Неспецифической эстеразе и кислой фосфатазе отводят важное место в реализации саногенеза. Энзимы, как признанные маркеры лизосом, играют важную роль в реакциях бласттрансформации лимфоцитов, а также участвуют в образовании метаболитов с цитотоксическими свойствами [Гольцяпин Д.Б., 2003]. Подтверждением сказанному явились результаты проведенного нами корреляционного анализа. Так, повышение активности неспецифической эстеразы было положительно связано с увеличением числа бласттрансформированных лимфоцитарных клеток у пациентов с хроническим вирусным гепатитом В ($r=0,71$, $p<0,01$), с хроническим вирусным гепатитом С ($r=0,92$, $p<0,001$) и хронической антигенемией вируса клещевого энцефалита ($r=0,70$, $p<0,05$). При этом у пациентов с хроническим вирусным гепатитом В ($r=0,77$, $p<0,01$), В+С ($r=0,81$, $p<0,01$) и хронической герпетической инфекцией ($r=0,69$, $p<0,05$) увеличение активности кислой фосфатазы положительно коррелировало с увеличением числа бластных форм лимфоцитов.

Исследование наиболее чувствительных к действию инфекта клеточных структур позволяет вскрыть пути проникновения вируса в клетку, реализации и поддержания вирусного персистирования. Изменения структуры плазматической мембраны, как наиболее подверженной экзогенным воздействиям составляющей клетки, определяются патологическим действием вируса и могут являться причиной функциональной неполноценности клеток [Ровенский Ю.А., 1979; Козинец Г.И., Симоварт Ю.А., 1984; Козинец Г.И. и соавт., 1979, 2002; Новицкий В.В. и соавт., 2003; Рязанцева Н.В. и соавт., 2003; Токарева Н.В., 2004].

В настоящее время исследованию поверхностной архитектоники клеток системы крови уделяется большое внимание, поскольку состояние клеточной поверхности ответственно за развертывание ряда явлений, происходящих в организме как в норме, так и при патологии [Козинец Г.И., Симоварт Ю., 1984; Козинец Г.И. и соавт., 1997, 2002; Новицкий В.В. и соавт., 2003]. Установлена важная модифицирующая роль мембраны в процессах связывания лимфоцитов с различного рода антигенами (в том числе и вирусными), взаимодействия Т-, В-клеток и макрофагов в динамике формирования иммунного ответа [De Harven E. et al., 1973; Polliack A. et al., 1973; Бабий И.Л., 1984; Козинец Г.И. и соавт., 2002, 2004].

Используя имеющиеся в настоящее время классификации [Ровенский Ю.А., 1979; Козинец Г.И., Симоварт Ю.А., 1984; Козинец Г.И. и соавт., 2004], мы идентифицировали следующие виды лимфоцитов: относительно гладкие клетки с правильной, округлой формой; ворсинчатые клетки с большим количеством разных по длине нитевидных отростков; лимфоциты с пузырями, имею-

щие на поверхности сферической формы выпячивания; лимфоцитарные клетки с углублениями в виде «оврагов» и «щелей»; ламеллярные лимфоциты с пластинчатыми выростами в виде «оборок» и «вуалей», приподнятых над поверхностью; лимфоциты с выростами неправильной формы на поверхности; лимфоцитарные клетки со складками на поверхности; лимфоциты с комбинированным типом поверхностного микрорельефа (рис. 2).

