**На правах рукописи**

**НАЧАРОВ Петр Васильевич**

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА ПРИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

**14.00.10—инфекционные болезни**

**АВТОРЕФЕPAT диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук**

**САНКТ-ПЕТЕРБУРГ**

**1997**

**Работа выполнена в Военно-медицинской академии.**

**Научный руководитель:**

**доктор медицинских наук Е. И. Змушко.**

**Научный консультант:**

**доктор медицинских наук профессор Ю. В. Лобзин.**

**Официальные оппоненты:**

**доктор медицинских наук профессор В. В. Иванова, доктор медицинских наук профессор А. Г. Рахманова.**

**Ведущее учреждение—Российский научно-методический центр но про­филактике и борьбе со СПИДом.**

**Защита диссертации состоится “” ............... 1997 г.**

**в .... часов на заседании специализированного совета Д 106.03.05**

**при Военно-медицинской академии (194044, г. Санкт-Петербург, ул. Лебе­дева, 6).**

**С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке академии.**

**Автореферат разослан**

**1997 г.**

**Ученый секретарь диссертационного совета доктор медицинских наук профессор Ю. И. Ляшенко**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В России вопросы стратегии и тактики борьбы с ВИЧ-инфекцией определены работами В.И.Покровского (1988: 1989; 1993). В.И.Покровский (1987) предсказал грядущий размах распространения ВИЧ-инфекции в стране и внед­рил в практическое здравоохранение структуру, предназначенную для борьбы со СПИДом.

В настоящее время ВИЧ-инфекция охватила все страны мира. К середине 1996 года общее количество инфицированных вирусом иммуно­дефицита во всем мире достигло 27,9 миллионов человек (Рахманова А.Г., 1996).

Несмотря на то, что выполнен беспрецедентно большой объем на­учных исследований по. проблеме ВИЧ-инфекции, предложены методы ле­карственной терапии, позволяющие добиваться временного улучшения состояния больных СПИДом. до настоящего времени не известен ни один достоверный случай выздоровления, поэтому СПИД считают бо­лезнью с летальностью 100%.

Проблема ВИЧ-инфекции усугубляется еще и тем фактом, что с начала девяностых годов ВИЧ все более и более завоевывает основную популяцию населения, в то время как в течение первых десяти лет распространение шло преимущественно среди определенных групп насе­ления, так называемых "групп риска" - наркоманы, гомосексуалисты. проститутки, больные гемофилией (Лобзин Ю.В., Казанцев А.П.. 1996).

Актуальность проблемы определяет неуправляемое интенсивное возрастание случаев инфицированности, болезненности и смертности во всех странах мира (Шувалова Е.П., 1995). Выявление ВИЧ-инфицированных лиц не приводит к прекращению передачи ВИЧ от них, нес­мотря на уведомление их об уголовной ответственности за заражение (Покровский В.В. с соавт., 1996). Не решенными остаются основные проблемы СПИДа (Белозеров Е.С. с соавт., 1995):

- отсутствие методов ранней диагностики:

- полная неуправляемость патологических процессов у заболев­шего:

- отсутствие надежных клинических и лабораторных показателей перехода инфекционного процесса из латентной стадии в манифестную.

При СПИДе и ВИЧ-инфекции достаточно хорошо изучены основные лабораторные диагностические показатели, свидетельствующие об инфицированности (Змушко Е.И. с соавт., 1996). Однако вопросы прог­нозирования клинического течения ВИЧ-инфекции требуют дальнейшего изучения. Наибольшее клиническое значение имеет прогноз перехода от бессимптомной фазы к персистирующей генерализованной лимфаденопатии (ПГЛ), а также от ПГЛ к стадии вторичных заболеваний, кото­рый важен для своевременного назначения этиотропных и патогенети­ческих средств (Рахманова А.Г.. Чайка Н.А., 1989).

При поиске новых тестов, которые давали бы представление о состоянии иммунокомпетентных клеток крови при ВИЧ-инфекции, обра­тила на себя внимание группа сравнительно недавно открытых внут­риклеточных белков, получивших название "белки теплового шока" (БТШ) или "стрессовые белки". Эти белки недостаточно изучены, но уже имеющиеся данные говорят, что они высоко консервативны в про­цессе филогенеза (Lindqulst S., 1986), необычно полифункциональны - играют важную роль во многих внутриклеточных иммунобиохимических процессах как в экстремальных, так и в нормальных условиях (Polla B.S., 1988), что позволяет предположить об участии белков теплового шока в формировании патобиохимических внутриклеточных связей при ВИЧ-инфекции.

