

# Клинико-эпидемиологическая характеристика и показатели апоптоза у больных хроническими вирусными гепатитами

М.Р.Иванова<sup>1</sup>, В.П.Чуланов<sup>2</sup>, Р.Х.Жемухова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х.М.Бербекова, Нальчик;

<sup>2</sup>Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

В проведенном исследовании выявлено, что на территории Кабардино-Балкарской республики наиболее распространенным генотипом вируса гепатита С является 3a, затем в убывающем порядке 1b и 2. Для вируса гепатита В преобладающими генотипами были D (61%) и A (39%). Исследована концентрация ФНО- $\alpha$ , растворимого Fas-рецептора (sFas) и TRAIL у пациентов с хроническими вирусными гепатитами В, С и гепатитами сочетанной этиологии В+С. Обнаружено, что у всех пациентов с вирусными гепатитами достоверно повышены значения ФНО- $\alpha$  и sFas в сыворотке крови. С другой стороны – происходило достоверное снижение концентрации TRAIL. Степень повышения ФНО- $\alpha$  коррелирует с активностью вирусного процесса и является показателем интенсивности воспаления. Высокие показатели sFas в сыворотке крови во всех группах пациентов, возможно, являются одной из причин снижения активности апоптоза вирус-инфицированных клеток, а снижение уровня TRAIL свидетельствует об избыточном апоптозе, особенно выраженном у больных хроническим вирусным гепатитом С.

*Ключевые слова:* апоптоз, ФНО- $\alpha$ , sFas, TRAIL, вирусные гепатиты

## A clinico-epidemiological characteristic and serum values of apoptosis in patients with chronic viral hepatitis

M.R.Ivanova<sup>1</sup>, V.P.Chulanov<sup>2</sup>, R.Kh.Zhemukhova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Kh.M.Berbekov Kabardino-Balkar State University, Nalchik;

<sup>2</sup>Central Research Institute of Epidemiology, Federal Supervision Service for Consumer Rights Protection and People's Welfare, Moscow

The study has found that on the territory of the Kabardino-Balkar Republic the most common genotype of virus C hepatitis is 3a, then follow 1b and 2, in the descending order. For virus B, the prevalent genotypes were D (61%) and A (39%). The authors studied the concentration of TNF- $\alpha$ , soluble Fas-receptor (sFas) and TRAIL in patients with chronic viral hepatitis B and C, and hepatitis with combined etiology B+C. As has been found, in all patients with viral hepatitis TNF- $\alpha$  and sFas values in blood serum were reliably elevated. On the other hand, TRAIL concentrations were reliably decreasing. The degree of TNF- $\alpha$  elevation correlates with the activity of viral process and is indicative of the intensiveness of inflammation. High values of sFas in blood serum in all groups of patients might be one of the causes of a decreased activity of apoptosis of virus-infected cells, and decreased levels of TRAIL indicate excess apoptosis, which is especially marked in patients with chronic viral hepatitis C.

*Key words:* apoptosis, TNF- $\alpha$ , sFas, TRAIL, viral hepatitis

Одной из актуальных проблем современной медицины являются вирусные поражения печени различной этиологии. Вирусный гепатит В (ВГВ) занимает одно из ведущих мест в структуре инфекционной патологии в России, заболеваемость которым колеблется от 18 до 42 на 100 000 населения. В общей структуре вирусных гепатитов на долю гепатита В приходится 10–30% [1, 2]. В настоящее время в мире насчитывается более 170 млн инфицированных вирусом гепатита С, что составляет около 3% населения Земли [3, 4].