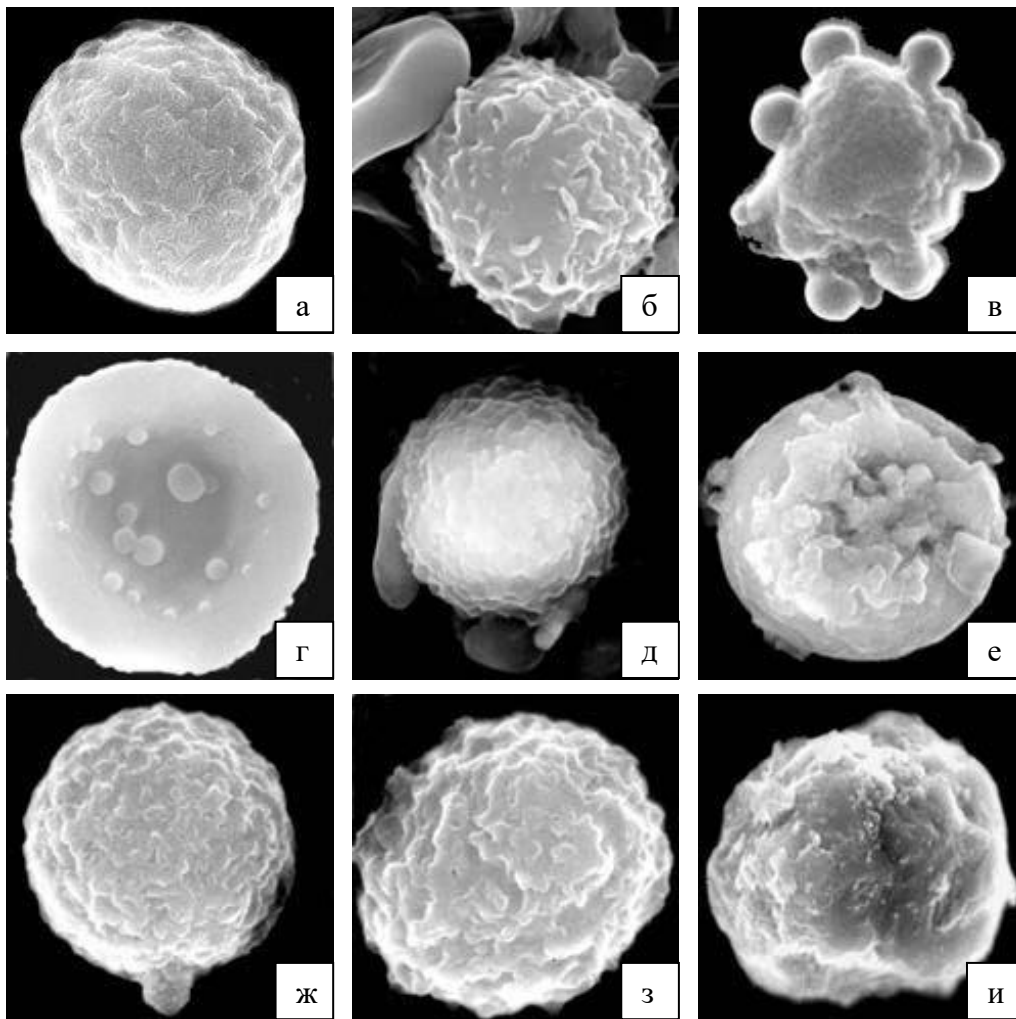


Рис. 2. Морфологические формы лимфоцитов (в соответствии с классификациями, предложенными Г.И. Козинцом и соавт. [1984, 2004] и Ю.А. Ровенским [1979]). Сканирующая электронная микроскопия (а, е, ж – х 8000; б, в, д – х 6000; г, з, и – х 10000)

а – относительно гладкий лимфоцит; б – лимфоцит с микроворсинками; в – лимфоцит со сферическими образованиями; г – лимфоцит с углублениями; д, е – ламеллярные лимфоциты; ж – лимфоцит с выростом; з – складчатый лимфоцит; и – комбинированный лимфоцит

По данным сканирующей электронной микроскопии, у больных хроническим вирусным гепатитом В статистически значимо увеличивалось содержание

складчатых лимфоцитов, а также количество клеток с пузырьками и выростами на поверхности по сравнению с соответствующими показателями у здоровых доноров, однако оказался сниженным уровень гладких лимфоцитарных клеток. Следует отметить появление комбинированных форм лимфоцитов, не обнаруженных у здоровых доноров. Аналогичные изменения распределения лимфоцитов в зависимости от категории морфологических образований на их поверхности были зарегистрированы и у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С и В+С, хроническим носительством вируса клещевого энцефалита и хронической герпетической инфекцией [Наследникова И.О. и соавт., 2005; Новицкий В.В. и соавт., 2005].

Следует также подчеркнуть, что кроме перечисленных выше изменений у больных хроническим вирусным гепатитом В+С было зарегистрировано статистически значимое увеличение содержания лимфоцитов с углублениями и ламеллярным типом поверхностного микрорельефа относительно контроля. Однако у пациентов с хроническим вирусным гепатитом С слабовыраженной степени активности число лимфоцитарных клеток с ламеллярной поверхностью оказалось достоверно ниже, в то время как у лиц с хроническим вирусным гепатитом С умеренной степени активности – выше, чем в норме. Не менее примечательно, что у пациентов с хронической антигенемией вируса клещевого энцефалита без клинической симптоматики число ворсинчатых лимфоцитов было достоверно повышено относительно соответствующих значений исследуемого параметра у здоровых лиц. При этом у лиц с хроническим носительством вируса клещевого энцефалита с клиническими проявлениями нейроинфекции данный показатель, напротив, оказался достоверно ниже, чем в контроле. Кроме того, у пациентов с хронической герпетической инфекцией абсолютное и относительное содержание лимфоцитарных клеток с углублениями на поверхности как в стадии рецидива, так и в фазу ремиссии оказалось значительно выше, чем у здоровых индивидов.

Выявленный полиморфизм лимфоцитарной популяции при персистентных вирусных инфекциях может быть обусловлен, с одной стороны, изменением функциональной активности лимфоцитов [Козинец Г.И., Симоварт Ю., 1984; Робинсон М.В. и соавт., 1986], а с другой – изменением соотношения субпопуляций Т- и В-клеток, а именно снижением числа Т-лимфоцитов, для которых гладкий тип поверхности является дифференциальным признаком [Linthicum D.S. et al., 1974; Крымский Л.Д., 1976; Уразова О.И. и соавт., 2004]. Полагают, что гладкий тип поверхности имеют покоящиеся Т- и В-лимфоциты, а при активации клетки образуют многочисленные выросты [Робинсон М.В., 1986]. В настоящее время известно, что разнообразные ворсинки и выросты на иммунокомпетентных клетках выполняют роль «распознавателей» антигенов, антиген-презентирующих, регуляторных и эффекторных клеток [Крымский Л.Д., 1976; Phatak P.D. et al., 1998].

Было показано, что при трансмембранном проникновении в клетки-мишени оболочечных вирусов, в частности герпесвирусов, имеют место разрушение мембранных липидов клетки и встраивание белков оболочки вируса в состав плазматической мембраны, неизбежно приводящие к изменению ее структурных и физико-химических свойств [Мищенко В.А. и соавт., 1994].

Рассматривая причины увеличения числа лимфоцитов с бульбарными образованиями на поверхности, вполне уместно исходить из предположения о том, что образование этих динамичных структур связано с неконтролируемым поглощением клеткой воды [Козинец Г.И. и соавт., 2002, 2004]. Существует точка зрения, согласно которой в пузырях, равно как в ворсинках, складках и ламеллярных образованиях, может резервироваться «избыточная» клеточная поверхность (до 100 мкм²), способная обеспечить дополнительную поглощающую поверхность [Козинец Г.И., Симоварт Ю.А., 1984]. Вместе с тем известно, что топография поверхности лимфоцитов также может определяться фазой клеточного цикла [Polliak A. et al., 1973; Авцын А.П., Шахламов В.А., 1979]. Кроме того, разнообразный характер типов поверхности лимфоцитарных клеток зависит от степени их дифференцировки [Робинсон М.В. и соавт., 1986; Елисеев В.Г. и соавт., 2004].

При электронно-микроскопической визуализации ультраструктуры лимфоцитов у пациентов с персистентными вирусными инфекциями типовых морфологических изменений строения клеток обнаружено не было. Наиболее часто отмечалось увеличение количества митохондрий и появление эндовезикулярных включений и лизосом в цитоплазме лимфоцитарных клеток (рис. 3).

