Молекулярные механизмы нарушения апоптоза лимфоцитов при хронической вирусной инфекции

Жукова О.Б.

Molecular mechanisms of lymphocyte apoptosis injury in chronic viral infection

Zhoukova O.B.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Жукова О.Б.

Проведено исследование программированной гибели лимфоцитов при хронической инфекции, вызванной вирусами клещевого энцефалита, гепатита В и С. Показано, что характер нарушений реализации апоптоза лимфоцитарных клеток определяется молекулярными особенностями возбудителя. При инкубации *in vitro* лимфоцитов с дексаметазоном, этопозидом и в бессывороточной среде гибель клеток по механизму апоптоза усиливается. Основным модуляционным изменениям при вирусной персистенции подвергаются рецепторный и митохондриальный пути проведения апоптогенного сигнала.

Ключевые слова: лимфоцит, хроническая вирусная инфекция, апоптоз, Fas-рецептор, TNF-рецептор, мембранный потенциал митохондрий.

Programmed cell death of lymphocytes in patients with chronic infections induced by tick-borne encephalitis, hepatitis B and C was investigated. The injury character in realization of lymphocyte apoptosis is shown to depend on molecular features of the infectious agent. Apoptotic death of lymphocytes was elevated after their incubation *in vitro* with dexamethazone, etoposide and in the environment without serum. Receptor-dependent and mitochondrial paths of apoptotic signal conduction ways are preferably modulated in chronic virus persistence.

Key words: lymphocyte, chronic viral infection, apoptosis, Fas-receptor, TNF-receptor, mitochondrial membrane potential.

УДК 616.9-002.2:616.155.32-018

Введение

Инфекционные заболевания, вызванные вирусами, способными к длительному (иногда пожизненному) пребыванию в организме, являются актуальной проблемой современной медико-биологической науки. Важность постановки вопросов, касающихся молекулярных аспектов формирования вирусной персистенции, обусловлена как возрастающей частотой хронизации инфекционного процесса, так и возможностью развития опасных осложнений, вызванных реализацией онкогенного потенциала возбудителя. Представители большинства таксономических групп вирусов могут служить причиной развития патологических процессов, при которых репликация инфектогена обеспечивается жизнеспособностью клетки-хозяина. Несмотря на получение новых данных фундаментального характера о механизмах формирования вирусной

персистенции, неразрешенным остается вопрос о причинах, приводящих при разных возбудителях к одному исходу болезни — формированию хронического инфекционного процесса [2, 24].

В современной литературе обсуждается спектр возможных механизмов, посредством которых вирусы способны оказывать воздействие на иммунную систему. Один из них — моделирование программированной гибели иммунокомпетентных клеток. Апоптоз представляет собой процесс физиологической клеточной смерти, при котором происходят изменения во всех структурах клетки: в ядре (межнуклеосомная фрагментация ДНК, конденсация хроматина, кариорексис с последующим образованием апоптотических телец), цитоплазме (расширение эндоплазматического ретикулума, конденсация и уменьшение гранул, снижение трансмембранного потенциала митохондрий и др.), плазматической мембране (повышение проницаемо-

сти для небольших молекул, например пропидиум йодида, утрата ворсинчатости и образование пузырьвидных вздутий, экспрессия на поверхности не обнаруживаемых в норме молекул фосфатидилсерина и др.) [14, 20, 27]. Роль апоптоза значима в уравнивании эффекта клеточной пролиферации, дифференцировки, а также в элиминации функционально неполноценных иммунокомпетентных клеток [1, 5, 8, 17, 20].

При вирусной интервенции активируются защитные силы организма, биологической ролью которых является элиминация вируса и зараженных им клеток. Участие апоптоза в удалении вирусосодержащих клеток имеет важное биологическое значение, поскольку фрагментация ДНК предупреждает перенос генетического материала в другие интактные клетки. Показано, что при вирусных инфекциях сосуществуют факторы, индуцирующие и ингибирующие программированную клеточную смерть [3, 7, 13, 18, 21, 24—26]. В интересах вируса — подавить апоптоз и сохранить жизнеспособность клетки. Таким образом, исход инфекционного процесса связывают с результатом противостояния антиапоптотической способности вирусов и активации физиологической гибели инфицированной клетки как части защитного механизма организма.