В ответ на воздействие неблагоприятных факторов, в том числе и вирусной инфекции, формируется неспецифическая клеточная реак­ция, которая сопровождается усилением процессов свободнорадикального окисления (Иванова В.В. с соавт., 1992: 1996), синтезом бел­ков теплового шока (Kaufman S.H.E.. 1990) и является одним из ме­ханизмов дестабилизации генома клеток-мишеней. В этих условиях не­маловажной представляется роль фермента ксантиноксидазы, которая служит генератором свободных радикалов при ряде патологических состояний клетки и является наиболее значимой среди прооксидантных систем, характерных для лимфоидной клетки (Кожемякин Л.А. с со­авт.. 1992).

Отсутствие в литературе данных по комплексной оценке процес­сов дестабилизации генома, сопряженных с активностью свободнорадикального окисления и системы ксантиноксидазы в иммунокомпетентных клетках крови в динамике развития ВИЧ-инфекции не позволяет опре­делить значимость названных показателей для прогноза клинического течения болезни.

Цель исследования: дать оценку возможности ис­пользования показателей белков теплового шока семейства БТШ-70 и комплекса биохимических изменений в мононуклеарах периферической крови в прогнозировании клинического течения ВИЧ-инфекции.

Для достижения указанной цели необходимо было решить следуюие задачи:

1. Изучить динамику традиционных показателей иммунного стату-а у ВИЧ-инфицированных и определить их прогностическую значимость при переходе клинического течения болезни из одной стадии в дру­гую.

2. Изучить изменения активности ксантиноксидазы, интенсивнос­ти процессов свободнорадикального окисления и показателей неста­бильности генома мононуклеаров периферической крови при ВИЧ-инфек­ции и оценить их прогностическую значимость.

3. Разработать методические подходы к созданию иммунологического метода для количественного и качественного анализа белков семейства БТШ-70.

4. Изучить показатели белков семейства БТШ-70 в мононуклеарах периферической крови на разных фазах ВИЧ-инфекции.

5. Определить взаимосвязь изменений белков семейства БТШ-70 и комплекса биохимических показателей дестабилизации генома. свобод­норадикального окисления и системы ксантиноксидазы мононуклеаров периферической крови у больных в динамике заболевания и оценить их значимость для прогноза клинико-манифестных форм ВИЧ-инфекции.

Научная новизна:

1. Впервые установлено, что нарастание накопления конститу­тивной изоформы белков семейства БТШ-70 в мононуклеарах перифери­ческой крови ВИЧ-инфицированных пропорционально степени выражен­ности клинических проявлений болезни.

2. Показана связь изменения показателей белков семейства БТШ-70 с уровнем нестабильности генома, активностью процессов сво­боднорадикального окисления и системы ксантиноксидазы в мононукле­арах периферической крови у больных ВИЧ-инфекцией в процессе раз­вития клинической картины заболевания.

3. Установлено, что изменение состояния белков семейства БТШ-70 в мононуклеарах периферической крови адекватно отражает ве­роятность перехода ВИЧ-инфекции из бессимптомной фазы в фазу персистирующей генерализованной лимфаденопатии и от персистирующей генерализованной лимфаденопатии к стадии вторичных заболеваний.

4. Установлено, что ВИЧ-инфекция вызывает нарушение реакции белков теплового шока (БТШ-70) мононуклеаров периферической крови в ответ на повреждающие воздействия (гипертермия. ультрафиолетовое облучение).

Практическая значимость работы.

Комплекс показателей, отражающих состояние системы белков теплового шока, системы ксантиноксидазы, процессов свободнорадикального и нестабильности генома мононуклеаров периферической кро­ви, в совокупности с традиционными иммунологическими показателями может быть использован для прогнозирования перехода клинического течения ВИЧ-инфекции из бессимптомной фазы в фазу ПГЛ и от ПГЛ к стадии вторичных заболеваний.

Изучение показателей белков теплового шока мононуклеаров пе­риферической крови человека как защитного механизма неспецифичес­кого действия может может быть применено для оценки эффективности лекарственных средств с иммуномодулирующими свойствами, а также для разработки новых диагностических подходов к прогнозированию иммунодефицитных состояний различной этиологии.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Переход клинического течения заболевания от бессимптомной фазы к персистирующей генерализованной лимфаденопатии (ПГЛ) и от ПГЛ к стадии вторичных заболеваний характеризуется увеличением со­держания конститутивной изоформы семейства БТШ-70 в мононуклеарах периферической крови.