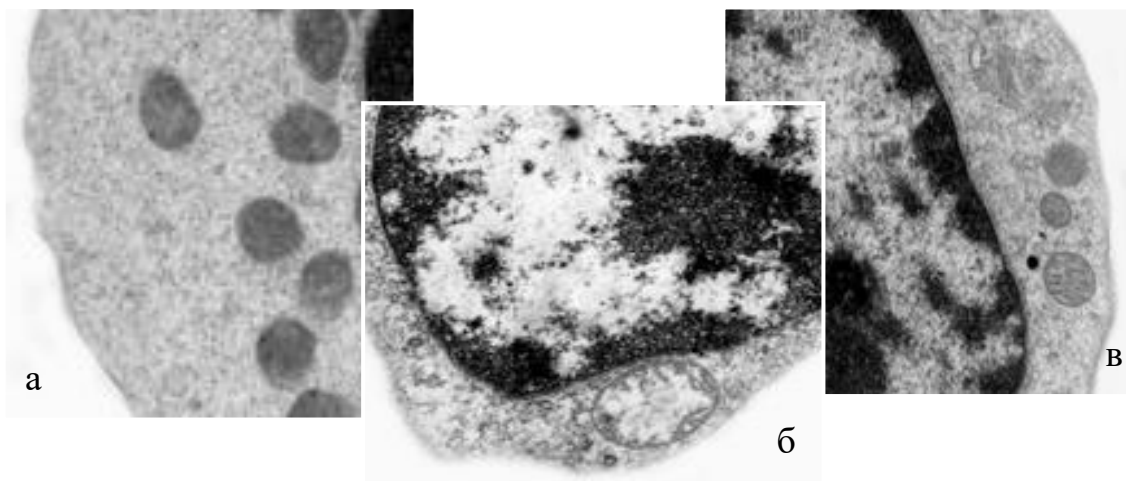


Рис. 3. Электронные микрофотографии лимфоцитов периферической крови пациентов с персистентными вирусными инфекциями. Трансмиссионная электронная микроскопия (а – х24000, б – х16000, в – х18000)

На микрофотографиях представлены наиболее характерные изменения ультраструктуры лимфоцитарных клеток: митохондрии с частично дезорганизованными кристами (а, б, в), эндovesикулярные включения (б, в) и лизосомы (б)

Длительная внутриклеточная персистенция вирусов является не только причиной деградации инфицированных клеток, но и, вероятнее всего, способна обеспечивать системную стимуляцию и поддержание физиологической готовности иммунокомпетентных клеток к отражению вирусной агрессии. При рассмотрении патогенеза персистентных вирусных инфекций вполне закономерно сосредоточиться на исследовании структурных особенностей плазматических мембран задействованных в патологическом процессе клеточных систем, прежде всего клеток иммунной системы. Известно, что функциональная способность лимфоцитарных клеток во многом определяется характером взаимодействия множества рецепторов с лигандами, что, в свою очередь, зависит от физико-химических свойств плазматической мембраны лимфоцитов [Игнатъева Г.А., 1997; Фрейдлин И.С., 1998].

Неопрровержимым считается тот факт, что нормальное функционирование плазматической мембраны зависит от ее микровязкостных свойств [Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е., 1980; Болдырев А.А., 1990; Геннис Р., 1997]. Поддержание текучести мембраны на физиологическом оптимальном уровне необходимо для осуществления латеральной диффузии белковых и липидных молекул, транс-мембранного флип-флоп-переноса липидов [Конев С.В., 1987].

При вирусных инфекциях происходят существенные изменения структурных и физико-химических свойств плазматических мембран иммунокомпетентных клеток [Мищенко В.А. и соавт., 1994]. В результате флуоресцентного зондирования плазматической мембраны лимфоцитарных клеток липотропным зондом пирен были получены фактические данные, подтверждающие наличие выраженной дезорганизации липидной фазы мембраны лимфоцитов у больных с хроническим вирусным гепатитом и хронической антигенемией вируса клещевого энцефалита [Рязанцева Н.В. и соавт., 2002, 2003].

В частности, проведенное нами спектрофлуориметрическое исследование плазматической мембраны лимфоцитов позволило установить, что у пациентов с хроническим вирусным гепатитом отмечалось достоверное (по сравнению с аналогичными показателями у здоровых доноров) уменьшение параметров флуоресценции I_{470}/I_{370} и I_{470}/I_{390} при длине волны возбуждающего света 285 нм независимо от вида вируса (В, С и микст-инфекция В+С), активности патологического процесса и стадии хронизации инфекции. Отмеченное нами у больных хроническим вирусным гепатитом снижение указанных параметров свидетельствовало о повышении микровязкости и/или снижении гидрофобного объема зоны белок-липидных контактов [Добрецов Г.Е., 1980]. Исследование спектральных характеристик взаимодействия липотропного зонда пирен с плазматической

мембраной лимфоцитов у пациентов с хроническим носительством вируса клещевого энцефалита без клинических проявлений ($1,12 \pm 0,02$ и $1,13 \pm 0,02$ усл. ед. при $1,37 \pm 0,02$ и $1,40 \pm 0,01$ у здоровых доноров, $p < 0,001$) и с клинической симптоматикой нейроинфекции ($1,21 \pm 0,02$ и $1,24 \pm 0,01$ усл. ед., $p < 0,001$) выявило аналогичный характер изменений параметров флуоресценции зонда, что и при хроническом вирусном гепатите.

Повышение микровязкости плазматической мембраны лимфоцитов может приводить к снижению активности мембраносвязанных ферментов, торможению связывания рецепторов со вторичными мессенджерами и лигандами, нарушению функциональных свойств клеток. Предполагается, что именно повышение ригидности липидного бислоя мембраны является одной из причин значительного снижения активности многих ферментов и нарушения процессов распознавания вирусных агентов при инфекционном процессе. Однако изменение микровязкостных свойств плазматической мембраны лимфоцитов при вирусных инфекциях, на наш взгляд, неспецифично для иммунокомпетентной клетки. Подтверждением этому явилось обнаружение аналогичных изменений структурных свойств плазматической мембраны эритроцитов, не представляющих собой мишень для вирусов, у больных с хроническим вирусным гепатитом и длительным носительством вируса клещевого энцефалита [Панин Л.Е. и соавт., 2003; Рязанцева Н.В. и соавт., 2003; Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., 2004; Токарева Н.В., 2004].

