

УДК [61.36-002.12:578.891]-092

Сравнительная характеристика апоптоза периферических лейкоцитов при вирусных и аутоиммунных заболеваниях печени

А.О. Бугверов, О.Ю. Киселева, В.Т. Ивашкин, Н.Н. Белушкина,
Е.Ю. Москалева, Е.Н. Широкова, М.В. Маевская

(Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова)

Comparative characteristic of apoptosis of peripheral leukocytes at viral and autoimmune liver diseases

A.O. Buyeverov, O.Yu. Kiselyeva, V.T. Ivashkin, N.N. Belushkina, Ye.Yu. Moskaeva,
Ye.N. Shirokova, M.V. Mayevskaya

Цель исследования. Сравнить уровень апоптоза периферических лейкоцитов при *хронических гепатитах* (ХГ) В, С и *синдроме аутоиммунного перекреста* (САП) аутоиммунного гепатита и первичного билиарного цирроза.

Материал и методы. Для изучения уровня апоптоза и структуры ДНК лейкоцитов периферической крови были обследованы 54 больных ХГ. У 12 человек диагностирован ХГВ, у 22 – ХГС, у 20 – САП. Контрольная группа состояла из 20 здоровых добровольцев без признаков патологии печени и с отрицательными результатами анализов крови на маркеры HBV- и HCV-инфекции. У пациентов с ХГ и у здоровых лиц определялось количество лимфоцитов и гранулоцитов периферической крови в состоянии апоптоза непосредственно после выделения и после 24-часовой инкубации в культуральной среде методом проточной цитофлуориметрии, у больных с САП – только спонтанный апоптоз общей лейкоцитарной фракции.

Результаты. У больных ХГ апоптоз как лимфоцитов, так и гранулоцитов был достоверно выше по сравнению с контролем как непосредственно после выделения, так и после суточной инкубации. Число лейкоцитов периферической крови в состоянии спонтанного апоптоза у больных с САП также было достоверно выше в сравнении с показателями контрольной группы ($9,9 \pm 0,8$ и $4,2 \pm 0,1$, $p < 0,05$). Сравнение средних уровней спонтанного апоптоза общей фракции лейкоцитов продемонстрировало отсутствие достоверных различий между группами ХГВ и САП и ХГС и САП ($p > 0,05$).

Выводы. Уровень апоптоза лейкоцитов периферической крови у обследованных больных дос-

Aim of investigation. To compare a level of apoptosis of peripheral blood leukocytes at *chronic hepatitis* (CH) B, C and *autoimmune overlap syndrome* (AOS) of autoimmune hepatitis and primary biliary cirrhosis.

Material and methods. To study level of apoptosis and pattern of DNA of peripheral blood leukocytes 54 patients with CH have been investigated. In 12 person CHB was diagnosed, in 22 – CHC, in 20 – AOS. The control group consisted of 20 healthy volunteers without symptoms of liver disease and with negative markers of HBV-and HCV-infections. In patients with CH and healthy persons quantity of lymphocytes and granulocytes of peripheral blood in apoptosis state immediately after extraction and after 24-hour incubation in culture medium by cytoflowmetry method, in patients with AOS – only spontaneous apoptosis of total leukocytic fraction was determined.

Results. At CH patients apoptosis of both lymphocytes and granulocytes was significantly higher in comparison to control immediately after extraction, as well as after 24-hour incubation. The number of leukocytes of peripheral blood in a state of spontaneous apoptosis in patients with AOS was also significantly higher in comparison to scores of control group ($9,9 \pm 0,8$ and $4,2 \pm 0,1$, $p < 0,05$). Comparison of average levels of spontaneous apoptosis of total fraction of leukocytes showed absence of significant differences between CHB and AOS and CHC and AOS groups ($p > 0,05$).

