

Механизмы апоптоза лимфоцитов при клещевом энцефалите

Чечина О.Е.¹, Рязанцева Н.В.¹, Сазонова Е.В.¹, Жукова Н.Г.¹, Удинцева И.Н.², Новицкий В.В.¹

Mechanisms of lymphocyte apoptosis at tick-borne encephalitis

Chechina O.Ye., Ryazantseva N.V., Sazonova Ye.V., Zhukova N.G., Udintseva I.N., Novitsky V.V.

¹ Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

² МЛПУ «МСЧ „Строитель“», г. Томск

© Чечина О.Е., Рязанцева Н.В., Сазонова Е.В. и др.

В статье приведены результаты комплексного исследования особенностей реализации апоптоза лимфоцитов при клещевом энцефалите в острый период, а также в условиях длительной антигенемии вируса клещевого энцефалита. При клещевом энцефалите отмечено повышение количества апоптотически измененных лимфоцитов, клеток, несущих на своей поверхности рецептор к фактору некроза опухолей типа I, а также клеток со сниженным трансмембранным потенциалом митохондрий. Обнаруженные изменения более выражены при острой форме нейроинфекции.

Ключевые слова: апоптоз, цитокины, лимфоциты, клещевой энцефалит.

Results of the complex research of apoptosis realization of lymphocytes at acute tick-borne encephalitis and during long antigenemia condition has been presented in this article. The acceleration of apoptosis, tumor necrosis factor I presentation and the decrease in mitochondrial transmembrane potential of lymphocytes were determined at tick-borne encephalitis. Uncovered changes are more appeared at acute neuroinfection.

Key words: apoptosis, cytokines, lymphocytes, tick-borne encephalitis.

УДК 616.988.25-002.954.2:616.155.3-091.818

Введение

В ходе эволюции в организме млекопитающих была сформирована сложнейшая многоуровневая система поддержания постоянства внутренней среды, одним из значимых механизмов которой является апоптоз, направленный на устранение избыточных и (или) аномальных клеток, а также необходимая для нормального эмбриогенеза [7, 13].

К разнообразным внешним и внутренним факторам, регулирующим запуск апоптотической программы, относят гормоны, цитокины, различные ксенобиотики, генетические особенности самой клетки, условия окружающей среды, в том числе и различные вирусы [1].

Изучение молекулярных аспектов реализации программированной гибели клетки в условиях вирус-

ной инфекции является актуальным вопросом. Участие апоптоза в удалении вирусосодержащих клеток имеет важное биологическое значение, так как от его индукции во многом зависит исход инфекционного процесса [3, 10].

Известно, что запуск специфического противовирусного иммунитета сопровождается активацией Т-лимфоцитов, которые уничтожают инфицированные вирусом клетки и привлекают в очаг другие эффекторы [6]. Однако на фоне пребывания персистирующего возбудителя в зараженных клетках, несмотря на выраженный иммунологический ответ, происходит сбой в защитных системах организма [4]. Рассматривая причины нарушения защитных механизмов в условиях заражения организма вирусом клещевого энцефалита (КЭ), следует отметить тропизм данного инфекта к лимфоидной ткани [2], а также его способность вме-

шиваться в реализацию танатогенной программы иммунокомпетентных клеток [5, 8, 16].

В то же время молекулярные механизмы модуляции апоптоза клеток иммунной системы могут быть связаны с вызываемым вирусом клещевого энцефалита дисбалансом Th1- и Th2- цитокинов [11, 12]. Цитокины являются наиболее многочисленной группой биологически активных веществ, влияющих на процессы гибели клетки [7]. Одни цитокины (например, IL-2, -3, -4, IFN- α , факторы роста) могут запускать эндогенную программу защиты клеток от апоптоза [1, 7]. Другие цитокины (TNF, β -токоферол, IL-1), напротив, обладают способностью индуцировать апоптоз. Эффект некоторых цитокинов (например, IFN- γ , IL-10) может быть разнонаправленным и зависеть как от типа клеток, так и от их функционального состояния [14]. Выраженный дисбаланс регуляторных цитокинов и нарушения регуляции программированной гибели иммунокомпетентных клеток могут являться причиной развития многих патологических процессов, в том числе хронизации инфекции, вызванной вирусом КЭ.