Понять, какую роль несет в себе индукция или угнетение программированной клеточной гибели в условиях прогрессирования персистентной вирусной инфекции, возможно, опираясь на знания молекулярных механизмов регуляции апоптоза иммунокомпетентных клеток, что и стало целью настоящего исследования.

Материал и методы

В рамках проведенного исследования анализировались различные параметры апоптоза лимфоцитов периферической крови, полученных от 19 здоровых доноров и 95 пациентов с хронической инфекцией, вызванной вирусами клещевого энцефалита, гепатитов В и С. Верификация диагноза клещевого энцефалита проводилась путем сбора эпидемиологического анамнеза, оценки неврологического статуса, определения уровня специфических антител к антигену вируса методами непрямой реакции гемагглютинации и иммуноферментного анализа, обнаружения вирусной РНК методом полимеразно-цепной реакции (ПЦР). Диагноз вирусного гепатита основывался на наличии

в крови ДНК вируса гепатита В (HBV), РНК вируса гепатита С (HCV) (метод ПЦР), серологических маркеров HBV (Hbe-антиген, HBs-антиген, анти-Hbcor IgM, анти-Hbcor суммарные) и HCV (анти-HCV IgG, C-протеину, неструктурным белкам NS-3, NS-4, NS-5, анти-HCV IgM), а также клинко-лабораторных синдромов холестаза, цитолиза, мезенхимально-воспалительного синдрома, результатах ультразвукового и сцинтиграфического исследований печени. Активность процесса устанавливалась на основании данных морфологического анализа биоптатов печени. Критериями исключения пациентов из исследования являлись алкогольная и наркотическая зависимость, а также воспалительные процессы инфекционной и неинфекционной этиологии. Все пациенты были обследованы

до начала лечения. Материалом исследования являлась венозная кровь обследованных лиц, взятая утром до приема пищи и стабилизированная гепарином (25 ЕД/мл). Объектом исследования служили лимфоциты, выделенные из крови путем центрифугирования на слое «Ficoll-Paque» («Pharmacia», Швеция) плотностью 1,077.

Регистрацию апоптоза лимфоцитов проводили методом, основанным на определении экспрессии фосфатидилсерина с помощью аннексина V, конъюгированного с FITC («Caltag», США) [32]. Лимфоциты периферической крови ($2 \cdot 10^5$ в лунке) культивировали в полной культуральной среде без митогена или с добавлением 10 мкг/мл фитогемагглютинаина (ФГА) («Difco», Германия) в течение 18 ч при температуре 37 °C и 5%-м CO₂. Для изучения чувствительности лимфоцитарных клеток к индукторам апоптоза в отдельные пробы добавляли 10^{-4} моль/мл синтетического глюкокортикоида дексаметазона («KRCA», Словения) или 10^{-6} моль/мл ингибитора топоизомеразы II этопозида («Rhone-Poulenc Roger», Франция) либо проводили культивирование лимфоцитов в бессывороточной среде. После отмывания клетки (10^6 в 1 мл) окрашивали в аннексиновом буфере («Caltag», США), содержащем аннексин V, конъюгированный с FITC. Через 10 мин их подвергали проточной цитофлюориметрии на цитометре «Epics XL» («Beckman Coulter», Франция). Анализировали параметры зеленой (FITC — 530 нм) флюоресценции в гейте лимфоцитарных клеток, выявляемых по показателям малоуглового (FSC) и боко-

вого светорассеяний (SSC), характеризующих размер и гранулярность клетки соответственно.