Conclusions. The level of apoptosis of peripheral blood leukocytes at investigated patients significantly exceeds the level of apoptosis of these cells at healthy persons. In peripheral blood of patients with CH there are not only leukocytes at a state of apoptosis, but also apoptosis-committed cells, that is manifested by mono-

товерно превышает уровень апоптоза этих клеток у здоровых лиц. В периферической крови больных ХГ присутствуют не только лейкоциты в состоянии апоптоза, но и коммитированные к нему клетки, что проявляется усилением апоптоза мононуклеарных и полиморфно-ядерных лейкоцитов после 24-часовой инкубации в культуральной среде. Значимые различия между уровнем апоптоза лейкоцитов периферической крови у пациентов с ХГВ, ХГС и САП отсутствуют, что указывает на роль апоптоза в качестве унифицированного механизма повреждения клеток.

Ключевые слова: хронический гепатит В, хронический гепатит С, синдром аутоиммунного перекреста, лейкоциты периферической крови, апоптоз.

nuclear and polymorphonuclear leukocytes apoptosis enhancement after 24-hour incubation in culture medium. Significant differences between a level of apoptosis of leukocytes of peripheral blood in patients with CHB, CHC and AOS were absent, that indicates a role of apoptosis as the unified mechanism of cell damage.

Key words: chronic hepatitis B, chronic hepatitis C, autoimmune overlap syndrome, leukocytes of a peripheral blood, apoptosis.

Значение описанного в 1972 г. J.F. Керг с соавт. феномена апоптоза длительное время недооценивалось, но в 90-е годы минувшего века интерес к механизмам его реализации значительно повысился, и эта проблема стала одной из наиболее интенсивно изучаемых областей биологии.

Апоптоз (греческое слово, соответствующее листопаду: *apo* — отделение, *ptosis* — падение) определяется как регулируемая форма программированной смерти клетки с характерными морфологическими и биохимическими признаками. Апоптозу принадлежит важнейшая роль как в физиологических, так и в патологических условиях ввиду того, что и его подавление, и неадекватное усиление ведет к патологическим изменениям органов и тканей. В то время как избыточная активация апоптоза, наблюдаемая, в частности, при инфицировании клеток печени гепатотропными вирусами, обуславливает разрушение печеночной ткани, ослабление апоптотической гибели клеток (вызванное, к примеру, мутацией гена, кодирующего проапоптогенный белок p53) служит одним из важнейших факторов канцерогенеза [2, 8].

Апоптоз выступает результатом энергозависимого каскада молекулярных событий, включающих четыре основных этапа [7]:

1) *инициация* апоптоза при активации сигнало-передающих путей;

2) *контрольная стадия*, или *стадия интеграции*, в процессе которой соотношение внутриклеточных индукторов и ингибиторов апоптоза определяет исход событий;

3) *стадия реализации программы клеточной гибели*, связанная с активацией каскада протеаз, после чего процесс становится необратимым;

4) элиминация погибшей клетки путем *фагоцитоза*.

Биохимические и морфологические признаки апоптоза при хронических вирусных гепатитах достаточно хорошо изучены. Запуск процессов апоптоза при проникновении в гепатоцит вируса следует рассматривать как своего рода защитный

механизм, поскольку в мертвой клетке репликация вируса становится невозможной. Поэтому «в интересах» вируса — подавить апоптоз и сохранить клетки жизнеспособными. И действительно, некоторые кодируемые вирусами белки обладают антиапоптозной активностью, которая осуществляется подавлением функции проапоптогенного (и противоопухолевого!) белка p53, инактивацией каспаз, а также усиленной экспрессией мощного ингибитора апоптоза bcl-2 [8, 10, 15]. Интересно, что в норме bcl-2 обнаружен в печени только в эпителии желчных протоков, постоянно контактирующих с желчью, но не в гепатоцитах [2]. О связи экспрессии белка Fas и последующего апоптоза с действием *вируса гепатита С* (HCV) свидетельствует и то, что после успешного лечения интерфероном α количество Fas-положительных клеток резко уменьшается и коррелирует как со снижением активности трансаминаз, так и с уменьшением выраженности портальной и лобулярной лимфоидной инфильтрации ткани печени [6].