Таким образом, анализ данных литературы и результаты исследований, проведенных в нашей лаборатории, свидетельствуют об изменении структурно-функциональных и метаболических свойств лимфоцитов периферической крови, являющихся мишенью для повреждающего действия многих вирусных агентов, в ходе развития инфекционного процесса.

Для выявления интегральных параметров структурно-метаболического и функционального статуса лимфоцитов периферической крови при персистентных вирусных инфекциях нами был проведен дискриминантный анализ. Вначале были исследованы дискриминантные функции в четырех группах: здоровые доноры, больные хроническим вирусным гепатитом, пациенты с хроническим носительством вируса клещевого энцефалита и пациенты с хронической герпетической инфекцией.

Выявленные нами наиболее информативные признаки на основании статистической значимости были включены в канонические оси. Переклассификация наблюдений с использованием канонических осей дала согласованность между фактической принадлежностью к той или иной группе и предсказанной во всех 100% случаев. Следующим этапом дискриминантного анализа являлось сравнение изученных параметров в группах здоровых доноров, больных хроническим вирусным гепатитом, пациентов с хроническим носительством вируса клещевого энцефалита и хронической герпетической инфекцией.

Использование дискриминантного анализа позволило выделить следующие информативные переменные: количество CD3+, CD4+, CD56+ и CD95+ клеток, иммунорегуляторный индекс (CD4+/CD8+), число бластных форм клеток в тесте бласттрансформации лимфоцитов, уровень продукции IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 и IL-12, содержание гладких, складчатых, бульбарных и комбинированных лимфоцитов, а также коэффициент флуоресценции I₄₇₀/I₃₇₀ при $\lambda=285$ нм. Полученные результаты указывают на общность изменений структурно-метаболического и функционального статуса лимфоцитов периферической крови при персистентных вирусных инфекциях различного генеза (хронический вирусный гепатит В и С, хроническая антигенемия вируса клещевого энцефалита, хроническая герпетическая инфекция).

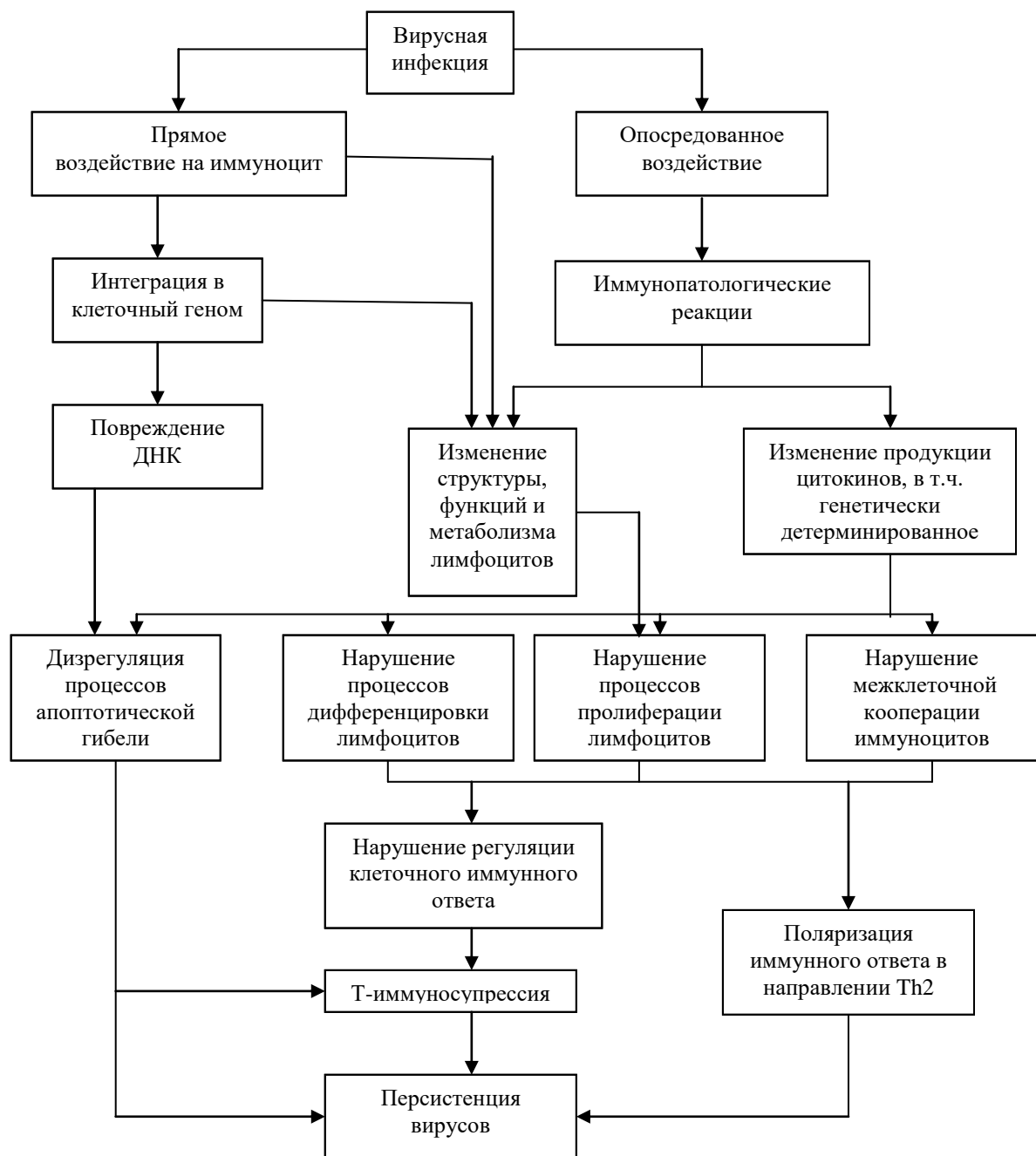


Рис. 4. Схема иммунопатогенеза персистентных вирусных инфекций

Особенности патогенеза и исход длительного, иногда пожизненного, присутствия чужеродного генетического объекта в зараженной клетке обусловлены сложным характером взаимодействия вируса с его молекулярно-генетическими и функциональными свойствами, с одной стороны, и клеток иммунной системы пациента с ее индивидуальными иммуногенетическими особенностями, – с другой (рис. 4).