В соответствии с современными представлениями, в патогенезе хронических вирусных гепатитов имеют место факторы, которым отводится ведущая роль в персистенции вирусной инфекции и развитии хронического поражения печени. Эти факторы, связаны, с одной стороны, с иммунной системой хозяина, а с другой – с генетическими особенностями вируса. На основании анализа гомологии нуклеотидных последовательностей генома ВГВ идентифицировано 8 генотипов (А–Н), но только генотипы А и D широко распространены в западноевропейской популяции, где они встречаются почти у 90% всех инфицированных [5, 6]. К настоящему моменту описано 6 генотипов вируса гепатита С (ВГС), каждый из которых подразделяется на несколько подтипов. В ряде исследований были выявлены географические различия в распространении генотипов ВГС и некоторые особенности клинического течения [7, 8]. В Российской Федерации наиболее распространены генотипы 1b и 3a; генотипы 2 и 1a встреча-

### Для корреспонденции:

Иванова Марина Руслановна, доктор медицинских наук, профессор кафедры инфекционных болезней медицинского факультета Кабардино-Балкарского государственного университета

Адрес: 360004, КБР, Нальчик, ул. Чернышевского, 175

Телефон: (8662) 40-7447

E-mail: marina19692003@list.ru

Статья поступила 23.06.2009 г., принята к печати 15.09.2009 г.

ются значительно реже, а генотипы 4, 5 и 6 регистрируются только как завозные случаи. Одной из задач нашего исследования было установление распространенности преобладающих генотипов вирусов гепатита В и С на территории Кабардино-Балкарской республики.

Программируемая клеточная гибель, или апоптоз, является важнейшим механизмом контроля клеточной популяции в многоклеточном организме. Наиболее хорошо изучена последовательность событий, приводящих клетку к апоптозу в результате взаимодействия белков из семейства фактора некроза опухоли (ФНО) со специфическими рецепторами [2, 4]. Ярким представителем этой группы белков является система Fas/Fas-L. Fas-L является цитокином из ФНО-семейства, экспрессируется на поверхности различных клеток, в том числе на активированных Т-лимфоцитах и натуральных киллерах [9]. Возможным механизмом «Fas-рецепторной недостаточности» при вирусных хронических инфекциях является увеличение содержания растворимого Fas26-рецептора (sFas), продукта альтернативного сплайсинга mРНК FasR и протеолитического отщепления трансмембранного FasR. ФНО- $\alpha$  – один из основных цитокинов, способных оказывать прямое повреждающее действие на клетки-мишени и лизировать клетки, инфицированные вирусом; является необходимым и в то же время достаточным индуктором местных и системных воспалительных реакций [9]. ФНО также является индуктором апоптоза и воспринимается рецепторами, по структуре напоминающими Fas [2]. TRAIL – ФНО-зависимый агент, индуцирующий апоптоз. Наиболее известный биологический эффект этого цитокина – усиление апоптоза раковых клеток [10]. Перспективной задачей современной иммунологии является поиск путей модуляции механизма работы клеток в направлении стимуляции апоптоза. В связи с этим, целью исследования было определение содержания сывороточного ФНО- $\alpha$ , sFas и TRAIL в крови пациентов, больных вирусными гепатитами.

### Пациенты и методы

Под нашим наблюдением находилось 155 больных хроническими вирусными гепатитами в возрасте от 18 до 76 лет, которые проходили стационарное лечение в центре по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями Министерства здравоохранения и социального развития Кабардино-Балкарской Республики. Преобладали лица мужского пола (88%). Из них – 76 больных с хроническим гепатитом В (ХГВ), 37 пациентов с хроническим гепатитом С (ХГС) и 38 – с хроническим вирусным гепатитом сочетанной этиологии В+С. При ХГВ длительность заболевания к моменту поступления составляла 7,8 года, при ХГС – 11,2 года и при хроническом вирусном гепатите сочетанной этиологии – 5,6 года. Из числа всех обследованных 48% пациентов были парентеральными потребителями наркотиков. У 75% пациентов отсутствовали указания на перенесенный острый гепатит в анамнезе. Все пациенты распределялись по уровню клинико-биохимической активности: 32 больных с минимальной активностью (аланинаминотрансфераза (АЛТ) превышает верхнюю границу нормы менее чем в 2 раза), 77 – с умеренной степенью активности (АЛТ превышает верхнюю границу нормы в 2–4 раза) и 46 – с высокой степенью активности (АЛТ превышает верх-