Иммуногистохимические исследования показали, что на поверхности Т-лимфоцитов, формирующих воспалительный инфильтрат в печени при *хроническом гепатите С* (ХГС), увеличена экспрессия *Fas-лиганда* (FasL). Секретируемый FasL, в свою очередь высвобождаемый из активированных Т-лимфоцитов, может служить апоптотическим сигналом для гепатоцитов, несущих на своей поверхности Fas-рецептор. У больных ХГС выявлено усиление Fas-опосредованного апоптоза гепатоцитов, при этом экспрессия FasL нарастала параллельно прогрессированию заболевания [10].

Лимфоциты, инфильтрирующие печень, распознают присутствие вирусных антигенов на гепатоцитах, активируются и экспрессируют FasL на своей поверхности. С другой стороны, инфицированные гепатоциты усиливают экспрессию рецепторов Fas и повышают чувствительность к Fas-опосредованному апоптозу [15]. Результаты собственных исследований указывают на значительные различия в реализации механизмов унич-

тожения инфицированных вирусом гепатоцитов: при ХГС степень экспрессии Fas и FasL лимфоцитами воспалительного инфильтрата достоверно превышала таковую при ХГВ [5]. Полученные данные подтверждают ведущую роль клеточного Fas-опосредованного иммунного ответа организма на антигены вирусов гепатитов В и С в повреждении гепатоцитов.

Важно подчеркнуть, что при хронических вирусных гепатитах сами лимфоциты становятся объектом цитотоксического действия собственного FasL или FasL гепатоцитов. Это подтверждается как экспрессией FasL на гепатоцитах, так и экспрессией Fas на цитотоксических лимфоцитах, достоверно более высокой при ХГС по сравнению с ХГВ [5].

Являясь универсальным биологическим механизмом, апоптоз при вирусных гепатитах может приводить к избыточной гибели не только гепатоцитов, но и других клеточных популяций, в первую очередь лейкоцитов, отражая либо системный иммуновоспалительный ответ на инфекцию, либо внепеченочную персистенцию вируса [4, 12].

При аутоиммунной патологии печени исследований, посвященных апоптозу гепатоцитов и других клеточных популяций, существенно меньше. Усиление программированной гибели клеток описано для всех аутоиммунных заболеваний печени, но точные механизмы данного процесса детально не изучены. В большинстве случаев, как и при вирусных гепатитах, доминирует «внешний» путь апоптоза, инициируемый активацией «рецепторов смерти» на поверхности гепатоцитов и холангиоцитов [11]. Ведущая роль принадлежит взаимодействию Fas–FasL. При этом изменения в интенсивности апоптоза наблюдаются не только непосредственно в ткани печени, но и в мононуклеарах периферической крови [16]. Вместе с тем наряду с внешним иногда реализуется «внутренний» путь — через повреждение митохондрий с участием рецепторов семейства bcl-2. В обоих случаях эффекторные каспазы расщепляют клеточные структуры, что ведет к выходу продуктов апоптоза в циркуляцию.

С точки зрения патогенеза аутоиммунных процессов представляет интерес факт того, что, несмотря на выделение апоптоза как обособленной формы клеточной гибели, он может сочетаться с другими ее формами (некроз, аутофагия). Если апоптотические клетки своевременно не элиминируются макрофагами, они остаются в качестве потенциальных источников антигенов. Аномальная презентация последних запускает цепь аутоиммунных реакций [3, 13].

Цель исследования состояла в сравнении уровня апоптоза периферических лейкоцитов при ХГВ, ХГС и *синдроме аутоиммунного перекреста* (САП) аутоиммунного гепатита и первичного билиарного цирроза.

Материал и методы исследования

Для изучения уровня апоптоза и структуры ДНК лейкоцитов периферической крови были обследованы 54 больных ХГ. У 12 человек выявлен ХГВ, у 22 — ХГС, у 20 — САП. ХГ вирусной этиологии диагностировался на основании стандартного комплекса вирусологических, биохимических и гистологических исследований. Диагноз САП основывался на подтвержденном диагнозе первичного билиарного цирроза в сочетании с любыми двумя признаками из четырех: 1) повышение активности АсАТ более чем в 5 раз от верхней границы нормы, 2) повышение уровня IgG более чем в 2 раза от верхней границы нормы, 3) антитела к ядрам или гладкой мускулатуре в диагностическом титре (более 1:40); 4) гистологические признаки аутоиммунного гепатита. В исследование не включались пациенты с декомпенсированным циррозом и сочетанной патологией печени, тяжелыми заболеваниями других органов и систем, ВИЧ-инфекцией, а также лица, ранее получавшие противовирусную или иммуносупрессивную терапию. Контрольная группа состояла из 20 здоровых добровольцев без признаков патологии печени и с отрицательными результатами анализов крови на маркеры HBV- и HCV-инфекции.