В настоящее время поиск молекулярных детерминант длительной персистенции вирусов связан с изучением процессов межклеточной кооперации иммунокомпетентных клеток, опосредованной цитокинами. Ключом к разгадке феномена персистенции вирусов в организме человека, по мнению современных исследователей, служит баланс влияний Th1 и Th2 типов, особенно на ранних стадиях заболевания. Одним из свойств вирусов, выработавшихся в результате коэволюции, как раз и является способность модулировать иммунный ответ в пользу реакций Th2 типа во время ранней фазы заболевания и склонять течение инфекции в сторону хронизации, чем, вероятно, и объясняется феномен длительной персистенции. Выраженный дисбаланс кооперативного взаимодействия иммуноцитов, а также преимущественная активация продукции цитокинов Th2 типа чревата формированием непротективного иммунного ответа и отчасти объясняют развитие инфекции по хроническому типу. Гиперпродукция цитокинов Th2 пути, в свою очередь, свидетельствует о высокой степени адаптации вирусов к действию иммунной системы макроорганизма.

Учитывая важную роль генетически детерминированной перестройки цитокиновой сети, а также принимая во внимание значение структурно-метаболических и функциональных изменений лимфоцитов в генезе дисбаланса иммунологического равновесия при персистентных вирусных инфекциях, считаем очевидным, что дальнейшее углубленное вскрытие механизмов иммунопатогенеза длительной вирусной персистенции позволит расширить поиск потенциальных маркеров восприимчивости, тяжести течения и клинических особенностей инфекции, а также станет основой для создания современных способов предупреждения и коррекции иммунопатологических расстройств.

ВЫВОДЫ

1. Изменения реагирования системы иммунитета при длительной персистенции вирусов гепатита В и С, клещевого энцефалита, простого герпеса являются однонаправленными и характеризуются угнетением антигенспецифическо-

го звена иммунного ответа, дисбалансом кооперативного взаимодействия иммуноцитов, дизрегуляцией процессов пролиферации и дифференцировки иммунокомпетентных клеток, нарушением структурно-метаболических и функциональных свойств лимфоцитов периферической крови.

2. Механизмы нарушения межклеточной кооперации иммунокомпетентных клеток при персистентных вирусных инфекциях (хронический вирусный гепатит В, С и В+С, хроническая антигенемия вируса клещевого энцефалита, хроническая герпетическая инфекция) обусловлены выраженным дисбалансом продукции иммунорегуляторных провоспалительных (IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-12) и противовоспалительных (IL-4, IL-6, IL-10) цитокинов.

3. Фактором, способствующим длительной персистенции вирусов гепатита В и С, клещевого энцефалита и простого герпеса, является поляризация иммунного ответа в направлении Th2, обусловленная увеличением продукции мононуклеарами крови IL-4, IL-6 и угнетением секреции TNF- α , IL-2, IL-12. У пациентов с хроническим вирусным гепатитом В, С и В+С продукция IL-10 мононуклеарными лейкоцитами периферической крови повышена. Персистентные вирусные инфекции сопровождаются гиперпродукцией IFN- γ мононуклеарами крови.

4. У пациентов с длительной персистенцией вирусов гепатита В и С, клещевого энцефалита и простого герпеса развивается дисбаланс дифференцировки и пролиферации иммуноцитов антигенспецифического звена системы иммунитета, проявляющийся снижением относительного количества CD3⁺, CD4⁺-клеток и иммунорегуляторного индекса (CD4⁺/CD8⁺), и усиление пролиферативной активности лимфоцитов. При персистентных вирусных инфекциях повышено содержание CD95⁺-экспрессирующих лимфоцитов.

5. Персистентные вирусные инфекции сопровождаются дезорганизацией поверхностной архитектоники (повышение количества лимфоцитов со складками, бульбарными образованиями и выростами на поверхности, появление клеток с комбинированной поверхностью на фоне снижения числа гладких лимфоцитов), структурной модификацией липидной фазы плазматической мембраны лимфоцитов в области белок-липидных контактов и изменением метаболизма (увеличение содержания липидов и активности неспецифической эстеразы) лимфоцитарных клеток периферической крови.

6. Иммуногенетическим фактором, обладающим протективным эффектом в отношении длительной персистенции вирусов гепатита В и С среди лиц европеоидной популяции, является генотип С/С промоторного региона С-592А гена IL10. Степень риска прогрессирования и хронизации вирусных гепатитов ассоциирована с аллелями промоторных регионов -330G гена IL2 и -592А гена IL10, а также с Т/Т генотипом полиморфного участка С-590Т гена IL4.

7. Общая направленность иммунопатологических расстройств при персистентных вирусных инфекциях, характеризующихся стертым клиническим течением.