2. Изменения содержания белков семейства БТШ-70 в процессе ВИЧ-инфекции происходят на фоне увеличения показателей нестабиль­ности генома, интенсификации процессов свободнорадикального окис­ления и повышения активности ксантиноксидазы в мононуклеарах пери­ферической крови.

3. Показатели белков семейства БТШ-70 мононуклеаров перифери­ческой крови в совокупности с традиционными иммунологическими по­казателями возможно использовать для прогнозирования перехода кли­нического течения ВИЧ-инфекции из бессимптомной фазы в фазу пер­систирующей генерализованной лимфаденопатии (ПГЛ) и от ПГЛ к ста­дии вторичных заболеваний.

Апробация работы.

Результаты исследований до­ложены на XI-й и XII-й научных конференциях молодых ученых акаде­мии (ВМедА, Ленинград, 1990; ВМедА, Санкт-Петербург, 1992), на

VI-м Всесоюзном биохимическом съезде (Санкт-Петербург, 1992), на Первой международной региональной конференции по ВИЧ-инфекции "Со­циальные и медицинские проблемы СПИДа" (Санкт-Петербург, 1994). на заседании Санкт-Петербургского отделения Российского научного об­щества инфекционистов (Санкт-Петербург, 1996), на IV международной конференции "СПИД, рак и родственные проблемы" (Санкт-Петербург. 1996), на III Всероссийском съезде гематологов и трансфузиологов (Санкт-Петербург. 1996). Материалы диссертации использованы в от­четах по теме НИР N 50-93-В12 "Биохимические механизмы формирова­ния иммунодефицитов под влиянием ВИЧ и иммунодиагностика иммуноде­фицитных состояний больных СПИДом" и по теме НИР N 60-95-П4 "Исс­ледование роли системы белков теплового шока в патогенезе ВИЧ-ин­фекции".

Реализация результатов работы.

По теме диссертации опубликовано 7 научных работ. Результаты работы используются в практике учебного процесса и научно-исследователь­ской работе кафедры инфекционных болезней, кафедры клинической би­охимии и лабораторной диагностики, в работе НИЛ СПИДа и инфекцион­ных заболеваний в ВС РФ Военно-медицинской академии, кафедры ин­фекционных болезней Семипалатинского государственного медицинского института, кафедры ЛОР-болезней с курсом аллергологии и иммуноло­гии Чимкентского государственного медицинского института, кафедры инфекционных болезней Волгоградского государственного медицинского университета.

Объем и структура диссертации.

Диссертация изложена на 171 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, пяти глав собственных исследова­ний. обсуждения полученных результатов, выводов, практических ре­комендаций и списка литературы, включающего 61 отечественный и 140 зарубежных источников. Диссертация иллюстрирована 24 рисунками и 17 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ 1. Общая характеристика больных и методов исследования

В процессе работы были обследованы 34 инфицированных и больных ВИЧ-инфекцией, среди которых преобладали лица мужского пола в возрастной категории от 20 до 39 лет. Клиническое наблюдение и обследование больных проводили в больнице N 30 имени С.П. Боткина г.Санкт-Петербурга, Республиканской клинической инфекционной боль­нице г. Усть-Ижоры Ленинградской области, в Центре по борьбе и профилактике СПИДа г.Санкт-Петербурга.

Больные были распределены по группам в соответствии с клинической классификацией В.И.Покровского (1989). Вич-инфицированных в стадии инкубации и больных в терминальной стадии не обследовали. Контрольную группу составили 25 практически здоровых мужчин (доно­ров крови) в возрасте от 20 до 39 лет - военнослужащие.

Иммунологические и биохимические исследования проводили в Во­енно-медицинской академии, определение белков теплового шока - на базе института цитологии Академии наук.

Диагноз ВИЧ-инфекции верифицировали серологически - по нали­чию в крови специфических антител к ВИЧ с помощью тест-систем для гетерогенного иммуноферментного анализа методом двойных антител (производства фирм СП"ДиаПЛЮС". Россия-Швейцария, СП"Авиценна", Россия-Сирия). Результаты иммуноферментного анализа подтверждали с помощью иммуноблотинга ("Du Pont", США).