Содержание лимфоцитов, несущих маркер проапоптотической готовности Fas-рецептор (FasR), оценивали иммуноцитохимическим методом [15] с использованием набора реагентов «Novocastra» (Великобритания). Для выявления специфических антигенов на поверхностной мембране клеток к суспензии выделенных лимфоцитов добавляли раствор моноклональных антител (МКАТ) мыши, специфичных к CD95-рецепторам, и инкубировали 60 мин. Затем препараты трижды отмывали фосфатным буфером (pH = 7,4) и 30 мин инкубировали с биотинилированными связывающими антителами. После трехкратного отмывания фосфатным буфером на препарат на 10 мин наносили стрептавидин, конъюгированный с щелочной фосфатазой, и повторяли отмывание. Затем образцы инкубировали с холодным хромоген-субстратом Fast Red в течение 10 мин. Хромоген смывали дистиллированной водой и докрашивали препараты гематоксилином («Sigma», США). Учет результатов проводили при помощи светового микроскопа с использованием масляной иммерсии, подсчитывая процент положительно окрашенных клеток на 200 лимфоцитов.

Для определения уровня экспрессии рецептора к фактору некроза опухоли- α 1-го типа (TNFRI) использовали цитофлюориметрический метод, основанный на взаимодействии соответствующих МКАТ с мембранным рецептором к TNF- α на лимфоцитах. После культивирования клетки отмывали фосфатно-солевым буфером (pH = 7,2) и окрашивали стандартными МКАТ к рецептору (TNFRI), меченными FITC («Immunotech», Франция) согласно протоколу фирмы-производителя. После 30 мин инкубации анализировали содержание лимфоцитов, флуоресцирующих на FL1-канале (530 нм) проточного цитофлюориметра.

Уровень мембранного потенциала митохондрий клеток определяли с использованием набора реагентов «MitoScreen» («BD Pharmingen», США). В полистериновую пробирку переносили 1 мл суспензии мононуклеарных лейкоцитов, содержащей 10^6 клеток, и центрифугировали при 400g в течение 5 мин при комнатной температуре. К клеточному осадку добавляли 0,5 мл свежеприготовленного (согласно инструкции производителя) раствора флуорохрома JC-1. Клетки ресуспендировали и инкубировали 10—15 мин при

температуре 37 °C. Затем клетки дважды отмывали буфером. Известно, что JC-1 способен существовать в двух различных состояниях: агрегатах и мономерах. JC-1-мономер быстро проникает через митохондриальную мембрану живой клетки, в результате чего внутри митохондрии формируются JC-1-агрегаты, характеризующиеся красным спектральным свечением

($\lambda = 590$ нм), которое может быть измерено на FL-2-канале проточного цитометра. При деполяризации митохондриальной мембраны, являющейся ранним признаком апоптоза, JC-1 не накапливается внутри митохондрии и находится в цитоплазме в виде мономерной формы, которая характеризуется зеленым спектральным свечением ($\lambda = 525$ нм), что измеряется на FL-1-канале.

В окрашенных JC-1 образцах определяли процентное содержание лимфоцитов в гейтах неапоптотических (FL-2-свечение, FL-1-свечение) и апоптотических (FL-1-свечение) клеток.

Полученные данные обрабатывали методами вариационной статистики. Результаты выражали в виде средней выборочной X и ошибки средней m . Достоверность различий средних величин оценивали с помощью непараметрического критерия Манна—Уитни (для независимых выборок). Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В результате оценки реализации программированной клеточной гибели в аннексиновом тесте были установлены изменения апоптотической реакции лимфоцитарных клеток у лиц с длительной персистенцией вирусов. Так, уровень спонтанного апоптоза лимфоцитов при хроническом гепатите В не отличался от аналогичного показателя у здоровых доноров (табл. 1). При персистенции возбудителя гепатита С было зарегистрировано достоверное снижение содержания апоптотических клеток, что, по-видимому, явилось результатом нарушения естественной реализации программированной клеточной гибели. Обнаружено, что длительное пребывание вируса клещевого энцефалита (КЭ) в организме сопровождается повышенным содержанием лимфоцитарных клеток, вступивших в спонтанный апоптоз (табл. 1). Массовая гибель клеток, осуществляющих реализацию противовирусного иммунитета, обуславливает неадекватность иммунного ответа и

формирование хронического течения патологического процесса [20].