У пациентов с ХГВ, ХГС и у здоровых доноров определялось количество лимфоцитов и гранулоцитов периферической крови в состоянии апоптоза непосредственно после выделения и после 24-часовой инкубации в культуральной среде методом проточной цитофлуориметрии, у больных с САП — только спонтанный апоптоз общей лейкоцитарной фракции.

Выделение мононуклеарных и полиморфно-ядерных лейкоцитов из периферической крови проводили одноэтапным методом с использованием двухслойного градиента Ficoll–Раке в стерильных условиях. Для этого гепаринизированную (25 ед. гепарина/1 мл крови) цельную венозную кровь наслаивали на равный объем градиента фикола с плотностями 1,095 и 1,077 г/мл и центрифугировали при 400 g в течение 30 мин при комнатной температуре. Из крови получали две фракции лейкоцитов: мононуклеарные и полиморфно-ядерные в виде двух слоев клеток. Клетки осторожно собирали и отмывали дважды в *фосфатно-солевом буфере* (ФСБ) (рН 7,4). Фракция мононуклеарных лейкоцитов была представлена лимфоцитами (80–90%), моноцитами (15–20%) и примесью гранулоцитов (менее 3%), фракция полиморфно-ядерных лейкоцитов — в основном гранулоцитами.

Выделенные клетки периферической крови в концентрации 1 млн/мл культивировали в 24-луночных пластиковых культуральных планшетах (Costar) в среде RPMI 1640 (Sigma), содержащей

10% инактивированной эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (Gibco) и 50 мкг/мл гентамицина — при 37 °С в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Регистрация апоптоза клеток осуществлялась с помощью проточной цитофлуориметрии после окрашивания ДНК йодистым пропидием в качестве флуорохрома и путем измерения процента гиподиплоидных клеток на проточном цитофлуориметре-сортировщике клеток EPICS. Клетки в концентрации 1 млн/мл фиксировали в 70% ледяном этаноле в течение 30–60 мин при 4 °С и хранили до исследования при –20 °С в течение 2–3 нед.

Фиксированные клетки дважды отмывали от этанола ФСБ (с pH 7,4, содержанием 0,1% Тритона X-100, 0,1 мМ ЭДТА, 0,05 мг/мл рибонуклеазы А и 50 мкг/мл йодистого пропидия) и ресуспендировали в 1 мл ДНК-окрашивающего реагента в течение часа при комнатной температуре. Окрашенные клетки немедленно анализировали на проточном цитофлуориметре при длине волны возбуждения 488 нм и длине волны эмиссии 680 нм. Процент клеток в состоянии апоптоза (процент гиподиплоидных клеток со сниженной по сравнению с диплоидными флуоресценцией ДНК) подсчитывали по программе STAT PACK, анализируя флуоресценцию не менее 10 000 клеток в каждом образце [4].

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты биохимического анализа крови больных ХГ показали, что активность сывороточных трансаминаз в этой группе была нормальной или почти нормальной (менее 1,5 нормы) у 10 (30%) пациентов, незначительно повышенной (1,5–3 нормы) — у 17 (50%) и умеренно повышенной (3–5 норм) — у 7 (20%). Достоверных различий по биохимической активности между ХГВ и ХГС не отмечено. Клинически значимого (более 1,5 нормы) повышения уровня щелочной фосфатазы, γ -глутамилтранспептидазы, общего и прямого билирубина, γ -глобулинов у обследованных больных не обнаружено.