Для оценки иммунного статуса у обследованных пациентов изуча­ли следующие показатели: количество лейкоцитов, лимфоцитов; субпо­пуляции Т-лимфоцитов с помощью проточного цитофлюориметра "EPICS-C" (Coulter elektronics. США-Франция) с применением моноклональных антител фирмы "Ortho Diagnostic Systems"(США): РТМЛ с КонА определяли по методу M.George. J.H.Vaughan (1962); количество В-лимфоцитов, несущих Ig M, G, А, определяли методом иммунофлюоресценции с использованием моноспецифических сывороток к иммуноглобулинам человека; концентрации Ig M. G, А, определяли методом радиальной иммунодиффузии в геле (Mancini С. et al.. 1963); содер­жание циркулирующих иммунных комплексов по методу Ю.А.Гриневича. А.Н.Алферова (1981).

Для исследования системы белков теплового шока в мононуклеарах периферической крови ВИЧ-инфицированных была получена панель поликлональных антител. При иммунизации животных и аффинной очист­ки антител применяли препарат белков БТШ-70. Для получения препа­рата БТШ-70 использовали белковый экстракт, полученный из мышечной ткани крупного рогатого скота и клеток культуры HeLa. Выделяли препарат методами ионообменной (с DEAE-сефарозой; и аффинной(с АТФ-агарозой) хроматографии. Чистоту полученных белков БТШ-70 про­веряли при помощи электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия. Препарат БТШ-70 имел чистоту около 98% и содер­жал смесь конститутивной (hsc-70) и индуцибельной (hsp-70) изоформ семейства БТШ-70.

Из иммунной сыворотки кроликов выделяли антитела к БТШ-70 ме­тодами высаливания и аффинной хроматографии на колонках со смесью белков hsc-70 и hsp-70. Каждая серия антител подвергалась проверке на специфичность двумя методами - иммуноферментного анализа и иммуноблоттинга. Для определения эпитопов БТШ-70, с которыми реаги­ровали полученные антитела, использовали "сэндвич"-метод иммуно­ферментного анализа и реакция иммунопреципитации с предварительным мечением белков [35S]-метионином. Иммунопреципитаты были подверг­нуты одно- и двумерному электрофорезу (Laemli U.K., 1970; O'Farrel P.H.. 1978). Поликлональные антитела использовали в конструкции иммуноблотинга с последующей денситометрией проявленных зон бел­ков, что позволяло полуколичественно оценивать содержание изоформ семейства БТШ-70 в мононуклеарах периферической крови больных.

Для проверки функционального состояния системы БТШ-70 мононуклеаров периферической крови служили нагрузочные тесты In vitro - тепловой шок (прогрев клеток при 43±0.3° С в водяном термостате) и ультрафиолетовое облучение с использованием прибора МД-73 "Изольда".

Определение активности ксантиноксидазы и ее формы в мононуклеарной фракции крови проводили по методу У.Прайор (1979). Уровень процессов свободнорадикального окисления тотально в мононуклеарах периферической крови и отдельно в их ядрах оценивали по содержанию продуктов, связывающих тиобарбитуровую кислоту, которые определяли по методу M.Uchlyama, M.Michara (1978). В качестве интегральных биохимических показателей нестабильности генома клеток были избра­ны относительная доля продуктов деградации хроматина - полидезоксинуклеопротеидов, которые являются фрагментами ДНК, (Parks D.A., Granger D.N., 1986) и интенсивность образования однонитевых разры­вов ДНК (Birnboim H.C.. Jewcac J.J.. 1981).

Статистическая обработка цифровых данных осуществляли методом вариационной статистики с использованием параметрического критерия (t) Стьюдента. В случае малых выборок использовали непараметричес­кие статистические критерии. Расчеты производили с использованием программы STATGRAF (Statistical Graphics System), версия 2.1.

2. Результаты собственных исследований Гуморальный и клеточный иммунитет на разных стадиях болезни

Исследование изменений в иммунной системе при развитии ВИЧ-инфекции имело целью выявить показатели, достоверно изменяющи­еся при переходе от одной клинической стадии (фазы) к другой.

