УДК 613.6–616.36

В.М. Мицура[1], С.Б. Мельнов[2]

Мутагенный потенциал вируса гепатита С

[1]Гомельский государственный медицинский университет, Гомель
[2]Международный государственный экологический университет им. А.Д. Сахарова, Минск

Резюме. *Представлен методический подход определения мутагенного потенциала вируса гепатита С путем исследования параметров цитогенетического статуса и кластогенности образцов сыворотки крови у пациентов, больных хроническим гепатитом С. Установлено, что у пациентов, больных хроническим гепатитом С, частота хромосомных аберраций (4,26%) и аберрантных клеток (5,14%) значительно выше, чем в контрольной группе (2,23 и 2,05% соответственно, $p<0,01$). Высокая частота аберрантных клеток обусловлена, прежде всего, увеличением числа дицентрических и кольцевых хромосом ($p<0,001$), а также полиплоидных клеток ($p<0,001$). Сыворотка крови пациентов содержит кластогенные факторы, что подтверждается значимо большей частотой выявления микроядер и клеток с микроядрами в культуре иммортализированных кератиноцитов по сравнению с контрольной группой ($p=0,011$ и $p=0,004$ соответственно). У пациентов, страдающих хроническим гепатитом С, чаще встречаются клетки с одним ($p=0,001$) и двумя микроядрами ($p=0,009$). В целом, хромосомные аберрации и кластогенность сыворотки крови пациентов, страдающих хроническим гепатитом С, встречаются чаще, чем в контрольной группе, что подтверждает мутагенный потенциал вируса гепатита С. Это, возможно, способствует неэффективности иммунного ответа и развитию гепатоцеллюлярной карциномы при хроническом гепатите С.*

Ключевые слова: *цитогенетический статус, кластогенные факторы, хронический гепатит С, хромосомные аберрации, мутагенный потенциал, иммунный ответ.*

Введение. Вирусом гепатита С (ВГС) инфицировано 1–2% населения развитых стран [9]. Хронический вирусный гепатит С (ХГС) является одной из наиболее частых причин развития цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы. В последние годы изучение ВГС значительно интенсифицировалось с помощью обладающих высокой специфичностью модификаций полимеразной цепной реакции, а также in situ гибридизации и методик обнаружения антигенов вируса в клетках. Основным местом размножения ВГС являются гепатоциты, однако вирус может размножаться и в периферических мононуклеарных клетках крови, в нейтрофилах, эритроцитах, тромбоцитах, в клетках костного мозга, селезенки и лимфатических узлов [10, 13]. По данным Е.И. Лакина, А.А. Кущ [4] и И.В. Шахгильдян, М.И. Михайлов, Г.Г. Онищенко [9], геномная рибонуклеиновая кислота ВГС в лимфоцитах периферической крови определяется у 24–100% больных ХГС, а доля инфицированных клеток составляет 0,2–8,1%. ВГС обладает высокой генетической вариабельностью, онкогенным потенциалом и, в отличие от вируса гепатита В (ВГВ), не встраивается в хромосомы клеток больного [8].

Известно, что полноценный иммунный ответ базируется на полноценно функционирующем геноме, а клетки с поврежденным геномом в первую очередь подвергаются апоптозу [5]. Повреждение генетического аппарата лимфоцитов периферической крови способствует длительной персистенции вируса и развитию иммунной недостаточности [7]. При изучении субпопуляций лимфоцитов периферической крови у больных ХГС многие авторы описывают количественные нарушения иммунных клеток: снижение количества Т-лимфоцитов (CD3), $CD4^+$, $CD8^+$ и $CD16^+$ клеток со снижением иммунорегуляторного индекса (CD4/CD8) и повышением количества В-лимфоцитов и малодифференцированных лимфоцитов [2]. Установлены существенные изменения цитогенетических показателей лимфоцитов при хроническом ВГВ- и ВГС, достоверное увеличение доли клеток со структурными хромосомными аберрациями (одиночные фрагменты), снижение репарации дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) [1, 7]. Выявлено, что у больных ХГС уровень хроматидных (фрагменты, делеции) и хромосомных аберраций достоверно выше, чем у больных хроническим гепатитом В [1].

Установлено, что в сыворотке крови лиц, пострадавших в результате ликвидации последствий аварии на Чернобыльской АЭС или проживания на загрязненной радионуклидами территории, наблюдается повышенное содержание кластогенных факторов (КФ), которые впервые были обнаружены в плазме у лиц подвергшихся случайному воздействию ионизирующих излучений или получавших радиотерапию [11]. КФ представляют собой смесь прооксидантов, обладающих хромосомоповреждающими свойствами. Они образуются не только в результате действия ионизирующего излучения, но также наблюдаются и при различных патологических состояниях – у пациентов с хроническими воспалительными заболеваниями соединительной ткани и пищеварительного тракта, инфцированных вирусом иммунодефицита человека.