нием (хронический вирусный гепатит В, С, В+С, хроническая антигенемия вируса клещевого энцефалита, хроническая герпетическая инфекция), не определяется таксономической принадлежностью возбудителя инфекции.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Апоптотическая реакция лимфоидных клеток при инфекционном мононуклеозе // Бюллетень СО РАМН. – 2001. – № 3. – С. 100–102. (в соавт. с Новицким В.В., Уразовой О.И., Помогаевой А.П., Литвиновой Л.С., Козич О.А., Иванчуком И.И.).
2. Особенности течения у детей инфекции, вызванной вирусом Эпштейна-Барр // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2001. – № 4. – С. 57–58. (в соавт. с Уразовой О.И., Помогаевой А.П., Новицким В.В., Катанаровой Л.Л., Литвиновой Л.С.).
3. Структурно-метаболический статус мононуклеаров периферической крови при инфекционном мононуклеозе // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2001. – № 5. – С. 571–573. (в соавт. с Новицким В.В., Уразовой О.И., Помогаевой А.П., Горбачевой А.В.).
4. Морфология апоптоза лимфоидных клеток при инфекционном мононуклеозе // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2001. – Приложение 1. – С. 69–71. (в соавт. с Новицким В.В., Уразовой О.И., Помогаевой А.П., Карповой М.Р., Литвиновой Л.С., Андреевым А.Н.).
5. Функциональная активность моноцитов периферической крови при инфекционном мононуклеозе и мононуклеозоподобном синдроме // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2001. – Приложение 3. – С. 62–64. (в соавт. с Новицким В.В., Уразовой О.И., Помогаевой А.П., Ширшовой Е.В.).
6. Содержание нуклеиновых кислот в лимфоцитах периферической крови при инфекционном мононуклеозе // Клиническая лабораторная диагностика. – 2002. – № 1. – С. 43–44. (в соавт. с Новицким В.В., Уразовой О.И., Помогаевой А.П., Шевцовой Н.М.).
7. Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови при инфекционном мононуклеозе у детей // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 2002 – № 7. – С. 66–68. (в соавт. с Новицким В.В., Уразовой О.И., Помогаевой А.П., Сюсиной Л.В.).
8. Пролиферативная активность лимфоцитов периферической крови при инфекционном мононуклеозе у детей // Клиническая лабораторная диагностика. – 2002. – № 12. – С. 34–36. (в соавт. с Уразовой О.И., Новицким В.В., Помогаевой А.П., Литвиновой Л.С., Николаенко С.В.).
9. Активность дегидрогеназ мононуклеаров периферической крови при инфекционном мононуклеозе у детей // Клиническая лабораторная диагностика. –

2003. – № 1. – С. 17–19. (в соавт. с Новицким В.В., Уразовой О.И., Помогаевой А.П., Комаса Ю.В.).
10. Хронический гепатит В: структура, метаболизм и цитогенетические особенности // Экспериментальна і клінічна медицина. – 2003. – № 2. – С. 64–67. (в соавт. с Новицким В.В., Рязанцевой Н.В., Токаревой Н.В., Жуковой О.Б., Антошиной М.А., Белоконь В.В., Миноченко Ю.В., Томсон Ю.В., Комаровой Т.С., Чечиной О.Е., Чернецкой Н.Н.).
11. Биофизические особенности мембраны эритроцитов при хроническом носительстве вируса клещевого энцефалита // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2003. – № 2. – Специальный выпуск: «Материалы Пироговской студенческой научной конференции». – М., 2003. – С. 227–228. (в соавт. с Токаревой Н.В., Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Жуковой О.Б.).
12. ДНК-репарационная активность лимфоцитов периферической крови при хронической персистенции вируса гепатита С // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2003. – № 2. – Специальный выпуск: «Материалы Пироговской студенческой научной конференции». – М., 2003. – С. 167. (в соавт. с Жуковой О.Б., Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Токаревой Н.В.).
13. Структурно-функциональные особенности плазматической мембраны лимфоцитов и эритроцитов при вирусных инфекциях // Сибирский медицинский журнал. – 2003. – № 3. – С. 34–38. (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Паниным Л.Е., Токаревой Н.В., Новицким В.В., Жуковой О.Б., Антошиной М.А., Белоконь В.В.).
14. Цитогенетика лимфоцитов периферической крови у пациентов с персистенцией вируса клещевого энцефалита // Бюллетень СО РАМН. – 2003. – № 4. – С. 32–36. (в соавт. с Новицким В.В., Жуковой О.Б., Рязанцевой Н.В., Лепехиным А.В., Пироговой Н.П., Михайловой О.В., Плотниковой Н.Н., Токаревой Н.В., Хлаповым А.П.).
15. Структура, метаболизм и функциональные особенности лимфоцитов периферической крови при длительной персистенции вируса Эпштейна-Барр // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2003. – № 10. – С. 390–393. (в соавт. с Новицким В.В., Уразовой О.И.).
16. Структурные особенности плазматической мембраны лимфоцитов при хроническом гепатите С // Успехи современного естествознания. – 2003. – № 10. – С. 100–101. (в соавт. с Токаревой Н.В., Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Жуковой О.Б., Антошиной М.А., Белоконь В.В., Чернецкой Н.Н.).
17. Изменение микровязкости плазматической мембраны лимфоцитов при вирусном гепатите В // Успехи современного естествознания. – 2003. – № 11. – С. 89. (в соавт. с Токаревой Н.В., Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Антошиной М.А., Миноченко Ю.В.).

18. Хронический вирусный гепатит С: структурно-метаболический и цитогенетический статус лимфоцитов // VI Российский съезд врачей-инфекционистов (Санкт-Петербург, 29–31 октября 2003 г.). – СПб., 2003. – С. 268–269. (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Токаревой Н.В., Жуковой О.Б., Антошиной М.А., Белоконь В.В., Миноченко Ю.В., Чечиной О.Е.).
19. Поверхностный электрический заряд мембраны эритроцитов при хроническом вирусном гепатите // VI Российский съезд врачей-инфекционистов (Санкт-Петербург, 29–31 октября 2003 г.). – СПб., 2003. – С. 381. (в соавт. с Токаревой Н.В., Рязанцевой Н.В., Жуковой О.Б., Антошиной М.А., Белоконь В.В., Миноченко Ю.В., Чечиной О.Е.).
20. Иммунофенотипические особенности лимфоцитов при длительной вирусной персистенции // Паллиативная медицина и реабилитация. – 2004. – № 2. – С. 29–30. (в соавт. с Жуковой О.Б., Рязанцевой Н.В., Мельниковой А.П., Чечиной О.Е., Миноченко Ю.В., Михеевым С.Л., Литваком М.М., Ермолаевой Е.С.).
21. Хронические вирусные гепатиты – актуальная проблема медико-социального значения // Актуальные проблемы биологии, медицины и экологии. – Томск, 2004. – № 2. – С. 347. (в соавт. с Мельниковой А.П., Жуковой О.Б., Рязанцевой Н.В., Миноченко Ю.В., Насыровой Р.Ф., Чечиной О.Е., Белоконь В.В., Антошиной М.А.).
22. Хронический вирусный гепатит С: продукция фактора некроза опухолей альфа и его растворимого рецептора мононуклеарными лейкоцитами // Сибирский журнал гастроэнтерологии и гепатологии. – 2004. – № 3. – С. 55–56. (в соавт. с Зима А.П., Белобородовой Е.В., Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Белобородовой Э.И.).
23. Поверхностная архитектоника, функциональные особенности и метаболизм лимфоцитов периферической крови при хронической герпесвирусной инфекции // Клиническая лабораторная диагностика. – 2004. – № 5. – С. 53–55. (в соавт. с Новицким В.В., Рязанцевой Н.В., Антошиной М.А., Антошиной М.А., Белоконь В.В., Черновым А.С., Решетниковым В.И., Шевцовой Н.М., Миллером А.А., Степовой Е.А.).
24. Цитокины при хронических вирусных гепатитах // Материалы IV съезда Научного общества гастроэнтерологов России (Москва, 11–12 февраля 2004 г.). – М., 2004. – С. 79. (в соавт. с Новицким В.В., Белобородовой Е.В., Белобородовой Э.И., Рязанцевой Н.В., Черногорюком Г.Э.).
25. Изменение апоптотического потенциала лимфоцитов крови при хронических гепатитах В и С // Материалы IV съезда Научного общества гастроэнтерологов России (Москва 11–12 февраля 2004 г.). – М., 2004. – С. 91. (в соавт. с Жуковой О.Б., Чечиной О.Е., Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Михеевым С.Л., Антошиной М.А., Хлаповым А.П., Литваком М.М.).
26. Цитокинпродуцирующая способность мононуклеаров при хронических вирусных гепатитах В и С // Материалы II Всемирного конгресса по аллерголо-