Анализ изменений иммунологических параметров больных позволя­ет заключить, что в динамике ВИЧ-инфекции, в первую очередь, про­исходит прогрессирующее снижение функциональной состоятельности иммунной системы по мере развития клинической картины заболевания. Выявленная дефектность иммунного статуса касается, прежде всего. Т-системы иммунитета. Однако далеко не все исследованные традици­онные иммунодиагностические параметры в своей динамике достоверно отражают начало перехода от бессимптомной фазы заболевания к манифестным стадиям. Достоверное различие между группами больных ВИЧ-инфекцией наблюдалось у следующих показателей:

- при переходе от бессимптомной фазы (IIБ) к ПГЛ (IIB) - уве­личение относительного содержания лимфоцитов от 39,00±2,13 до 45,92±1.96% (р<0,05), уменьшение содержания СD8+-лимфоцитов (супрессоров) ОТ 36,90±2.90 до 27,83±1,80% (p<0,01);

- при переходе от ПГЛ (IIB) к стадии вторичных заболеваний (IIIA) - увеличение содержания В (IgA+) -лимфоцитов от 0,06±0,01 до 0,10±0,01xlO9/л (p<0,01), увеличение концентрации IgG от 11,74±0.89 до 13.77±0.66 г/л (р<0.05), увеличение содержания цир­кулирующих иммунных комплексов - уменьшение пропускания светового потока от 92,1±1,2 до 84.3±1.6% (р<0,01).

Как показал анализ, процентные (относительные) показатели во многих случаях нельзя использовать без оценки абсолютных значений. абсолютное содержание В(IgA+)-лимфоцитов, остается неизменным на стадии IIIA по сравнению с бессимптомной фазой, изменение концент­рации иммуноглобулинов IgG происходят в диапазоне нормальных зна­чений (9-15 г/л), что снижает прогностическую информативность ука­занных показателей. Важен и тот факт, что нет единого иммунологического показателя, который бы достоверно характеризовал оба пере­хода ВИЧ-инфекции - от бессимптомной фазы к генерализованной лимфаденопатии и от генерализованной лимфаденопатии к стадии вторич­ных заболеваний.

Содержание продуктов, связывающих тиобарбитуровую кислоту, в мононуклеарах периферической крови

Уже в бессимптомной фазе у ВИЧ-инфицированных отмечается уве­личение средних значений содержания ТБК-связывающих соединений в мононуклеарах периферической крови на 56%, а в их ядрах - на 90%. По мере развития заболевания уровень названных продуктов свободно-радикального окисления возрастает, достигая максимума у больных в стадии IIIB. При этом средние значения в группе больных в стадии IIIB превышали контрольные в 3.2 раза в мононуклеарах и в 4,6 раза в ядрах мононуклеаров. Однако достоверный рост показателей свободнорадикального окисления между группами больных ВИЧ-инфекцией от­мечается в мононуклеарах. но не в ядрах, и только в одном из инте­ресующих нас переходах клинического течения - из бессимптомной фа­зы (ПБ) к ПГЛ (IIB) от 2,82±0,30 до 3,61±0.37 нмоль/106 клеток (р<0,01).

Активность форм ксантиноксидазы в мононуклеарах периферической крови

Отмечается прогрессивное возрастание общей ксантиноксидазной активности в мононуклеарах периферической крови пациентов по мере развития заболевания. Однако динамика состояния D- и 0-форм фер­мента, оказалась разнонаправленной: по мере прогрессирования забо­левания происходит постепенное снижение средних значений активнос­ти D-формы ксантиноксидазы (на 12,5% в стадии IIB и на 75,5% в стадии III В) и нарастание активности 0-формы фермента (на 13,4% в стадии ПБ и в 6,5 раз в стадии IIIB). При этом достоверного уменьшения активности D-формы ксантиноксидазы в переходах клини­ческого течения IIБ-IIB и IIB-IIIA не отмечается, а активность 0-формы достоверно возрастает только при переходе от бессимптомной фазы (ПБ) к ПГЛ (IIB) (р<0,05).

Интегральные метаболические показатели дестабилизации генома мононуклеаров периферической крови

У ВИЧ-инфицированных уже в бессимптомной фазе отмечается уве­личение средних значений содержания полидезоксинуклеопротеидов (ПДН) в 1,3 раза, а выраженности однонитевых разрывов ДНК в 2.3 раза. Выявленные изменения прогрессируют по мере развития ВИЧ-инфекции, однако достоверных различий показателей нестабильности ге-нома между группами больных не отмечается, что не позволяет расс­матривать их в качестве прогностических критериев перехода клини­ческого течения болезни из одной стадии в другую.

Характеристика поликлональных антител к белкам семейства БТШ-70

Каждый из полученных нами препаратов антител распознавал спе­цифический профиль изоформ семейства БТШ-70, денатурированных до-децилсульфатом натрия. Антитела из сыворотки кролика N5 (антитела N5) различают две зоны молекулярной массы 68-72 кДа, которые представляют собой две изоформы семейства БТШ-70. Тепловое воз­действие (43°С - 30 минут) на клетки HeLa, белковый экстракт кото­рых использовали для приготовления иммуноблота. отражалась на ре­зультате иммуноблота усилением интенсивности зоны, соответствующей hsp70. Антитела N7 распознавали и hsp70. и р75, тогда как антитела N10 главным образом связывались только с р75. a Nil - с hsp70. Та­кие же примеры распознавания белков семейства БТШ-70 на иммуноблотах наблюдались, когда вместо клеток HeLa для анализа использовали мононуклеары периферической крови человека.