Поскольку форма реакции клетки в результате антигенной стимуляции определяет эффективность им-

мунного ответа, то наиболее значимой является оценка активационного апоптоза [5]. Проведенное исследование показало, что уровень апоптоза лимфоцитов,

Таблица 1

Содержание апоптотических лимфоцитов периферической крови у пациентов с хроническими вирусными инфекциями в условиях культивирования *in vitro* с модуляторами апоптоза ($X \pm m$)

Исследуемый параметр лимфоцитов	Здоровые доноры	Количество лимфоцитов, %		
		Пациенты с хроническими инфекциями, вызванными вирусами		
		гепатита В	гепатита С	клещевого энцефалита
Спонтанный апоптоз	11,23 ± 1,02	8,89 ± 1,65 $p > 0,05$	6,32 ± 1,43 $p < 0,05$	21,83 ± 1,67 $p < 0,001$
Модуляция апоптоза <i>in vitro</i> добавлением ФГА	9,14 ± 1,30	16,75 ± 2,99 $p < 0,05$	5,54 ± 0,87 $p < 0,05$	18,54 ± 2,87 $p < 0,01$
лишением ростовых факторов	54,04 ± 4,31	92,50 ± 5,40 $p < 0,001$	90,19 ± 1,53 $p < 0,001$	75,00 ± 2,37 $p < 0,01$
добавлением дексаметазона	53,82 ± 3,47	95,15 ± 4,85 $p < 0,001$	83,30 ± 3,82 $p < 0,001$	91,06 ± 1,81 $p < 0,001$
добавлением этопозида	55,94 ± 4,33	90,35 ± 1,34 $p < 0,001$	89,83 ± 1,07 $p < 0,001$	80,43 ± 3,11 $p < 0,001$

Примечание. p — уровень статистической значимости различий по сравнению с аналогичными показателями у здоровых доноров.

активированных митогеном ФГА, у пациентов с хроническим гепатитом В и КЭ значительно превосходил средние значения аналогичного параметра у здоровых лиц (см. табл. 1). Подобная реакция может быть связана с повышенной чувствительностью лимфоцитарных клеток к апоптогенным факторам в условиях вирусной инфекции. Показано, что НВх-белок вируса гепатита В индуцирует апоптоз чувствительных клеток [22]. Кроме этого, прямым агентом, запускающим Fas-опосредованную гибель, является HBs-антиген [31]. По данным J. Ehrmann и соавт., у HBs-антигенположительных лиц повышена экспрессия проапоптотического белка Вах в гепатоцитах и лимфоцитах [25]. При хроническом гепатите С у пациентов отмечалось уменьшение количества лимфоцитов, вступивших в активационный апоптоз (см. табл. 1), что свидетельствует, по-видимому, о способности данного возбудителя угнетать реализацию программы гибели клетки. Например, антиапоптотическая стратегия вируса гепатита С сводится к подавлению функции белка Р53, инактивации каспаз, а также к усилению экспрессии ингибитора апоптоза Bcl-X_L [27, 28]. Таким образом, на фоне хронической вирусной инфекции апоптотическая реакция иммунокомпетентных клеток претерпевает изменения, направ-

ленность которых определяется молекулярными особенностями возбудителя.

Важным результатом взаимодействия регуляторных факторов с про- и антиапоптотической активностью является способность организма адекватно модулировать процесс гибели своих клеток в неблагоприятных условиях. После инкубации лимфоцитов крови *in vitro* в условиях воздействия различных модуляторов апоптоза (дексаметазон, этопозид, лишение ростовых факторов) характер апоптотической реакции лимфоцитарных клеток претерпевал выраженные изменения. Культивирование лимфоцитов в бессывороточной питательной среде, лишенной ростовых факторов, индуцировало гибель более половины клеток у здоровых доноров и более 75% лимфоцитарных клеток, полученных от пациентов с длительной вирусной персистенцией (см. табл. 1). Известно, что дефицит факторов роста воспринимается клеткой как сигнал к апоптозу: происходят дефосфорилирование проапоптотического белка Bad, внедрение его в наружную мембрану митохондрий, высвобождение цитохрома С и последующая активация каспазы-9 [30].