нюю границу нормы более чем в 4 раза). Больные получали симптоматическое лечение без включения противовирусных препаратов. Диагноз был поставлен на основании клинико-эпидемиологических данных и результатов лабораторных исследований. Всем пациентам проводилось определение маркеров вирусных гепатитов методом ИФА (тест-системы «Вектор-Бест», Россия), ДНК ВГВ, РНК ВГС, РНК вирусного гепатита дельта, а также определение генотипа ВГС методом полимеразной цепной реакции с использованием тест-систем «АмплиСенс» (ФГУН «ЦНИИЭ Роспотребнадзора», Россия), генотипирование ВГВ проводилось методом прямого секвенирования S-гена с последующим филогенетическим анализом. Оценку содержания в сыворотке sFas проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием стандартной тест-системы «human sAPO-1/Fas ELISA BMS245» (Bender MedSystems). Определение уровня TRAIL в сыворотке крови также проводили методом твердофазного ИФА с использованием стандартной тест-системы «human TRAIL ELISA» (Biosource). Исследование уровня ФНО- $\alpha$  в сыворотке крови пациентов проводили с помощью тест-системы «Протеиновый контур» (Санкт-Петербург, Россия). Полученные результаты сравнивали с показателями контрольной группы, состоящей из 15 практически здоровых доноров Республиканской станции переливания крови г. Нальчика. Результаты проведенных исследований обработаны при использовании компьютерных программ Microsoft Excel и Statistica с применением методов вариационной статистики, регрессивного и корреляционного анализов.

### Результаты исследования и их обсуждение

При определении генотипа вируса у 42 пациентов с ХГС, включая и гепатиты сочетанной этиологии В+С, было получено следующее соотношение: 16 больных (38%) имели генотип 1b, 21 (50%) – 3a и 5 (12%) – генотип 2 (рисунок). Как свидетельствуют полученные данные, на территории Кабардино-Балкарской республики превалирует 3a генотип, в убывающем порядке встречаются генотипы 1b и 2. Генотип 1b также широко распространен на территории СНГ [11]. При генотипировании 67 больных с ХГВ, включая гепатиты сочетанной этиологии В+С, оказалось, что в 61% инфицирование произошло генотипом D и в 39% случаев – генотипом A.

При исследовании сыворотки крови у больных гепатитами определялось повышение концентрации исследуемого ФНО- $\alpha$

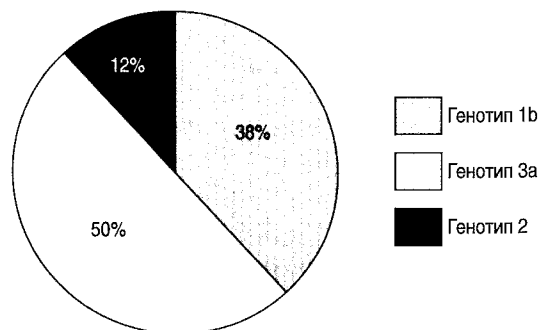


Рисунок. Распределение генотипов вируса гепатита С у исследуемых больных.