При анализе биохимических показателей пациентов с САП выявлено, что активность трансами-

наз была умеренно повышенной у 4 (20%) из них и значительно повышенной (более 5 норм) — у 16 (80%). Во всех случаях наблюдался биохимический синдром холестаза. Уровень щелочной фосфатазы был умеренно повышен у 7 (35%) и значительно повышен у 13 (65%) пациентов. Незначительное повышение активности γ -глутамилтранспептидазы отмечено у 6 (30%), умеренное — у 10 (50%) и значительное — у 4 (20%) больных. Уровень сывороточного билирубина был незначительно повышен (не более чем в 1,5 раза от верхней границы нормы) у 12 (60%) и умеренно повышен (3–5 норм) — у 5 (25%) больных, значительная гипербилирубинемия (более 5 норм) зарегистрирована у 3 (15%) пациентов.

Установлено, что у больных ХГ апоптоз как лимфоцитов, так и гранулоцитов был достоверно выше по сравнению с контролем как непосредственно после выделения, так и после суточной инкубации (см. таблицу и рисунок). Более интенсивный переход клеток в апоптоз наблюдался в подгруппе больных гепатитом С, хотя здесь следует учитывать роль разного количества пациентов в подгруппах (12 с ХГВ и 22 с ХГС). Выявлена также корреляция между степенью повреждения ДНК лимфоцитов и гранулоцитов и накоплением клеток в состоянии апоптоза после инкубации. Помимо этого, после суточной инкубации количество лейкоцитов обеих популяций в апоптозе достоверно коррелировало с сывороточной концентрацией фактора некроза опухоли α (TNF- α), что соответствует данным литературы [4, 9, 14].

Уровень спонтанного апоптоза лейкоцитов периферической крови у больных с САП также был достоверно выше в сравнении с показателями контрольной группы — соответственно $9,9 \pm 0,8$ и $4,2 \pm 0,1$ (отличия достоверны, $p < 0,05$).

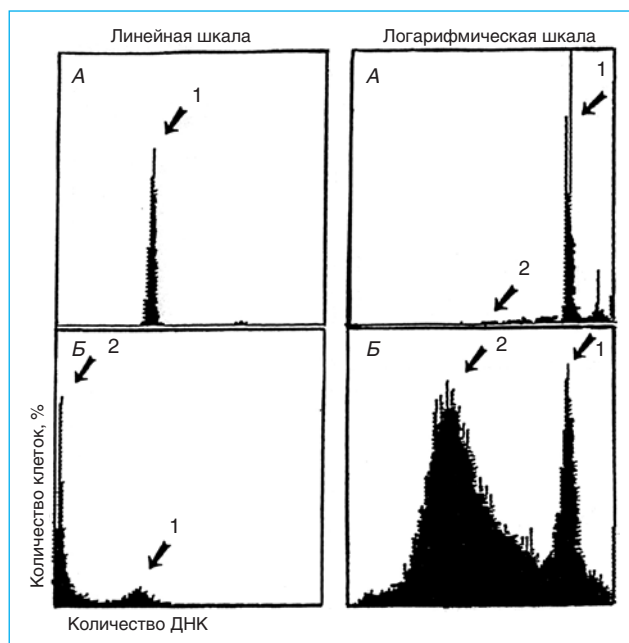
Сравнение у обследуемых средних уровней спонтанного апоптоза общей фракции лейкоцитов продемонстрировало отсутствие достоверных различий между группами ХГВ и САП и ХГС и САП ($p > 0,05$).

Изучение взаимосвязи между активностью сывороточных трансаминаз и уровнем апоптоза мононуклеарных и полиморфно-ядерных лейкоцитов выявило отсутствие значимой корреляции между этими параметрами во всех группах.

Уровень апоптоза лейкоцитов периферической крови у здоровых доноров и больных ХГ вирусной этиологии, %

Исследуемая группа	Время инкубации			
	лимфоцитов		гранулоцитов	
	0 ч	24 ч	0 ч	24 ч
Здоровые доноры, $n=15$	$1,2 \pm 0,2$	$3,6 \pm 0,7$	$9,2 \pm 1,6$	$22,0 \pm 3,0$
ХГВ, $n=12$	$5,9 \pm 1,7^*$	$10,0 \pm 2,9^*$	$14,0 \pm 4,2^*$	$32,7 \pm 4,2^*$
ХГС, $n=22$	$8,8 \pm 1,8^*$	$18,2 \pm 3,2^*$	$15,9 \pm 1,8^*$	$38,0 \pm 4,4^*$

*Отличия от контроля достоверны, $p < 0,05$.