Значимая роль в регуляции апоптоза отводится гормонам, в частности глюкокортикоидам. Известно, что зрелые лимфоциты нечувствительны к действию глюкокортикоидов [17, 20]. Полученные *in vitro* резуль-

таты демонстрируют повышенную чувствительность зрелых лимфоцитов к проапоптотическому влиянию синтетического гормона дексаметазона, наиболее выраженную при вирусной персистенции (см. табл. 1). Действие глюкокортикоидов опосредовано специфическими внутриклеточными рецепторами, которые регулируют экспрессию большого количества генов, активизируя или подавляя генную транскрипцию. К тому же апоптоз клеток, опосредованный действием глюкокортикоидов, возможно, реализуется через митохондриальный путь в условиях снижения трансмембранного потенциала, поступления цитохрома С в цитозоль и активации каспазы-9 [33].

Индукция апоптоза может реализоваться вследствие возникновения источника сигнала внутри самой клетки. Такая ситуация складывается при накоплении нерепарированных разрывов ДНК в результате снижения активности системы репарации, что было показано ранее [6, 9—11]. Одним из ферментов репарации ДНК является топоизомераза II. Этот белок участвует в формировании структур ДНК высшего порядка — суперспирализованных петель [23]. При добавлении в культуральную среду цитостатического препарата этопозида, обладающего ингибирующей активностью в отношении топоизомеразы II, с последующей инкубацией в ней лимфоцитов крови здоровых лиц и пациентов с хронической вирусной персистенцией отмечалось увеличение численности лимфоцитарных клеток, находящихся на ранних стадиях реализации программы гибели клетки (см. табл. 1). При блокировании топоизомеразы II нарушаются процессы репарации поврежденных участков ДНК, происходит остановка митоза на стадии G₂, что приводит к запуску апоптотических реакций в результате невозможности полноценной транскрипции генов, содержащих дефекты в матрице [23].

Решающую роль в регуляции иммунного ответа играет процесс программированной клеточной гибели, запускаемый через так называемые рецепторы смерти. Они представляют собой трансмембранные гликопротеиды, которые, взаимодействуя со специфическими

лигандами, передают апоптотический сигнал в клетку и вызывают активацию каспаз. Большинство таких рецепторов относятся к семейству рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR) и характеризуются сходными экстрацеллюлярными доменами, богатыми цистеином. Также рецепторы смерти имеют в своей структуре гомологичные цитоплазматические участки, называемые доменами смерти, которые принимают непосредственное участие в запуске апоптоза [16]. Наиболее изученными из смертельных рецепторов являются Fas (CD95 или Apo1) и TNFR1 (CD120a или P55) [1]. Fas способен запускать в клетке апоптоз при взаимодействии с Fas-лигандом (Fas-L), который впервые был выделен из мембранной фракции клеток цитотоксической Т-клеточной гибридомы, способной вызывать гибель Fas-экспрессирующих клеток [29]. По аминокислотной последовательности Fas-L гомологичен TNF-цитокину, давшему название семейству подобных белков. Как и другие члены семейства TNF, Fas-L проявляет свою активность в форме гомотримера. В случае активации Fas-рецептора его тримерный цитоплазматический домен приобретает способность к дальнейшей передаче сигнала на каспазу-8, которая приводит в действие ферментативный каскад активации каспаз [14].

При изучении уровня апоптотической готовности иммунокомпетентных клеток периферической крови было обнаружено повышение содержания TNFR1⁺-лимфоцитов при гепатите В и клещевом энцефалите по сравнению со средним уровнем данных показателей у здоровых доноров (табл. 2). Как известно, в условиях вирусной инфекции TNF-индуцированная гибель клеток может иметь доминирующее значение ввиду антигенной модуляции секреции данного цитокина, обладающего провоспалительным действием и являющегося ключевым регулятором интенсивности иммунного ответа [8]. Результаты ранее проведенных исследований свидетельствовали о снижении способности мононуклеарных лейкоцитов больных хроническими вирусными инфекциями секретировать TNF-α [7, 12].