Таблица. Показатели содержания ФНО- $\alpha$ , sFas и TRAIL в сыворотке крови у больных хроническими вирусными гепатитами (пг/мл)

Группа пациентов	Показатель	При поступлении в стационар	Через 30 суток
Вирусные гепатиты			
	ХГВ	ФНО- $\alpha$ (n = 30; 17) 55,0 $\pm$ 1,6 <sup>1,3</sup> sFas (n = 46; 22) 1739,0 $\pm$ 64,7 <sup>1,3</sup> TRAIL (n = 29; 18) 119 $\pm$ 13,0 <sup>1,3</sup>	64,0 $\pm$ 2,1 <sup>1,2,3</sup> 1652,0 $\pm$ 123,5 <sup>1,3</sup> 107 $\pm$ 16,2 <sup>1</sup>
	ХГС	ФНО- $\alpha$ (n = 20; 14) 41,0 $\pm$ 3,3 <sup>1</sup> sFas (n = 20; 15) 2366,0 $\pm$ 85,7 <sup>1</sup> TRAIL (n = 15; 11) 55 $\pm$ 19,6 <sup>1</sup>	35,0 $\pm$ 1,2 <sup>1</sup> 2317 $\pm$ 74,6 <sup>1</sup> 78 $\pm$ 22,4 <sup>1</sup>
Хронический гепатит В+С			
	ФНО- $\alpha$ (n = 27; 19) 48 $\pm$ 1,9 <sup>1</sup> sFas (n = 25; 17) 2177 $\pm$ 73,3 <sup>1</sup> TRAIL (n = 15; 12) 112 $\pm$ 21,7 <sup>1</sup>	49 $\pm$ 3,6 <sup>1,3</sup> 1488 $\pm$ 154,4 <sup>1,2,3</sup> 105 $\pm$ 24,3 <sup>1</sup>	
	Здоровые доноры (n = 15)	ФНО- $\alpha$ 18,0 $\pm$ 2,0 <sup>1</sup> sFas 1250,5 $\pm$ 135,5 <sup>1</sup> TRAIL 199 $\pm$ 5,3	– – –

<sup>1</sup> достоверность различий по отношению к показателям доноров,  $p < 0,001$ ;  
<sup>2</sup> достоверность различий по отношению к показателям предыдущего периода,  $p < 0,001$ ;  
<sup>3</sup> достоверность различий к показателям у больных ХГС,  $p < 0,001$ .

при поступлении больных в стационар, причем достоверно более выраженное у больных с ХГВ, по сравнению с больными ХГС и хроническим вирусным гепатитом сочетанной этиологии В+С. Причем, к норме эти показатели не приходили в изучаемых группах и перед выпиской из стационара (таблица). Однонаправленная тенденция определялась и при изучении sFas в сыворотке крови. Выявлялись достоверно более высокие значения изучаемого показателя во всех исследуемых группах по сравнению со значениями доноров. Так же, как и при изучении концентрации ФНО- $\alpha$ , ни в одной из исследуемых групп показатели sFas не пришли к норме перед выпиской больных из стационара при биохимических параметрах, не отличающихся от контрольных значений (таблица). Достоверно более высокие значения ФНО- $\alpha$  – сывороточного маркера апоптоза – у больных ХГС даже перед выпиской больных из стационара при нормализации клинико-биохимических параметров в этой группе больных указывают на продолжающиеся апоптотические реакции, запущенные ВГС, что косвенно определяет его более высокий онкогенный потенциал [12]. Обратные значения были получены при определении концентрации TRAIL в сыворотке крови больных. Происходило достоверное снижение концентрации исследуемого показателя у всех больных. Наиболее низкие значения определялись у больных ХГС, что еще раз подтверждает ведущую роль апоптоза в патогенезе данной патологии [13].

### Заключение

На территории Кабардино-Балкарской республики наиболее часто встречаются генотипы ВГС 3а (50%) и 1b (38%), однако преобладание генотипа 3а отличает данный регион от других регионов России, в которых, как правило, преобладает генотип 1b. Учитывая значительные отличия в алгоритмах лечения ХГС, вызванного генотипами 1b и 3а, данную особенность распределения генотипов необходимо учитывать при планировании региональных программ лечения. Среди преобладающих генотипов ВГВ определяется генотип D (61%), однако удельный вес генотипа А (39%) в Кабардино-Балкарской республике значительно выше, чем в европейской части России [14], что требует дальнейшего изучения.