Анализ апоптоза методом проточной цитофлуориметрии в лимфоцитах периферической крови здорового добровольца (А) и больного ХГС (Б) через 24 ч инкубации клеток в культуральной среде. Гистограмма, отражающая клеточный цикл лимфоцитов. По оси абсцисс — интенсивность флуоресценции, по оси ординат — количество клеток. 1 — пик диплоидной ДНК (соответствует фазе G0/G1 клеточного цикла), 2 — пик гиподиплоидной ДНК (соответствует клеткам в состоянии апоптоза)

В результате проведенного исследования обнаружено, что и у больных хроническими вирусными гепатитами, и у больных с САП наблюдается достоверно более высокий по сравнению со здоровыми добровольцами уровень апоптоза как лимфоцитов, так и гранулоцитов периферической крови. Анализируя полученные данные, следует отметить, что высокий уровень апоптоза лейкоцитов у больных по сравнению со здоровыми может свидетельствовать о наличии общих механизмов апоптоза в этих клетках. Наиболее вероятными, на наш взгляд, механизмами индукции апоптотической гибели клеток крови при исследуемых хронических заболеваниях печени могут быть следующие.

Цитопатическая активность вирусов гепатитов В и С. Обнаружение факта репликации вирусов гепатита в лейкоцитах периферической крови позволяет рассматривать последние как независимую от печени мишень действия вирусов. Действительно, в настоящее время можно говорить лишь о преимущественном гепатотропизме HBV и HCV. Открытие связывания поверхностного белка HCV E2 с белком CD81, экспрессируемым большим количеством клеток, включая гепатоциты, В- и Т-лимфоциты, а также гранулоциты, подтверждает рецепторопосредованное проникновение вируса в эти клетки и их

заражение. Вирусы гепатита оказывают прямое проапоптотическое влияние на инфицированные клетки в процессе вирусной репликации вследствие воздействия вирусных белков рХ вируса гепатита В и core-белка вируса гепатита С. Трансактиваторные свойства указанных белков продемонстрированы при изучении их влияния на клетки *in vitro*. Кроме того, важную роль в развитии апоптоза может играть опосредованное действие вирусных белков, секретируемых в процессе репликации вирусов в клетке [10]. Оно приводит к увеличению чувствительности клетки к апоптозинулирующим факторам (так называемая проапоптогенная готовность). Результаты наших исследований также подтверждают такую возможность.

Высокий уровень проапоптотических цитокинов в сыворотке крови больных. Цитотоксические лимфоциты при ХГ вирусного и аутоиммунного генеза продуцируют ряд провоспалительных цитокинов и ростовых факторов: TNF- α , интерферон γ , трансформирующий фактор роста- β и др. Накоплены данные о повышенном содержании указанных цитокинов в крови больных. Важно отметить, что TNF- α самостоятельно может выполнять роль индуктора апоптоза некоторых типов клеток. Кроме того, имеются сведения о том, что рХ-белок, экспрессируемый клеточными линиями в экспериментах *in vitro*, повышает чувствительность клеток к TNF- α , в норме резистентных к его эффектам, и вызывает их гибель путем апоптоза. Core-белок вируса гепатита С также взаимодействует с рецептором к TNF- α и способствует *in vitro* развитию апоптоза при действии TNF- α . Таким образом, провоспалительные цитокины прямо или косвенно участвуют в индукции апоптоза клеток при вирусной инфекции или аутоиммунном процессе [6, 9, 12]. Ранее мы обнаружили увеличение доли лимфоцитов и гранулоцитов в состоянии апоптоза после суточной инкубации клеток *in vitro* в питательной среде у больных ХГВ и ХГС с более высоким уровнем сывороточного TNF- α [4]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что повышенный уровень провоспалительных/проапоптотических цитокинов в сыворотке крови больных ХГ может быть одним из факторов, коммитирующих лейкоциты, находящиеся в периферическом русле, к апоптозу.