Таблица 2

Показатели рецепторного и митохондриального путей апоптоза лимфоцитов периферической крови при хронических вирусных инфекциях ($X \pm m$)

Исследуемый параметр	Здоровые доноры	Пациенты с хроническими инфекциями, вызванными вирусами		
		гепатита В	гепатита С	клещевого энцефалита
Содержание Fas ⁺ -лимфоцитов, %	10,83 ± 1,13	10,84 ± 1,14	16,40 ± 1,72	14,43 ± 1,35

Содержание TNFRI ⁺ -лимфоцитов, %	2,58 ± 0,21	$p > 0,05$ 8,61 ± 1,15 $p < 0,05$	$p < 0,05$ 3,73 ± 0,54 $p > 0,05$	$p < 0,05$ 13,58 ± 2,82 $p < 0,001$
Содержание лимфоцитов со сниженным уровнем мембранного потенциала митохондрий, %	5,09 ± 0,84	3,89 ± 0,90 $p > 0,05$	5,05 ± 0,18 $p > 0,05$	34,45 ± 4,01 $p < 0,001$

Примечание. p — уровень статистической значимости различий по сравнению с аналогичными показателями у здоровых доноров.

Наряду с этим было выявлено увеличение количества лимфоцитов, несущих Fas-рецептор, у пациентов с длительной персистенцией вируса гепатита С и клещевого энцефалита (см. табл. 2). Очевидно, что хроническое течение вирусных заболеваний сопровождается нарушением регуляции рецепторзависимого апоптоза иммунокомпетентных клеток. Одним из механизмов изменения чувствительности лимфоцитов к Fas-индуцированному апоптозу на фоне вирусной инфекции является дисбаланс между уровнями экспрессии мембранной и растворимой форм Fas-рецептора и Fas-L, а также дизрегуляция процессов, возникающих после активации данного рецептора [16].

В реализации процесса программированной клеточной гибели ключевую роль играют митохондрии. Они служат мишенью для специализированных про- и антиапоптотических белков семейства Bcl-2, некоторых транскрипционных факторов, низкомолекулярных медиаторов. Основным ответом митохондрии на действие апоптогенных стимулов является падение величины ее мембранного потенциала, что сопровождается высвобождением из межмембранного пространства широкого спектра биологически активных веществ (цитохрома C, апоптозиндуцирующего фактора AIF, прокаспаз-2, -3 и -9), определяющих реализацию гибели клетки [14, 19].

При оценке уровня мембранного потенциала митохондрий $\Delta\psi$ методом проточной цитометрии было выявлено, что длительная персистенция вируса КЭ характеризовалась увеличением содержания лимфоцитов со сниженным уровнем $\Delta\psi$ (см. табл. 2), что свидетельствовало об активации митохондриального пути апоптоза при хронической антигенемии вируса КЭ. Вероятно, это вызвано воздействием на митохондрии активных форм кислорода и азота, усиленно вырабатываемых в результате активации свободнорадикальных реакций, сопровождающей течение инфекционного процесса [4]. Митохондриально-опосредованная реализация программированной гибели лимфоцитов у пациентов с гепатитами В и С оказалась заблокированной (см. табл. 2). Показано, что некоторые вирусы обладают способностью модулировать митохондри-

альный путь апоптоза, изменяя активность белков семейства Bcl-2, контролирующих мембранный потенциал митохондрий. Так, белок E1B-19K аденовируса инактивирует проапоптотические клеточные белки Bak, Bix и Bax, а также ингибирует активацию каспазы-9 и TNF-зависимый путь апоптоза [26]. Сердцевинный протеин вируса гепатита С способен ингибировать апоптоз путем повышения экспрессии Bcl-X_L [28]. Вирус Эпштейна—Барра синтезирует аналог Bcl-2, обладающий антиапоптотической активностью [26].