В связи с этим цель настоящей работы — оценить особенности реализации апоптоза лимфоцитов при клещевом энцефалите.

Материал и методы

Работа основана на результатах обследования 45 пациентов (25 мужчин и 20 женщин, средний возраст (35 ± 3) года), страдающих КЭ, включая 25 лиц с острым клещевым энцефалитом (ОКЭ) и 20 человек с антигемией вируса КЭ (более 6 мес после острого периода КЭ). Диагноз «ОКЭ» устанавливали на основании присасывания либо факта наличия ползающих клещей, а также клинической картины заболевания (острое начало, инфекционный синдром, неврологический статус). Верификацию диагноза осуществляли по результатам исследования клещей на присутствие антигена вируса КЭ, определения в сыворотке крови у пациентов его антигена и титра специфических антител классов М и G к указанному возбудителю методом иммуноферментного анализа (ИФА), а также по данным выявления РНК вируса КЭ с использованием полимеразной цепной реакции. У лиц с антигемией вируса КЭ через 6—24 мес после перенесенного в ли-

хорадочной форме ОКЭ в крови обнаруживался антиген возбудителя, а также высокий титр специфических к нему IgG.

В контрольную группу были включены 20 практически здоровых доноров с аналогичными характеристиками по полу и возрасту, не страдавшие инфекционными заболеваниями и не предъявлявшие на момент обследования жалоб соматического профиля.

Материалом исследования являлась венозная кровь обследованных лиц, взятая утром до приема пищи и стабилизированная гепарином (10—15 Ед/мл). Объектом исследования служили лимфоциты. Выделенные из венозной крови стандартным методом на градиенте плотности Ficoll-Paque (Pharmacia, Швеция) ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$) клетки культивировали в течение 18 ч при температуре 37 °С и 5% CO₂ в полной культуральной среде, состоящей из 90% RPMI-1640 (ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск), 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (ООО «Биолот», г. Санкт-Петербург), 0,3 мг/мл L-глутамин.

Клетки после культивирования ресуспендировали в аннексиновом буфере, содержащем аннексин V, меченный флюоресцин изотиоцианатом (ФИТЦ), и пропилий йодид (Beckman Coulter, США), инкубировали 15 мин в темноте при комнатной температуре. Анализ образцов клеточных суспензий проводили на проточном цитофлюориметре Erics XL (Beckman Coulter) на основе определения параметров зеленой (FITC — 530 нм) и оранжевой (пропилий йодид — 590 нм) флюоресценции.

Регистрацию количества лимфоцитов, несущих рецептор к фактору некроза опухолей α I типа (TNF-RI), осуществляли методом, основанным на взаимодействии соответствующих моноклональных антител (МКАТ) с мембранным рецептором к TNF α на лимфоцитах. После культивирования клетки отмывали фосфатным буфером (рН 7,2) и окрашивали стандартными МКАТ к рецепторам (TNF-RI), мечеными фикоэритрином (PE) (R&D, США) в объеме 10 мкл. После 30 мин инкубации клетки подвергали проточной цитофлюориметрии на цитофлюориметре Erics XL (Beckman Coulter), анализируя параметры оранжевой (PE — 585 нм) флюоресценции в гейте лимфоцитарных клеток.

Регистрацию изменения величины мембранного потенциала митохондрий проводили методом проточной

лазерной цитометрии с использованием набора реагентов MitoScreen (BD Pharmigen, США). Суспензию лимфоцитов, содержащую $1 \cdot 10^6$ клеток, центрифугировали 5 мин при 400g. К клеточному осадку добавляли 0,5 мл раствора JC-1 (5,5',6,6'-тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазолилкарбоцианин йодид). Клетки ресуспендировали и инкубировали 10—15 мин при температуре 37 °С, затем дважды отмывали буфером. Окрашенные JC-1 лимфоциты анализировали на проточном цитометре Epics XL (Beckman Coulter), определяя процентное содержание клеток со сниженным уровнем трансмембранного потенциала митохондрий (область зеленого спектрального свечения — 525 нм).