Выявленные высокие титры провоспалительного цитокина ФНО- $\alpha$ , которые как в период стационарного лечения, так и перед выпиской больных из стационара превышали контрольные значения, демонстрируют высокую активность провоспалительных процессов и, безусловно, являются одним из основных патогенетических факторов в прогрессировании хронического течения инфекции. В случае наличия высоких концентраций растворимого sFas часть проапоптотических сигналов оказывается в связанном состоянии, что приводит к нарушению элиминации клеток, несущих вирусный геном, что создает предпосылки для дальнейшей персистенции инфекции. Снижение концентрации TRAIL в сыворотке крови указывает на выраженность апоптотических процессов, на активное связывание данного медиатора с чувствительными к нему рецепторами (в том числе и на гепатоцитах) и дальнейшее прогрессирование воспалительных процессов в ткани печени.

### Литература

1. Майер К.-П. Гепатит и последствия гепатита. М., 1999; 423.
2. Цыган В.Н. Актуальные проблемы иммунологии. СПб.: Гуманистика, 2004; 47.
3. Ющук Н.Д., Венгеров Ю.А. Лекции по инфекционным болезням. М., 1999.
4. Bamberger A.M., Schulte H.M., Thuncke I. Expression of the apoptosis-inducing Fas ligand (FasL) in human first and third trimester placenta and choriocarcinoma cells. J Clin Endocrinol Metab. 1997; 82(9): 3173–75.
5. Lindh M., Andersson A.S., Gusdal A. J Infect. Dis. 1997; 175: 1285–93.
6. Norder H., Courouce A.M., Magnus L.O. Virology 1994; 198: 489–503.
7. Berkes J., Cotler S.J. Global epidemiology of HCV infection. Curr. Hep. Rep. 2005; 4(4):125–9.
8. Hwang S.I., Lee S.D., Lu R.H., et al. Relationship between genotypes of hepatitis C virus and histopathological manifestation in chronic hepatitis C patients. J Gastroenterol. Hepatol. 2000; 12(3): 299–304.
9. Simmons H.U. Neutrophils apoptosis pathways and their modification in inflammation. Immunol. Rev. 2003; 193: 101–10.
10. Ki M. Kim et al. Pretreatment of acetylsalicylic acid promotes tumor nekrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by down-regulating BCL-2 gene expression. J of Biological Chemistry. 2005; 3: 2123–30.
11. Соринсон С.Н. Вирусные гепатиты 2-е изд. СПб.: Геза, 1998.
12. Бойчук С.В., Шаймарданов Р.Ш., Миннебаев М.М. и др. Некроз и апоптоз гепатоцитов и оценка некоторых биохимических параметров крови у больных с механической желтухой опухолевого генеза. Рос. журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии 2007; 6(27): 32–7.
13. Буеверов А.О., Грязин А.Е. Клинические аспекты изучения апоптоза при хронических вирусных гепатитах. Рос. журнал гастроэнтер., гепатол. и колопроктол. 2006; 2: 4–10.
14. Орлов С.Г., Мязин А.Е., Чуланов В.П. Распространенность генотипов вируса гепатита В среди лиц, хронически инфицированных вирусом гепатита В в г. Москве и Московской области. Материалы российской научно-практической конференции «Генодиагностика инфекционных болезней» 25–27 октября 2005 г., «Сосновка». Новосибирская обл. 2005; 56–8.

### Информация о соавторах:

Чуланов Владимир Петрович, кандидат медицинских наук, заведующий научно-консультативным клинико-диагностическим центром Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора  
 Адрес: 111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3а  
 Телефон: (495) 974-9646

Жемухова Римма Хусейновна, аспирант кафедры инфекционных болезней медицинского факультета Кабардино-Балкарского государственного университета  
 Адрес: 360004, КБР, Нальчик, ул. Чернышевского, 175  
 Телефон: (8662) 40-7447