Накопление нерепарированных повреждений ДНК клеток под действием активных форм кислорода. Активные метаболиты кислорода, продуцируемые гранулоцитами и моноцитами при взаимодействии с антигенами, играют важную роль в защите организма от инфекции, но могут вызывать также повреждение ДНК окружающих клеток и повреждение тканей при воспалении, в том числе иммунном. Накопление нерепарированных повреждений ДНК, возни-

кающих в результате окислительного стресса, является одним из триггеров апоптоза. Фагоциты сами испытывают повреждающее действие окислительного взрыва и могут индуцировать апоптоз лимфоцитов. Роль активных форм кислорода в индукции повреждения клеток при вирусных гепатитах подтверждается в ряде сообщений об изменении функционально-метаболического состояния лейкоцитов крови у больных ХГВ и ХГС, в частности усилении процессов свободнорадикального окисления в мембранах клеток и нарушении их внутриклеточного метаболизма [1].

Гибель клеток, обусловленная взаимодействием на их поверхности Fas и FasL. Эта форма гибели может иметь место для активированных лимфоцитов. После активации в результате взаимодействия с антигенами Т-лимфоциты экспрессируют повышенное количество FasL на своей поверхности. Персистенция популяции активированных Т-клеток после элиминации антигена могла бы привести к ряду нежелательных последствий, в том числе к развитию аутоиммунных и лимфопролиферативных нарушений. Удаление активированных лимфоцитов из циркуляторного русла осуществляется путем их апоптоза с помощью системы Fas/FasL, когда лимфоциты выступают в роли и эффекторов, и клеток-мишеней — так называемая AICD (activation-induced cell death) — гибель клеток путем апоптоза в результате активации. Нейтрофилы и моноциты конститутивно экспрессируют Fas, а нейтрофилы еще и FasL. Коэкспрессия Fas и FasL может являться возможным механизмом, с помощью которого зрелые нейтрофилы человека подвергаются быстрому спонтанному апоптозу (в течение 48 ч более 50% популяции). Кроме того, возможна гибель нейтрофилов, когда мембраносвязанный Fas взаимодействует с FasL, экспрессируемым соседними нейтрофилами [10, 12, 16].

Таковы наиболее вероятные, на наш взгляд, механизмы индукции апоптоза лейкоцитов у больных хроническими вирусными и аутоиммунными заболеваниями печени. Мы намеренно выбрали

для сравнения группу пациентов с САП, объединяющим разнородные нозологические формы (аутоиммунный гепатит и первичный билиарный цирроз) с общим аутоиммунным патогенезом. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии значимых различий между уровнем апоптоза лейкоцитов периферической крови у больных ХГВ, ХГС и САП. В то же время можно указать на тенденцию активации апоптоза лейкоцитов по мере усиления иммунной составляющей патогенеза: САП > ХГС > ХГВ. Это может быть объяснено с позиции доминирования иммуно- и цитокинопосредованного («внешнего») механизма апоптоза при данных нозологических формах.

Таким образом, результаты проведенного исследования подтверждают роль апоптоза как унифицированного механизма повреждения клеток печеночного и костномозгового происхождения независимо от этиологического фактора. Отсутствие значимой корреляции между активностью сывороточных трансаминаз и уровнем апоптоза лейкоцитов периферической крови, по нашему мнению, вполне закономерно. Активность АЛАТ и АсАТ отражает цитолитические процессы в печени, которые не имеют непосредственного отношения к клеткам периферической крови и не влияют на их жизнеспособность.

Выводы

1. Уровень апоптоза лейкоцитов периферической крови у пациентов с ХГВ, ХГС и САП достоверно превышает таковой у здоровых лиц.

2. В периферической крови больных ХГ присутствуют не только лейкоциты в состоянии апоптоза, но и коммитированные к нему клетки, что проявляется усилением апоптоза мононуклеарных и полиморфно-ядерных лейкоцитов после 24-часовой инкубации в культуральной среде.