Заключение

Таким образом, хроническое течение инфекций, вызванных вирусами клещевого энцефалита, гепатитов В и С, сопровождается нарушениями реализации программы клеточной гибели лимфоцитов периферической крови, характер которых определяется молекулярными особенностями возбудителя. В результате воздействия различных индукторов независимо от молекулярного механизма их действия отмечалось увеличение числа лимфоцитарных клеток, вступивших в апоптоз *in vitro*. При этом наиболее выраженные сдвиги проявлялись при исследовании лимфоцитов, полученных у пациентов с хроническими вирусными инфекциями, что, очевидно, свидетельствует о функциональной неполноценности иммунокомпетентных клеток, способствующей поддержанию хронического течения патологического процесса. Основным модуляционным изменениям при вирусной персистенции подвергаются рецепторный и митохондриальный пути проведения апоптогенного сигнала.

Исследование выполнено в рамках федеральной целевой научно-технической программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники на 2002—2006 годы» (государственные контракты № 02.442.11.7004, 02.445.11.7110 и 02.445.11.7419), а также при финансовой поддержке Совета по грантам при Президенте Российской Федерации для поддержки ведущих научных школ Россий-

ской Федерации (№ НШ-1051.2003.4 и НШ-4153.2006.7).

Литература

1. Барышников А.Ю., Шишкин А.В. Иммунологические проблемы апоптоза. М.: Эриториал УРРС, 2002. 320 с.
2. Жукова О.Б., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В. Вирусная персистенция: иммунологические и молекулярно-генетические аспекты патогенеза // Бюл. сиб. медицины. 2003. Т. 2. № 4. С. 12—17.
3. Жукова О.Б., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В. и др. Модуляция апоптоза лимфоцитов крови как способ выживания вируса гепатита С // Иммунология. 2005. Т. 26. № 2. С. 79—83.
4. Маеда Х., Акаике Т. Оксид азота и кислородные радикалы при инфекции, воспалении и раке // Биохимия. 1998. Вып. 63. № 7. С. 1007—1019.
5. Никонова М.Ф., Литвина М.М., Варфоломеева М.И. и др. Апоптоз и пролиферация как альтернативные формы ответа Т-лимфоцитов на стимуляцию // Иммунология. 1999. № 2. С. 20—23.
6. Новицкий В.В., Жукова О.Б., Рязанцева Н.В. и др. Цитогенетика лимфоцитов периферической крови при хронической персистенции вируса клещевого энцефалита // Бюл. СО РАМН. 2003. № 4. С. 34—37.
7. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Жукова О.Б. и др. Роль нарушения продукции фактора некроза опухоли-альфа мононуклеарами крови в механизмах модуляции апоптоза при гепатите С // Мед. иммунология. 2005. Т. 7. № 4. С. 417—420.
8. Потапнев М.П. Апоптоз клеток иммунной системы и его регуляция цитокинами // Иммунология. 2002. № 4. С. 237—243.
9. Рязанцева Н.В., Жукова О.Б., Белобородова Э.И. и др. Изменения цитогенетического статуса лимфоцитов периферической крови при хронических HBV- и HCV-инфекциях // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2004. Т. 14. № 1. С. 37—40.
10. Рязанцева Н.В., Жукова О.Б., Новицкий В.В. и др. Структурные и функциональные особенности лимфоцитов у пациентов с хроническим носительством антигена вируса клещевого энцефалита // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2002. № 11. С. 547—550.
11. Рязанцева Н.В., Жукова О.Б., Новицкий В.В. и др. Активность ДНК-репарационной системы лимфоцитов периферической крови у пациентов с хронической вирусной персистенцией // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2003. Вып. 13. № 6. С. 27—29.
12. Рязанцева Н.В., Наследникова И.О., Зима А.П. и др. Молекулярные механизмы изменения продукции ФНО- α мононуклеарами крови при хроническом вирусном гепатите С // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2005. Т. 139. № 2. С. 191—195.
13. Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Жукова О.Б. и др. Вирусиндуцированная дисрегуляция программируемой гибели иммунокомпетентных клеток: адаптация или патология? // Успехи физиол. наук. 2005. Т. 36. № 3. С. 33—44.
14. Самуилов В.Д., Алескин А.В., Лагунова Е.М. Программированная клеточная гибель // Биохимия. 2000. Вып. 65. № 8. С. 1029—1046.
15. Тотолян А.А., Балдуева И.А., Бубнова Л.Н. и др. Стандартизация методов иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга человека // Клинич. лаб. диагностика. 2002. № 1. С. 44—50.
16. Фильченков А.А., Степанов Ю.М., Липкин В.М., Кушлинский Н.Е. Участие системы Fas/Fas-лиганд в регуляции гомеостаза и функционировании клеток иммунной системы // Аллергология и иммунология. 2002. Т. 3. № 1. С. 24—35.
17. Хаитов Р.М. Физиология иммунной системы. М.: ВИНТИ РАН, 2001. 224 с.
18. Чечина О.Е., Жукова О.Б., Рязанцева Н.В. и др. Вирусиндуцированная модуляция программы апоптотической гибели клетки // Бюл. сиб. медицины. 2005. Т. 4. № 4. С. 78—83.
19. Щепина Л.А., Попова Е.Н., Плетюшкина О.Ю., Черняк Б.В. Апоптоз клеток HeLa и антиапоптотное действие онкобелка Bcl-2 не зависят от дыхания и мембранного потенциала митохондрий // Биохимия. 2002. Вып. 67. № 2. С. 265—270.
20. Ярилин А.А. Апоптоз: природа феномена и его роль в норме и при патологии // Актуальные проблемы патофизиологии. М.: Медицина, 2001. С. 13—56.
21. Ahn J.Y., Jung E.Y., Kwun H.J. Dual effects of hepatitis B virus X protein on the regulation of cell-cycle control depending on the status of cellular p53 // J. Gen. Virol. 2002. V. 83. P. 2765—2772.
22. Chang Z.S., Zeng L.B., Chang C.S., Qing W.W. Aggregate formation of hepatitis B virus X protein affects cell cycle and apoptosis // World J. Gastroenterol. 2003. V. 9. P. 1521—1524.
23. Clifford B., Beljin M., Stark G.R. et al. G2 Arrest in Response to Topoisomerase II Inhibitors. The Role of p53 // Cancer Research. 2003. V. 63. P. 4074—4081.
24. Dbaiho G., Hannun J. Molecule of the month cytokine response modifier: a strategically deployed viral weapon // Clin. Immunol. Immunopathol. 1998. V. 86. P. 134—140.
25. Ehrmann J.Jr., Galuszkova D., Ehrmann J. et al. Apoptosis-related proteins Bcl-2, Bax, Fas, Fas-L and PCNA in liver biopsies of patients with chronic hepatitis B virus infection // Pathol. Oncol. Res. 2000. V. 6. P. 130—135.
26. Hay S., Kannourakis G. A time to kill: viral manipulation of the cell death program. J. of General // Virology. 2002. V. 83. P. 1547—1564.
27. Kountouras J., Zavos C., Chatzopoulos D. Apoptosis in Hepatitis C // J. Viral. Hepat. 2003. V. 10. P. 335—342.
28. Otsuka M., Kato N., Taniguchi H. et al. Hepatitis C virus core protein inhibits apoptosis by enhancing Bcl-xL expression // Virology. 2002. V. 296. P. 84—93.
29. Suda T., Nagata S. Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis // J. Exp. Med. 1994. V. 179. P. 873—877.
30. Takamatsu M., Fujita T., Hotta H. Suppression of serum starvation-induced apoptosis by hepatitis c virus core protein // J. Med. Science. 2001. V. 112. P. 97—112.
31. Tanaka M., Itai T., Adachi M., Nagata S. Downregulation of Fas ligand by shedding // Nat. Med. 1998. V. 4. P. 31—36.
32. Van Engeland M., Nieland L.J.W., Ramaekers F.C.S. et al. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure // Cytometry. 1998. V. 31. P. 1—9.

Жукова О.Б.

Молекулярные механизмы нарушения апоптоза лимфоцитов при хронической вирусной инфекции

33. Wuchter C., Ruppert V., Schrappe M. et al. *In vitro* susceptibility to dexamethasone- and doxorubicin-induced apoptotic cell death in context of maturation stage, responsiveness to

interleukin 7, and early cyto-reduction *in vivo* in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia // Blood. 2002. V. 99. P. 4109—4115.

Поступила в редакцию 20.03.2006 г.