Микроядерный анализ в настоящее время широко используется как для генетического мониторинга популяций, так и для оценки мутагенных эффектов in vitro. Эта методика также применима и для оценки индивидуальной чувствительности как к физическим, так и к химическим мутагенам [6].

КФ (то есть повреждающие хромосомы) присутствуют в плазме при многочисленных патологических состояниях, сопровождаемых окислительным стрессом. Супероксидные радикалы являются не прямыми ДНК-повреждающими агентами, а инициаторами целой серии событий, приводящих к формированию КФ. При биохимическом анализе процесса формирования КФ было обнаружено 3 основных класса химических веществ [11, 12]: 1) продукты перекисного окисления липидов, такие как гидроперекись, малоновый диальдегид и 4-гидроксиноненал; 2) цитокины, такие как фактор некроза опухолей альфа; 3) нуклеотиды, такие как инозин-ди- и трифосфат. Формирование КФ через образование супероксидных радикалов, а также обратный процесс, образуют цепь (порочный круг), ответственную за самовоспроизводящийся во времени окислительный стресс и долгосрочные генотоксические эффекты.

При ХГС закономерно повышаются уровни фактора некроза опухолей альфа, развивается окислительный стресс, усилен апоптоз мононуклеарных клеток крови [3, 6]. Следует ожидать увеличение кластогенности сыворотки пациентов с ХГС.

Цель исследования. Определение мутагенного потенциала вируса гепатита С путем исследования параметров цитогенетического статуса и кластогенности образцов сыворотки крови у пациентов, страдающих ХГС.

Материалы и методы. Обследован цитогенетический статус 14 больных ХГС (8 мужчин и 6 женщин, в возрасте 37,3±2,7 лет). Группой контроля служили 129 клинически здоровых лиц, не имеющих маркеров инфекции ВГС.

Оценку состояния генома проводили с помощью классического цитогенетического анализа. Объектом изучения явились лимфоциты периферической крови. Собранную венепункцией кровь культивировали 48 ч в питательной среде (среда RPMI-1640 и 15% эмбриональной телячьей сыворотки) с добавлением фитогемагглютинина «ПанЭко» (Россия), деление клеток останавливали на 45 ч на стадии метафазы с помощью колхицина. После трехкратной фиксации пробы раскапывали на предметные стекла и приготовленные препараты окрашивали красителем Романовского – Гимзы. Цитогенетический анализ проводился на микроскопе «Nikon» (Япония) при увеличении 1000. Учитывались все типы аберраций хромосом, идентифицируемые без кариотипирования – одиночные и парные фрагменты, дицентрические и кольцевые хромосомы, полиплоидные клетки, а также общее число аберраций и аберрантных клеток. Общее количество проанализированных метафазных пластинок – 2708, в контроле – 27917.

Для изучения кластогенности сыворотки крови обследовано 25 больных ХГС, из которых у 20 имелись признаки цирроза печени. В качестве контроля исследованы сыворотки 11 клинически здоровых лиц, не имевших в анамнезе контакта с дополнительными радиационными воздействиями. У пациентов и лиц контрольной группы проводили забор крови с соблюдением всех правил асептики и антисептики в вакутейнеры для получения сыворотки («Becton Dickinson»), центрифугировали при 2000 g в течение 10 мин, стерильно отбирали сыворотку, разливали на аликвоты по 1 мл, замораживали и хранили при –20°С до использования. Перед заморозкой сыворотка фильтровалась через 0,22 мкм фильтр («Nalgene») с целью удаления всех компонентов, способных нарушить рост культуры, а также с целью удаления всех резидуальных клеточных компонентов крови.

Тест-система – кератиноциты человека, иммортализованные вирусом папилломы человека (ВПЧ) 16 (ВПЧ-G клетки). В этой культуре отсутствуют протеины p53 и RB в связи с их связыванием E6 и E7. Кератиноциты человека культивировались в смеси сред Дульбеко MEM и F12 (1:1) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, стандартного количества смеси антибиотиков (пенициллин и стрептомицин), 1% L-глютамина и 1 мкг/мл гидрокортизона («Gibco», Irvine, UK) в 80 см^2 флаконах. Клетки инкубировались в термостате при 37°С в присутствии 5% CO_2. При конфлюентности в 80–100% среда из флакона с клеточной культурой удалялась, клетки промывались стерильным PBS и вносилось 10 мл смеси версена (10 нМ) и трипсина (0,25% в сбалансированном солевом растворе Хэнкса) в соотношении 1:1 («Gibco», Irvine, UK) и помещались в термостат на 11 мин для отделения клеток со дна флакона. Затем клеточную суспензию добавляли в равное количество среды Дульбеко MEM F-12 с целью нейтрализации трипсина. В таком состоянии клетки могут быть посеяны в необходимом количестве. Для экспериментальной работы суспензия высевалась в малые культуральные флаконы (24 см^2) в количестве 1 мл (6×10^3 клеток) с добавлением 5 мл полной среды.