3. Значимые различия между уровнем апоптоза лейкоцитов периферической крови у пациентов с ХГВ, ХГС и САП отсутствуют, что указывает на роль апоптоза в качестве унифицированного механизма повреждения клеток.

Список литературы

1. Антонова Т.В., Николаенко С.Н., Барановская В.Б. Роль прооксидантной и антиоксидантной систем в патогенезе вирусного гепатита В // Рос. журн. гастроэнтерол. гепатол. колопроктол. — 1995. — Т. 5, № 3 (прил. 1). — С. 8.
2. Аруин Л.И. Апоптоз и патология печени // Рос. журн. гастроэнтерол. гепатол. колопроктол. — 1998. — Т. 8, № 2. — С. 6–10.
3. Буеверов А.О. Аутоиммунный гепатит // Рациональная фармакотерапия в гастроэнтерологии / Под ред. В.Т. Ивашкина, А.О. Буеверова. — М.: Изд-во «Литтерра», 2009. — С. 168–174.
4. Буеверов А.О., Тихонина Е.В., Москалева Е.Ю. и др. Апоптоз периферических лейкоцитов при хронических вирусных гепатитах // Рос. журн. гастроэнтерол. гепатол. колопроктол. — 2000. — Т. 10, № 6. — С. 30–33.
5. Дмитриева Е.В., Москалева Е.Ю., Буеверов А.О. и др. Роль системы Fas/Fas-лиганд в индукции апоптоза гепатоцитов при хронических вирусных гепатитах // Арх. патол. — 2003. — Т. 65, № 6. — С. 13–16.
6. Ando K., Hiroishi K., Kaneko T. et al. Perforin, Fas/Fas ligand, and TNF-alpha pathways as specific and bystander killing mechanisms of hepatitis C virus-specific human CTL // J. Immunol. — 1997. — Vol. 158. — P. 5283–5291.
7. Ashkenazi A., Dixit V.M. Death receptors: signaling and modulation // Science. — 1998. — Vol. 281. — P. 1305–1308.

8. *Ellis R.E., Yuan J.Y., Horvitz H.R.* Mechanisms and functions of cell death // *Ann. Rev. Cell Biol.* — 1991. — Vol. 7. — P. 663–698.
9. *Hatano E.* Tumor necrosis factor signaling in hepatocyte apoptosis // *J. Gastroenterol. Hepatol.* // 2007. — Vol. 22 (suppl. 1). — P. 43–44.
10. *Herzer K., Sprinzl M.F., Galle P.R.* Hepatitis viruses: live and let die // *Liver Int.* — 2007. — Vol. 27. — P. 293–301.
11. *Kremer A.E., Rust C., Eichhorn P.* et al. Immune-mediated liver diseases: programmed cell death ligands and circulating apoptotic markers // *Expert Rev. Mol. Diagn.* — 2009. — Vol. 9. — P. 139–156.
12. *Liles W., Kiener P., Ledbetter J.* Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes: implications for the regulation of apoptosis in neutrophils // *J. Exp. Med.* — 1996. — Vol. 184. — P. 429–440.
13. *Mackay I.R., Leskovsek N.V., Rose N.R.* Cell damage and autoimmunity: a critical appraisal // *J. Autoimmun.* — 2008. — Vol. 30. — P. 5–11.
14. *Saitou Y., Shiraki K., Fuke H.* et al. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors in viral hepatic diseases // *Hum. Pathol.* — 2005. — Vol. 36. — P. 1066–1073.
15. *Sprinzl M.F., Rosset S., Male F.-F.* et al. Chronic viral infections causes an apoptosis resistant hepatocellular phenotype by induction of regeneration factors of the liver // *Hepatology.* — 2005. — Vol. 42, N 4 (suppl. 1). — P. 503.
16. *Tsikrikoni A., Kyriakou D.S., Rigopoulou E.I.* et al. Markers of cell activation and apoptosis in bone marrow mononuclear cells of patients with autoimmune hepatitis type 1 and primary biliary cirrhosis // *J. Hepatol.* — 2005. — Vol. 42. — P. 393–399.