Для того, чтобы определить компоненты семейства БТШ-70, кото­рые реагируют в неденатурированном состоянии с представленной па­нелью антител, выполнено исследование иммунопреципитации. И одно-, и двумерные электрофоретические анализы иммунных комплексов не по­казывали различий между антигенами, преципитированными с тестируе­мыми антителами: иммунные комплексы содержали только одну зону. соответствующую индуцибельной форме hsp70. Иммобилизованные на твердой фазе антитела N5 и N7 также избирательно реагировали с ан­тигеном hsp70 из белкового экстракта клеток HeLa.

В итоге, по причине особых свойств полученных антител к БТШ-70. которые, как оказало-сь, распознают только один или нес­колько смежных сайтов на нативных молекулах БТШ-70. а также по причине свойств белков семейства БТШ-70 легко образовывать прочные соединения е другими белками клетки в обычных условиях, не предс­тавилось возможным использовать полученные поликлональные антитела

для создания иммуноферментной тест-системы, предназначенной для количественного определения БТШ-70 в белковых экстрактах мононуклеаров периферической крови. Поэтому пришлось использовать указан­ные антитела в конструкции другого метода для определения БТШ-70 в белковых экстрактах - метода иммуноблотинга с -последующей денситометрией проявленных зон белков.

Изменения состояния семейства БТШ-70 мононуклеаров периферической крови на различных стадиях ВИЧ-инфекции

Семейство БТШ-70 в мононуклеарах периферической крови всех групп обследованных представлено полностью тремя изоформами: инду­цибельной (hsp-70), конститутивной (hsc-70) и белком р75. Не обна­ружено достоверных различий в соотношении изоформ БТШ-70 между до­норами и пациентами в бессимптомной фазе ВИЧ-инфекции. Напротив, у больных в более поздних стадиях заболевания выявлено достоверное изменение анализируемых параметров по сравнению с контрольной группой. Наблюдается прогрессивное уменьшение средних значений со­держания изоформ hsp-70 и р75, увеличение hsc-70 по мере развития клинической картины заболевания. Однако достоверное различие изо­форм семейства БТШ-70 в мононуклеарах периферической крови между группами больных ВИЧ-инфекцией наблюдали только по отношению к конститутивной изоформе (hsc-70). содержание которой увеличивается при переходе заболевания из бессимптомной фазы (ПБ) к фазе ПГЛ (IIB) от 59,3±2,5 до 66.2±2,7 у.д.е. (р<0,05) и от фазы ПГЛ (IIB) к стадии вторичных заболеваний (IIIA) от 66,2±2.7 до 7l,l±3,0 у.д.е. (р<0,05).

Исследование влияния теплового воздействия на мононуклеары периферической крови обследованных лиц позволило выявить прогрес­сивное достоверное уменьшение содержания индуцибельной изоформы hsp-70 при переходах ПБ к IIB от 38,9±4,3 до 30.4±3.1 у.д.е.' и IIB к IIIA от 30,4±3,1 до 22.1±3.7 у.д.е. (р<0,05).

Нами предложен индекс hsp-70 Tlll/hsp-70 N. представляющий со­бой отношение содержания индуцибельной изоформы семейства БТШ-70 в клетке, подвергнутой тепловому шоку in vitro, к содержанию этого белка в клетке, находящейся при t=370С. Индекс hsp-70 TШ/hsp-70 N характеризует реакцию клетки на экстремальное воздействие синтезом и накоплением индуцибельной изоформы. по которому косвенно можно судить об адаптивной состоятельности исследованных клеток. Досто­верное уменьшение индекса hsp-70 TlB/hsp-70 N наблюдается в обоих переходах клинических стадий: ПБ - IIB от 4,23 до 3.42 (р<0,05) и IIB - IIIA от 3,42 до 2.99 (р<0.05). что свидетельствует о прог­рессивном ослаблении адаптивной функции мононуклеаров периферичес­кой крови. Воздействие ультрафиолетового облучения на нононуклеары периферической крови вызывало аналогичные сдвиги в системе белков теплового шока во всех группах больных.