Проверку нормальности распределения количественных показателей проводили с использованием критерия Колмогорова—Смирнова. Для каждого анализируемого показателя вычисляли медиану Me и первый и третий квартили (Q_1 — Q_3). Для определения достоверности различий между независимыми группами использовали непараметрический U -критерий Манна—Уитни.

Статистически значимым принимали уровень $p < 0,05$.

Результаты

Оценка процентного содержания лимфоцитов, претерпевающих апоптотическую гибель, позволила установить, что у здоровых доноров количество клеток в состоянии апоптоза достигало 1,69 (1,04—3,08)% (таблица). У больных ОКЭ было зарегистрировано десятикратное увеличение численности апоптотически измененных лимфоцитарных клеток относительно контрольных значений ($p < 0,001$) (таблица). У пациентов с антигенемией вируса КЭ отмечались сходные, хотя и не столь выраженные изменения данного показателя ($p < 0,05$).

Оценка количества клеток, несущих на своей поверхности TNF-RI-рецептор, показала, что содержание TNF-RI-позитивных лимфоцитов у больных ОКЭ и у лиц с хронической антигенемией вируса КЭ в 4,6 и 3,7 раза соответственно превышало контрольные значения ($p < 0,001$) (таблица).

Определение доли клеток, приходящихся на лимфоциты со сниженным трансмембранным потенциалом митохондрий, у больных ОКЭ показало статисти-

чески значимое повышение значения данного параметра по сравнению со здоровыми лицами (таблица). Анализ результатов изучения целостности митохондриальной мембраны лимфоцитов у пациентов с хронической антигенемией вируса КЭ позволил также выявить возрастание численности клеток фракции мононуклеарных лейкоцитов с деполаризованной мембраной митохондрий относительно аналогичного показателя у здоровых лиц ($p < 0,05$) (таблица).

Количество апоптотически измененных клеток, клеток, несущих на своей поверхности TNF-RI-рецепторы, а также клеток со сниженным трансмембранным потенциалом митохондрий у пациентов с КЭ ($Me (Q_1-Q_3)$), %

Показатель	Характеристика обследованных		
	Здоровые доноры	Больные ОКЭ	Пациенты с хронической антигенемией вируса КЭ
Количество лимфоцитов в апоптозе	1,69 (1,04—3,08)	18,70 (11,20—21,60) $p_1 < 0,001$	5,72 (5,43—6,01) $p_1 < 0,05$; $p_2 < 0,001$
Количество TNF-RI-положительных лимфоцитов	3,31 (1,58—4,15)	15,30 (13,40—19,04) $p_1 < 0,001$	12,46 (10,77—17,62) $p_1 < 0,001$; $p_2 > 0,05$
Количество лимфоцитов со сниженным трансмембранным потенциалом митохондрий	2,24 (1,34—2,89)	6,74 (2,56—10,40) $p_1 < 0,05$	8,48 (7,08—9,06) $p_1 < 0,05$; $p_2 > 0,05$

Примечание. p_1 — достоверность различия показателя по сравнению с таковым у здоровых доноров; p_2 — достоверность различия показателя по сравнению с таковым у больных острым клещевым энцефалитом.

Обсуждение

Выявленное в настоящем исследовании усиление программированной гибели лимфоцитов крови при клещевой нейроинфекции можно рассматривать как ответную специфическую реакцию клетки-хозяина на инфектоген, направленную на противостояние дальнейшей экспансии возбудителя [5]. С другой стороны, массовая гибель клеток, осуществляющих реализацию противовирусного иммунитета, может обуславливать неадекватность иммунного ответа, что позволяет вирусу длительно сохраняться в организме с формированием хронического инфекционного процесса [15].