- гии и иммунологии (Москва, 14-17 мая 2004 г.). – М., 2004. – С. 127. (в соавт. с Белобородовой Е.В., Белобородовой Э.И., Рязанцевой Н.В., Черногорюком Г.Э.).
27. Патологическая иммунология при хронических вирусных гепатитах // Материалы Второй международной конференции «Патологическая иммунология и современная медицина» (Москва, 22–24 апреля 2004 г.). – М., 2004. – С. 154. (в соавт. с Жуковой О.Б., Рязанцевой Н.В., Радзивил Т.Т., Михеевым С.Л., Мельниковой А.П., Чечиной О.Е., Литваком М.М., Ермолаевой Е.С., Токаревой Н.В., Колвалева Н.П., Кулагина И.В.).
28. Функционально-метаболический статус лимфоцитов периферической крови у больных с длительной персистенцией вирусов // Материалы Межгородской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патологической иммунологии» (Санкт-Петербург, 15–16 апреля 2004 г.). – СПб., 2004. – С. 48–50. (в соавт. с Белоконь В.В., Рязанцевой Н.В., Антошиной М.А., Токаревой Н.В., Томсон Ю.В., Миноченко Ю.В., Жуковой О.Б., Мельниковой А.П.).
29. Апоптоз лимфоцитов крови у пациентов с хронической персистенцией вирусов // Материалы межгородской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патологической иммунологии» (Санкт-Петербург, 15–16 апреля 2004 г.). – СПб., 2004. – С. 27–29. (в соавт. с Жуковой О.Б., Рязанцевой Н.В., Чечиной О.Е., Литваком М.М., Михеевым С.Л., Антошиной М.А., Ермолаевой Е.С., Хлаповым А.П., Пигузовой Е.А.).
30. Хроническая герпесвирусная инфекция: иммунофенотипические особенности лимфоцитов // Сборник научных работ «Современные достижения фундаментальных наук в решении актуальных проблем медицины» (Астрахань, 17–18 мая 2004 г.). – Астрахань, 2004. – С. 49–50. (в соавт. с Белоконь В.В., Антошиной М.А., Рязанцевой Н.В., Черновым А.С., Решетниковым В. И., Томсон Ю.В., Миноченко Ю.В., Шперлинг И.А.).
31. Иммунорегуляторные Th1- и Th2-цитокины при хронической инфекции, вызванной вирусами гепатитов В и С // Материалы V Международного конгресса молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 20-21 мая 2004 г.). – Томск, 2004. – С. 86–87. (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Белобородовой Е.В., Белоконь В.В., Антошиной М.А., Томсон Ю.В., Зверевой Е.С., Токаревой Н.В., Жуковой О.Б., Мельниковой А.П.).
32. Проточная цитометрия – современный метод изучения апоптоза иммунокомпетентных клеток крови // Материалы V Международного конгресса молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 20–21 мая 2004 г.). – Томск, 2004. – С. 98. (в соавт. с Чечиной О.Е., Жуковой О.Б., Рязанцевой Н.В., Радзивил Т.Т., Мельниковой А.П., Михеевым С.Л., Литваком М.М., Пигузовой Е.А.).
33. Молекулярно-генетические механизмы дисфункции лимфоцитов крови при хронической вирусной инфекции // Всероссийская конференция «Актуальные