Введение сыворотки в культуру производилось через 1–2 суток после посева и клетки вновь помещались в термостат. Через 1–1,5 ч вводился цитохалазин Б в концентрации 7 мкг/мл, после чего клетки вновь инкубировались в течение 24 ч. Затем удаляли культуральную среду, промывали физиологическим раствором и фиксировали клетки охлажденным фиксатором Карнуа (3 смены фиксатора, время фиксирования – 10–15 мл). Затем флаконы высушивались при 37°С и окрашивались 10% раствором Романовского – Гимзы. Подсчет микроядер проводился на инвертированном микроскопе при увеличении 400. Результаты подсчета (в анализ брали 1000 биядерных клеток/флакон) регистрировали с учетом количества микроядер на одну биядерную клетку.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программы MS Excel 2002 и

Statistica v.6.0. Для оценки значимости различия относительных величин частоты в независимых группах был применен t-критерий Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. Результаты цитогенетического анализа у больных ХГС и лиц контрольной группы представлены в таблице 1.

Таблица 1

Цитогенетический статус больных ХГС и лиц контрольной группы

Показатель	ХГС, n=14	Контроль, n=129	p
Метафаз в анализе	2708	27917	–
Одиночные фрагменты, %	2,64±0,42	1,59±0,15	=0,086
Парные фрагменты, %	1,15±0,26	0,71±0,08	=0,177
Дицентрики и кольца, %	0,97±0,28	0,06±0,01	<0,001
Полиплоидные клетки, %	0,41±0,22	0,02±0,01	<0,001
Всего аберраций, %	4,26±0,49	2,23±0,19	=0,006
Аберрантные клетки, %	5,14±0,65	2,05±0,17	<0,001

У больных ХГС отмечается увеличение общей генетической нестабильности, что выражается в значительном росте аберраций и аберрантных клеток (4,26±0,49 и 5,14±0,65 соответственно) по сравнению с аналогичными показателями контрольной группы (2,23±0,19 и 2,05±0,17 соответственно). Высокая частота аберрантных клеток обусловлена прежде всего увеличением числа дицентрических и кольцевых хромосом, а также полиплоидных клеток (во всех случаях p<0,01). Имеется тенденция к более частому выявлению одиночных и парных фрагментов хромосом, но статистически значимых различий не выявлено, вероятно, в связи с небольшим объемом обследуемой группы.

Известно, что по частоте клеток с микроядрами и частоте микроядер в контроле можно судить об уровне спонтанного мутагенеза. Выявлено, что доля клеток с двумя и с тремя микроядрами невелика, основная масса клеток имеет одно микроядро. При этом у больных ХГС по сравнению с группой контроля общая частота выявления микроядер и частота клеток с микроядрами были значимо выше (p=0,011 и p=0,004 соответственно). У больных ХГС чаще встречались клетки с одним микроядром (p=0,001) и двумя микроядрами (p=0,009). Несколько чаще при ХГС выявлялись клетки с тремя микроядрами, однако статистически значимых различий не выявлено (p=0,22), таблица 2.

Таким образом, в сыворотке крови больных ХГС присутствовали кластогенные факторы. Вирус гепатита С размножается в цитоплазме клетки, не проникая в ядро, поэтому не должен вызывать повреждение хромосом. Вероятно, в сыворотках крови больных ХГС имеются прооксиданты или провоспалительные цитокины, вызывающие индукцию микроядер.

Заключение. Хромосомные аберрации у пациентов, больных хроническим гепатитом С встречаются чаще, чем в контрольной группе, что подтверждает мутагенный потенциал вируса гепатита С. Сыворотка больных ХГС содержит кластогенные факторы, вызывающие образование микроядер в культуре иммортализированных кератиноцитов. Это, возможно, способствует неэффективности иммунного ответа и развитию гепатоцеллюлярной карциномы при ХГС. В целом, представленные данные указывают на эффективность использованного методического подхода, основанного на использовании культуральной клеточной линии с блокированной активностью гена p53 (т.е. с инактивированной одной контрольной точкой клеточного цикла).