Представленный анализ полученных результатов выявляет значи­мость динамики показателей семейства белков теплового шока БТШ-70 мононуклеаров периферической крови для прогноза перехода клиничес­кого развития ВИЧ-инфекции от бессимптомной фазы к генерализованной лимфаденопатии и от ПГЛ к стадии вторичных заболеваний.

Патогенетическая связь исследованных биохимических показателей и белков теплового шока БТШ-70 в мононуклеарах периферической крови при ВИЧ-инфекции

Выявленная динамика показателей нестабильности генома моно­нуклеаров периферической крови у больных ВИЧ-инфекцией сопровожда­лась существенным увеличением концентрации соединений, связывающих тиобарбитуровую кислоту, (продуктов свободнорадикального окисле­ния) в клетках и их ядрах, что свидетельствует о повреждении ДНК мононуклеаров свободными радикалами. Ведущим генератором активных форм кислорода при этом. судя по полученным результатам, служит 0-форма ксантиноксидазы, образующаяся из D-формы фермента в ре­зультате ее ограниченного протеолиза. В свою очередь, протеолитическая трансформация D-формы ксантиноксидазы в 0-форму может быть прооксидантно-индуцированной.

Таким образом можно предположить, что повреждение ДНК моно­нуклеаров вызвано свободными радикалами, генерируемыми ксантинок-сидазой. В результате атаки ДНК свободными радикалами наблюдается образование.апуриновых/апиримидиновых сайтов и однонитевых разры­вов ДНК мононуклеаров периферической крови. Причем степень указан­ных процессов находится в зависимости от клинического течения ВИЧ-инфекции. В свою очередь, образование однонитевых разрывов яв­ляется стимулирующим фактором повышения активности ксантиноксидазы в мононуклеарах, а образующиеся олигонуклеотиды могут служить факторами активации экспрессии провирусного генома ВИЧ. интегрирован­ного в ДНК мононуклеаров периферической крови. В результате форми­руется патологический круг. способствующий репликации ВИЧ (рис.1, в конце).

Описанные процессы, среди которых наиболее значимым является свободнорадикальное окисление, сопровождаются характерными измене­ниями системы белков теплового шока в мононуклеарах периферической крови, происходящими в тесной связи с клиническим течением ВИЧ-инфекции. Указанные изменения БТШ-70 в неинфицированных клетках мо­гут быть опосредованы влиянием вирусного белка gplZO. взаимодейс­твие которого с рецептором CD4 не только вызывает стрессовую реак­цию. проявляющуюся рядом функциональных изменений, в том числе и усилением транскрипции с генов БТШ-70 (G.Furlini at al.. 1994).. но и приводит к программированной клеточной гибели - апоптозу зрелых СD4+-лимфоцитов или СD34+-гематопоэтических клеток-предшественни­ков (Hofman Во, 1991; Montagnier L. et al., 1992). В инфицирован­ных клетках экспрессия генов ВИЧ и генов, кодирующих синтез БТШ-70. осуществляется по общим механизмам с участием ядерного фактора NF-kB (Krumm A. et al.. 1993).

Таким образом, и в неинфицированных, и в инфицированных ВИЧ иммунокомпетентных клетках крови больных показатели семейства БТШ-70 могут обоснованно рассматриваться в качестве индикатора ак­тивности репликативного процесса вируса, формирования вторичного иммунодефицита (вследствие дисфункции и гибели СБ4+-клеток) и раз­вития клинического течения болезни.

ВЫВОДЫ

1. Традиционные для оценки иммунного статуса лабораторные по­казатели (количество CD3+. CD4+. С08+-лимфоцитов. В-лимфоцитов. несущих Ig М, G. А; РТМЛ с КонА; концентрация Ig M, G. А; содержа­ние циркулирующих иммунных комплексов) недостаточно полно отражают динамику перехода ВИЧ-инфекции из бессимптомной фазы к персистирующей генерализованной лимфаденопатии (ПГЛ) и от ПГЛ к стадии вто­ричных заболеваний.

2. Повышение активности 0-формы ксантиноксидазы и интенсив­ности процессов свободнорадикального окисления в мононуклеарах пе­риферической крови прогрессируют в динамике заболевания, при этом достоверные различия (р<0,05 и р<0.01 соответственно) наблюдаются только при переходе от бессимптомной фазы к персистирувщей генерализованной лимфаденопатии.