- вопросы гематологии и трансфузиологии» (Санкт-Петербург, 8–10 июня 2004 г.). – СПб., 2004. – С. 204–205. (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Жуковой О.Б., Мельниковой А.П., Степовой Е.А., Байковым А.Н.).
34. Роль программируемой гибели лимфоцитов крови в патогенезе хронических HBV- и HCV-инфекций // Международная конференция «Развитие международного сотрудничества в области изучения инфекционных заболеваний» (Новосибирск, 8–10 сентября 2004 г.). – Новосибирск, 2004. – С. 56. (в соавт. с Жуковой О.Б., Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Радзивил Т.Т., Мельниковой А.П., Чечиной О.Е., Белобородовой Е.В., Михеевым С.Л., Литваком М.М., Ковалевой Н.П., Кулагиной И.В.).
35. Поверхностная архитектура и иммунофенотипические особенности лимфоцитов при хронической антигенемии вируса клещевого энцефалита // Материалы Второй Всероссийской научно-практической конференции «Компенсаторно-приспособительные процессы: фундаментальные, экологические и клинические аспекты» (Новосибирск, 5–7 октября 2004 г.). – Новосибирск, 2004. – С. 3–4. (в соавт. с Антошиной М.А., Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Белоконь В.В., Томсон Ю.В., Зверевой Е.С.).
36. Продукция цитокинов при хронической персистенции вируса клещевого энцефалита // Материалы Второй Всероссийской научно-практической конференции «Компенсаторно-приспособительные процессы: фундаментальные, экологические и клинические аспекты» (Новосибирск, 5–7 октября 2004 г.). – Новосибирск, 2004. – С. 10–11. (в соавт. с Белоконь В.В., Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Антошиной М.А., Миноченко Ю.В., Томсон Ю.В., Зверевой Е.С.).
37. Молекулярно-генетические механизмы хронизации вирусной инфекции // Материалы III Российского конгресса по патофизиологии с международным участием «Дизрегуляторная патология органов и систем (экспериментальная и клиническая патофизиология)» (Москва, 9–12 ноября 2004 г.). – М., 2004. – С.142. (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Жуковой О.Б., Мельниковой А.П., Белобородовой Е.В.).
38. Закономерности изменений цитокинпродуцирующей способности лимфоцитов при хроническом вирусном гепатите // Материалы III Российского конгресса по патофизиологии с международным участием «Дизрегуляторная патология органов и систем (экспериментальная и клиническая патофизиология)» (Москва, 9–12 ноября 2004 г.). – М., 2004. – С.722. (в соавт. с Новицким В.В., Рязанцевой Н.В., Жуковой О.Б., Мельниковой А.П., Белобородовой Е.В., Белоконь В.В., Антошиной М.А., Томсон Ю.В.).
39. Фактор некроза опухолей- α при хронических вирусных гепатитах // Материалы выездного пленума правления Научного общества гастроэнтерологов «Новые горизонты гастроэнтерологии» (Новосибирск, 23–24 ноября 2004 г.). –

- Новосибирск, 2005. – С. 29–30 (в соавт. с Белобородовой Е.В., Белобородовой Э.И., Рязанцевой Н.В., Белоконь В.В., Черногорюком Г.Э., Новицким В.В.).
40. Типовые изменения поверхностной архитектуры лимфоцитов при хронической вирусной инфекции // Цитология. – 2005. – № 2. – С. 136–140. (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Антошиной М.А.).
41. Молекулярные механизмы изменения продукции ФНО- α мононуклеарами крови при хроническом вирусном гепатите С // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2005. – № 2. – С. 191–195. (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Зима А.П., Новицким В.В., Токаревой Н.В., Белобородовой Е.В., Белоконь В.В., Антошиной М.А., Миноченко Ю.В., Томсон Ю.В., Пигузовой Е.А.).
42. Лимфоциты при хроническом вирусном гепатите С: поверхностная архитектура, микровязкость мембраны и функциональная активность // Бюллетень СО РАМН. – 2005. – № 3. – С. 78–82. (в соавт. с Новицким В.В., Рязанцевой Н.В., Токаревой Н.В., Белобородовой Э.И., Дунаевой Л.Е., Белобородовой Е.В., Антошиной М.А., Белоконь В.В., Жуковой О.Б.).
43. Феномен хронической антигенемии вируса клещевого энцефалита: возможные пути патогенеза // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2005. – № 4. – С. 446–450. (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Лепехиным А.В., Антошиной М.А., Белоконь В.В., Томсон Ю.В.).
44. Дизрегуляция клеточного звена иммунитета при хроническом вирусном гепатите // Бюллетень СО РАМН. – 2005. – № 4. – С. 56–59. (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Белобородовой Е.В., Новицким В.В., Белобородовой Э.И., Жуковой О.Б., Зима А.П., Антошиной М.А., Белоконь В.В.).
45. Роль измененной продукции фактора некроза опухоли альфа мононуклеарами крови в механизмах модуляции апоптоза при гепатите С // Медицинская иммунология. – 2005. – № 4. – С. 43–47. (в соавт. с Новицким В.В., Рязанцевой Н.В., Жуковой О.Б., Радзивил Т.Т., Белобородовой Е.В., Зима А.П., Литваком М.М., Михеевым С.Л.).
46. Фактор некроза опухолей альфа при хронических вирусных гепатитах // Материалы VI Всероссийской научно-практической конференции «Вирусные гепатиты – проблема эпидемиологии, диагностики, лечения и профилактики». (Москва, май 2005 г.). – М., 2005. – С. 297. (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Зима А.П., Авдошиной В.В., Белобородовой Е.В.).
47. Изменения продукции иммунорегуляторных цитокинов мононуклеарами крови при хронической герпесвирусной инфекции // Клиническая лабораторная диагностика. – 2005. – № 5. – С. 43–45. (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Новицким В.В., Белоконь В.В., Антошиной М.А., Колобовниковой Ю.В., Черновым А.С., Решетниковым В.И.).
48. Хронический вирусный гепатит С: иммунорегуляторные цитокины и хронизация инфекции // Клиническая медицина. – 2005. – № 9. – С. 40–44. (в соавт. с

Белобородовой Е.В., Рязанцевой Н.В., Белобородовой Э.И., Новицким В.В., Черногорюком Г.Э., Белоконь В.В., Антошиной В.В., Зима А.П.).

49. Молекулярные основы противовирусной стратегии организма. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 2005. – 128 с. (в соавт. с Рязанцевой Н.В., Новицким В.В.).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АлАТ – аланинаминотрансфераза

АсАТ – аспартатаминотрансфераза

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

ФГА – фитогемагглютинин

CD – поверхностный кластер дифференцировки

EBV – вирус Эпштейна-Барр

HBV – вирус гепатита В

HCV – вирус гепатита С

HLA – лейкоцитарные антигены человека

HSV – вирус простого герпеса

IFN - интерферон

IgE, -A, -G, -M – иммуноглобулины соответствующих классов

IL – интерлейкин

MHC – главный комплекс гистосовместимости

NK – натуральные киллеры

Th – Т-хелпер

TBEV – вирус клещевого энцефалита

TCR – Т-клеточный рецептор

TNF- α – фактор некроза опухоли- α