Литература

1. Бариляк, И.Р. Цитогенетические нарушения у больных хроническими гепатитами В и С / И.Р. Бариляк [и др.] // Цитология и генетика. – 2000. – Т.34, №4. – С. 3 – 5.
2. Бондаренко, А.Л. Клинико-иммуногенетические аспекты хронической HCV- инфекции / А.Л. Бондаренко [и др.] // Эпидемиол. и инфекц. бол. – 2002. – № 2. – С. 37–40.
3. Буеверов, А.О. Апоптоз мононуклеаров периферической крови и оценка эффективности противовирусной терапии хронического гепатита С / А.О. Буеверов [и др.] // Клиническая медицина. – 2006. – № 9. – С. 39–44.
4. Лакина, Е.И. РНК вируса гепатита С в организме больных хроническим гепатитом С / Е.И. Лакина, А.А. Кущ // Вопросы вирусологии. – 2002. – № 2. – С. 4–11.
5. Мельнов, С.Б. Молекулярно-генетические аспекты экологического неблагополучия (возможности проточной цитофлуориметрии) / С.Б. Мельнов. – Мн.: Белорусский комитет «Дзеці Чарнобыля», 2004. – 294 с.
6. Радченко, В.Г. Оптимизация этиопатогенетической терапии хронического гепатита С: Пособие для врачей-терапевтов, гастроэнтерологов, гепатологов, инфекционистов / В.Г. Радченко, В.В. Стельмах, В.К. Козлов. – СПб.: СПбГМА, 2004. – 168 с.
7. Рязанцева, Н.В. Изменения цитогенетического статуса лимфоцитов периферической крови при хронических HBV- и HCV- инфекциях / Н.В. Рязанцева [и др.] // Рос. журн. гастроэнтерол. – 2004. – № 1. – С. 37–40.
8. Соринсон, С.Н. Вирусные гепатиты / С.Н. Соринсон. – 2-е изд. – СПб.: Теза, 1998. – 325 с.

Таблица 2

Кластогенный эффект сыворотки группы контроля и больных ХГС

Группа	Клеток в анализе	Частота клеток с микроядрами (МЯ), ‰			Частота МЯ, ‰	Частота клеток с МЯ, ‰
		1 МЯ	2 МЯ	3 МЯ		
Контроль, n= 11	11000	77,4±11,1	6,5±1,6	0,44±0,3	91,8±12,4	84,3±11,5
ХГС n=25	25245	117,4±8,4	10,8±1,2	0,72±0,28	134,8±14,1	134,5±14,1
p<	–	0,001	0,009	0,22	0,011	0,004

9. Шахгильдян, И.В. Парентеральные вирусные гепатиты (эпидемиология, диагностика, профилактика) / И.В. Шахгильдян, М.И. Михайлов, Г.Г. Онищенко. – М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2003. – 384 с.

10. Ющук, Н.Д. Закономерности персистенции HCV в плазме и лейкоцитах при хронической HCV-инфекции / Н.Д. Ющук [и др.] // Рос. журн. гастроэнтерол. – 2000. – № 4. – С. 59–63.

11. Emerit, I. Clastogenic factors as biomarkers of oxidative stress after radiation exposure / I. Emerit // Int. j. radiat. med. – 1999. – Vol. 2. – P. 25–33.

12. Emerit, I. Transferable clastogenic activity in plasma from persons exposed as salvage personnel of the Chernobyl reactor / I. Emerit [et al.] // J. cancer res. clin. oncol. – 1994. – Vol. 120. – P.558–561.

13. Muller, H.M. Peripheral blood leukocytes as a possible extrahepatic site for hepatitis C virus replication / H.M. Muller [et al.] // J. gen. virol. – 1993. – № 74. – P. 669–676.

V.M. Mitsura, S.B. Melnov

Mutagenic potential of hepatitis C virus

Abstract. *The methodical approach of defining the mutagenic potential of hepatitis C virus by examining the parameters of cytogenetic status and clastogenic serum samples from patients with chronic hepatitis C is presented. It was found that in patients with chronic hepatitis C frequency of chromosomal aberrations (4,26%) and aberrant cells (5,14%) is significantly higher than in the control group (2,23 and 2,05%, respectively, p<0,01). High frequency of aberrant cells caused primarily by the increase in dicentric and ring chromosomes (p<0,001), and polyploid cells (p <0,001). Serum of patients contains clastogenic factors as evidenced significantly greater frequency of micronuclei and detection of cells with micronuclei in culture immortalized keratinocytes compared to controls (p=0,011 and p=0,004, respectively). Patients with chronic hepatitis C have more common cells with one (p=0,001) and two micronuclei (p=0,009). In general, chromosomal aberrations and clastogenicity serum of patients suffering from chronic hepatitis C is more common than in the control group, confirming the mutagenic potential of hepatitis C virus. This may contribute to the inefficiency of the immune response and the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C.*

Key words*: *cytogenetic status, clastogenic factors, chronic hepatitis C, chromosomal aberrations, mutagenic potential, immune response.

Контактный телефон: +375-296-471-710; e-mail: mitsura_victor@tut.by