3. При развитии ВИЧ-инфекции наблюдается увеличение относи­тельной доли продуктов деградации хроматина (уровня полидезоксинуклеопротеидов) и интенсивности образования однонитевых разрывов ДНК в мононуклеарах периферической крови без достоверных различий в динамике болезни (р>0,05).

4. Белки теплового шока семейства БТШ-70 индуцируют образова­ние поликлональных антител высокой специфичности и аффинности, распознающих один или несколько смежных сайтов на нативных молеку­лах белков, что исключает возможность использования полученных иммуноглобулинов в конструкции иммуноферментных тест-систем для ко­личественного определения БТШ-70. но допускает их применение в ме­тоде иммуноблотинга.

5. При переходе клинического течения заболевания от бессимп­томной фазы к персистирующей генерализованной лимфаденопатии (ПГЛ) и от ПГЛ к стадии вторичных заболеваний происходит достоверное увеличение содержания конститутивной изоформы семейства БТШ-70 в мононуклеарах периферической крови, характеризующее пребывание им­мунокомпетентных клеток в состоянии хронического стресса (р<0.05).

6. Функциональное истощение системы БТШ-70 мононуклеаров пе­риферической крови ВИЧ-инфицированных проявляется снижением интен­сивности ответа (синтез индуцибельной изоформы БТШ-70) на стрессорные воздействия в виде гипертермии и ультрафиолетового облуче­ния.

7. Динамика изменений белков теплового шока семейства БТШ-70 в совокупности с показателями свободнорадикального окисления и системы ксантиноксидазы мононуклеаров периферической крови соот­ветствует клиническому развитию ВИЧ-инфекции, что позволяет ис­пользовать их для прогнозирования перехода клинического течения заболевания из бессимптомной фазы в фазу персистирующей генерали­зованной лимфаденопатии (ПГЛ) и от ПГЛ к стадии вторичных заболе­ваний.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Предложенный способ оценки функционального состояния системы белков теплового шока мононуклеаров периферической крови с приме­нением стрессорных воздействий - гипертермии и ультрафиолетового излучения - целесообразно использовать в экспериментальных исследованиях, направленных на изучение патогенеза вторичных иммунодефицитных состояниях при ВИЧ-инфекции и других инфекционных заболеваниях.

Комплекс показателей, отражающих состояние семейства белков теплового шока БТШ-70 (повышение содержания конститутивной изофор-мы hsc-70 более 68,9 у.д.е.) и системы ксантиноксидазы (повышение активности 0-формы более 1,03 мкмоль/мг белка-мин) мононуклеаров периферической крови, в совокупности с традиционными показателями иммунного статуса может быть использован для прогнозирования пере­хода клинического течения ВИЧ-инфекции бессимптомной фазы в фазу персистирующей генерализованной лимфаденопатии. Для перехода ПГЛ в стадию вторичных заболеваний характерно повышение содержания конс­титутивной изоформы hsc-70 более 74,1 у.д.е. Включение указанных методов в комплексное лабораторно-диагностическое обследование больных ВИЧ-инфекцией позволяет прогнозировать клиническое течение заболевания.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Приготовление специфических поликлональных антител к бел­кам теплового шока // Мат. XI науч. конф. молодых ученых и специа­листов академии.- Л.:ВМедА, 1990.- С.18-19.

2. The characterization and use of different antibodies aga­inst the hsp70 major heat shock protein family for the development of an Immunoassay // Electrophoresls.- 1991.-N12.-P.670- 673 (coавт. Б.А.Маргулис и др.).

3. The state of HSP-70 in lymphocytes In transition of HIV Infection to the clinical manifestation stage // Social and medi­cal problem of AIDS.- St.-Petersburg. 1994.- P. 14 (соавт. Л.А.Ко­жемякин и др.).

4. HSP-70 state significance In the diagnosis and prognosis HIV-Infection // AIDS. cancer and related problems.- St.-Peters­burg, 1996.- P. 130-131 (соавт. Е.И.Змушко).

5. Лабораторный контроль донорской крови в целях безопасности по ВИЧ-инфекции // Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии.- СПб. 1996.- С. 67 (соавт. Е.И.Змушко и др.).

6. Диагностическое значение белков теплового шока при ВИЧ-ин­фекции // Новые информационные технологии в медицине и экологии. -Гурзуф. Ялта, 1996.- С. 56 (соавт. Е.И.Змушко).

7. Прогностическое значение белков теплового шока при ВИЧ-ин­фекции // Инфектология. Достижения и перспективы. -СПб: ВМедА, 1996.-С.99 (соавт. Е.И.Змушко и др.).