Важную роль в реализации апоптоза иммунных клеток играет TNF-RI. Взаимодействие TNF-RI со своим лигандом TNF α ведет к запуску апоптоза [13]. Полученные нами результаты увеличения количества TNF-RI-несущих лимфоцитов у пациентов с КЭ свидетельствуют о заинтересованности рецепторного пути в реализации программы гибели клетки. Выявленные изменения были более выражены при острой форме нейроинфекции. Это подтверждает обнаруженная корреляционная зависимость между количеством TNF-RI-несущих лимфоцитов и процентом клеток в апоптозе ($r = 0,77$; $p < 0,05$), то есть чем больше клеток имеют на своей поверхности рецепторы, связывающие мощный активатор запуска танатогенной программы TNF α , тем вероятнее их вовлечение в апоптоз. Однако помимо проапоптотического действия цитокина стоит учитывать и возможность некоторого вклада инфекта в инициацию апоптоза при ОКЭ, так как в условиях длительного присутствия антигена вируса КЭ содержание апоптотических лимфоцитов также превышало контрольные значения, однако оно было снижено в 3 раза по сравнению с соответствующим показателем у больных ОКЭ (см. таблицу).

Кроме того, запуск программы апоптоза может осуществляться по митохондриальному пути. Данный факт подтверждает обнаруженное у пациентов с КЭ увеличение количества клеток со сниженным трансмембранным потенциалом митохондрий. Выявленные изменения могут являться следствием действия нескольких факторов. В частности, при взаимодействии TNF-RI со своим лигандом TNF α активируется каспаза-8, что способствует образованию пор в наружной мембране митохондрий и пор пермеабилizационного перехода, это ведет к нарушению работы дыхательных комплексов, опосредуя запуск апоптотической программы [9, 13]. Еще одним фактором может служить накопление в лимфоцитах активных форм кислорода, продукция которых резко возрастает при острой вирусной инфекции. Причиной окислительного стресса также является TNF α , который в условиях воспаления через активацию фосфолипазы A₂ стимулирует образование эйкозаноидов, способных ингибировать фермент, метаболизирующий супероксид-анион, — митохондриальную MnSOD, что приводит к накоплению суперок-

сид-анионов и повреждению митохондриальных мембран [17].

Заключение

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об участии TNF α в реализации апоптоза лимфоцитов крови при клещевом энцефалите. Молекулярные механизмы реализации данного вида клеточной гибели связаны с запуском рецепторного и митохондриального путей. Обнаруженные изменения более выражены при острой форме нейроинфекции.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы (ГК № 02.740.11.0311), Российского фонда фундаментальных исследований (№ 09-04-99025р_офи), а также Совета по грантам при Президенте РФ (ГК № 16.120.11.480-МК).

Литература

1. Белишклина Н.Н., Северин С.Е. Молекулярные основы патологии апоптоза // Архив патологии. 2001. № 1. С. 51—60.
2. Жукова Н.Г., Команденко Н.И., Подоплека Л.Е. Клещевой энцефалит в Томской области (этиология, эпидемиология, клиника, диагностика, лечение). Томск: STT, 2002. 256 с.
3. Жукова О.Б., Рязанцева Н.Н., Новицкий В.В. Вирусная персистенция: иммунологические и молекулярно-генетические аспекты // Бюл. сиб. медицины. 2003. Т. 2. № 4. С. 113—119.
4. Иерусалимский А.П. Клещевой энцефалит. Новосибирск: Наука, 2001. 258 с.
5. Исаева М.П., Леонова Г.Н., Кожемяко В.Б. Апоптоз как механизм цитопатического действия вируса клещевого энцефалита // Вопр. вирусологии. 1998. № 4. С. 182—186.
6. Носик Н.Н. Цитокины при вирусных инфекциях // Вопр. вирусологии. 2000. № 1. С. 4—9.
7. Потанин М.П. Апоптоз клеток иммунной системы и его регуляция цитокинами // Иммунология. 2002. № 4. С. 235—242.
8. Ратникова Л.И., Тер-Багдасарян Л.В., Миронов И.Л. Современные представления о патогенезе клещевого энцефалита // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2002. № 5. С. 41—46.
9. Рыжов С.В., Новиков В.В. Молекулярные механизмы апоптотических процессов // Рос. биотерапевт. журн. 2007. Т. 1, № 3. С. 27—33.
10. Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Жукова О.Б. и др. Вирусиндуцированная дисрегуляция программируемой гибели иммунокомпетентных клеток: адаптация или патология? // Успехи физиолог. наук. 2005. Т. 36, № 3. С. 33—44.
11. Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Зима А.П. и др. Наруше-

- ния продукции цитокинов мононуклеарами периферической крови при персистенции вируса клещевого энцефалита // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2006. Т. 106, № 12. С. 57—62.
12. Удинцева И.Н., Чечина О.Е., Жукова Н.Г. и др. Клинико-иммунологические аспекты клещевого энцефалита // Бюл. сиб. медицины. 2008. Т. 7, № 5. С. 182—189.
13. Фильченков А.А. Каспазы: регуляторы апоптоза и других клеточных функций // Биохимия. 2003. Т. 68, вып. 4. С. 453—466.
14. Ярилин А.А. Апоптоз. Природа феномена и его роль в целостном организме // Патол. физиология и эксперим. терапия. 1998. № 2. С. 38—48.
15. Ярилин А.А. Апоптоз: природа феномена и его роль в норме и при патологии // Актуал. проблемы патофизиологии / под ред. Б.Б. Мороза. М., 2001. С. 13—56.
16. Lewis J., Wesseling S., Griffin D. et al. Alphavirus-induced apoptosis in mouse brain correlates with neurovirulence // J. Virol. 1996. V. 70, № 3. P. 1828—1836.
17. MacEwan D.J. Elevated CPLA2 levels as a mechanism by which the p70 TNF and p75 NGF receptors enhance apoptosis // FEBS Lett. 1996. V. 379. P. 77—81.

Поступила в редакцию 23.03.2011 г.

Утверждена к печати 20.09.2011 г.

Сведения об авторах

О.Е. Чечина — канд. мед. наук, руководитель Научно-образовательного центра молекулярной медицины СибГМУ (г. Томск).

Н.В. Рязанцева — д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой фундаментальных основ клинической медицины СибГМУ (г. Томск).

Е.В. Сазонова — канд. мед. наук, ассистент кафедры фундаментальных основ клинической медицины СибГМУ (г. Томск).

Н.Г. Жукова — д-р мед. наук, профессор кафедры неврологии и нейрохирургии СибГМУ (г. Томск).

И.Н. Удинцева — канд. мед. наук, врач-невролог МЛПУ «МСЧ „Строитель“» (г. Томск).

В.В. Новицкий — д-р мед. наук, профессор, академик РАМН, зав. кафедрой патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

Для корреспонденции

Чечина Ольга Евгеньевна, тел. 8-905-089-2137; e-mail: olga_chechina@mail.ru

Уважаемые читатели!

Предлагаем вам подписаться на наш журнал с любого номера

В 2012 году стоимость подписки на полугодие составляет 1500 рублей, на год — 3000 рублей.

Как оформить подписку на журнал «Бюллетень сибирской медицины»

На почте во всех отделениях связи

Подписной индекс **46319** в каталоге агентства Роспечати «Газеты и журналы 2012, 1-е и 2-е полугодие».

В редакции

- Без почтовых наценок.
- С любого месяца.
- Со своего рабочего места.

По телефону (382-2) 51-41-53; факс (382-2) 51-53-15.

На сайте <http://bulletin.tomsk.ru>

Если вы являетесь автором публикаций или хотите приобрести наш журнал, он будет выслан вам наложенным платежом при заполнении заявки. Стоимость приобретения одного номера 400 рублей.

Заявку на приобретение журнала нужно выслать по адресу редакции:

634050, г. Томск, пр. Ленина, 107,

Научно-медицинская библиотека Сибирского государственного медицинского университета, редакция журнала «Бюллетень сибирской медицины»,

Чечина О.Е., Рязанцева Н.В., Сазонова Е.В. и др.

Механизмы апоптоза лимфоцитов при клещевом энцефалите

тел. (8-3822) 51-41-53. E-mail: bulletin@bulletin.tomsk.ru