

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 578.891.083.233

Костюшев Д.С.¹, Брезгин С.А.^{1,2}, Костюшева А.П.^{1,3}, Липатников А.Д.^{1,4}, Смирский В.Н.⁵, Мамонова Н.А.¹,
Волчкова Е.В.², Малеев В.В.¹, Чуланов В.П.^{1,2}

УСИЛЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ ФОКУСОВ ФОСФОРИЛИРОВАННОГО ГИСТОНА H2AX В ЯДРАХ КЛЕТОК ПРИ ИНФЕКЦИИ ВИРУСАМИ ГЕПАТИТА В И D

¹ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, г. Москва;²ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России, 119991, г. Москва;³ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», 119991, г. Москва;⁴ФГБОУ ВПО «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева», 125047, г. Москва;⁵ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова» РАН, 119334, г. Москва

Исходами хронического гепатита В (ХГВ) являются цирроз печени и гепатоцеллюлярная карцинома. Гибель и трансформация гепатоцитов при ХГВ связаны с влиянием вируса гепатита В (HBV) на клетку. Самым опасным видом повреждения генома клеток является образование двухцепочечных разрывов ДНК (ДЦР). Ранее было показано, что образование фокусов фосфорилированного гистона H2AX (уH2AX) является надёжным индикатором ДЦР. Целью работы было изучение формирования фокусов уH2AX при инфекции, вызванной HBV и HDV, на модели HBV *in vitro*, а также в биоптатах пациентов с ХГВ и ХГВ с дельта-агентом в биоптатах печени. Клетки гепатомы человека HepG2-1.1merHBV с активным циклом HBV были использованы для оценки экспрессии прегеномной РНК, уровней ДНК и кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК (ккзДНК) HBV и иммуноцитохимического анализа образования уH2AX-гистона. Срезы биоптатов печени пациентов с ХГВ и ХГВ + D использовали для подтверждения результатов по генерации уH2AX-гистона. В результате показано, что HBV вызывает образование многочисленных фокусов уH2AX в культуре клеток HepG2-1.1merHBV *in vitro* и гепатоцитах пациентов с ХГВ и ХГВ + D. В гепатоцитах пациента с ХГВ доля клеток без фокусов значительно ниже ($49,9 \pm 12,3\%$ против $85,5 \pm 0,9\%$; $p < 0,05$), а доля клеток с 1–10 фокусами уH2AX выше ($49,3 \pm 12,6\%$ против $14,5 \pm 0,9\%$; $p < 0,05$) в сравнении со здоровым донором. При ХГВ + D происходит увеличение среднего числа уH2AX-фокусов ($3,5 \pm 1,1$ и $5,5 \pm 1,5$ против $0,5 \pm 0,16$ в контроле; $p < 0,05$). У пациентов с ХГВ и ХГВ + D снижается доля гепатоцитов без уH2AX, возрастает доля клеток с 1–10 уH2AX, появляются клетки с многочисленными (11–30 уH2AX/клетку) фокусами. Таким образом, уH2AX-фокусы образуются при инфекции HBV *in vitro*, в гепатоцитах пациентов с ХГВ и ХГВ + D и могут использоваться для оценки повреждения генома, связанного с HBV и HDV.

Ключевые слова: вирус гепатита В; вирус гепатита D; двухцепочечные разрывы ДНК; уH2AX; повреждение генома; гепатоциты; клетки гепатомы.

Для цитирования: Костюшев Д.С., Брезгин С.А., Костюшева А.П., Липатников А.Д., Смирский В.Н., Мамонова Н.А., Волчкова Е.В., Малеев В.В., Чуланов В.П. Усиление образования фокусов фосфорилированного гистона H2AX в ядрах клеток при инфекции вирусами гепатита В и D. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(4): 165-170

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-4-165-170>

**Kostyushev D.S.¹, Brezgin S.A.^{1,2}, Kostyusheva A.P.^{1,3}, Lipatnikov A.D.^{1,4}, Simirskii V.N.⁵, Mamonova N.A.¹,
Volchkova E.V.², Maleyev V.V.¹, Chulanov V.P.^{1,2}**

INCREASED FORMATION OF PHOSPHORYLATED H2AX FOCI IN NUCLEI OF CELLS INFECTED BY HEPATITIS B AND B+D VIRUSES

¹ Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, 111123, Russian Federation;² I.M. Sechenov First State Medical University, Moscow, 119991, Russian Federation;³ M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991, Russian Federation;⁴ D.I. Mendeleev University of Chemical Technology, Moscow, 125047, Russian Federation;⁵ Koltzov Institute of Developmental Biology, Moscow, 119334, Russian Federation

Liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma are the most common outcomes of chronic hepatitis B. Hepatitis B virus (HBV) induces transformation and cell death in chronic hepatitis B (CHB). DNA double strand breaks (DSBs) represent the most dangerous type of genome damage. It was shown previously that generation of phosphorylated histone H2AX foci is a reliable marker of DSBs. The aim of this study was to analyse generation of уH2AX foci in HBV and hepatitis D virus (HDV) infection *in vitro* and in liver biopsies of patients with CHB and CHB with delta-agent (CHD). Human hepatoma cell line HepG2-1.1merHBV with activated HBV life cycle was used to perform real-time PCR for analysis of pregenomic RNA, HBV DNA, HBV cccDNA and for immunocytochemical analysis of уH2AX. Liver biopsies from CHB and CHD patients were analyzed to confirm the results. HBV induces multiple discrete уH2AX foci in HepG2-1.1merHBV cells *in vitro* and in biopsies of CHB and CHB+D patients. The ratio of hepatocytes w/o уH2AX foci is significantly lower ($49,9 \pm 12,3\%$ vs. $85,5 \pm 0,9\%$, $p < 0,05$), while the

Для корреспонденции: Костюшев Дмитрий Сергеевич, младший научный сотрудник лаборатории вирусных гепатитов ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, г. Москва. E-mail: dk@rcvvh.ru

proportion of cells with 1-10 γ H2AX foci is higher (49,3 \pm 12,6% vs. 14,5 \pm 0,9%, $p < 0,05$) compared to healthy control. There is a significant increase in the mean number of γ H2AX foci in biopsies from CHB+D patients (3,5 \pm 1,1 and 5,5 \pm 1,5 vs. 0,5 \pm 0,16 in control hepatocytes, $p < 0,05$). The ratio of hepatocytes w/o γ H2AX foci is significantly lower in CHB and CHB+D patients, while percentage of cells with 1-10 γ H2AX foci is higher. Rare hepatocytes with multiple (11-30 γ H2AX foci per cell) foci appear in CHB and CHB+D patients. In conclusion, γ H2AX foci are generated in hepatocytes of CHB and CHB+D patients and can be utilized to assess genome damage, associated with HBV and HDV viral infection.

Key words: hepatitis B virus; hepatitis D virus; double strand breaks; γ H2AX; genome damage; hepatocytes; hepatoma cells.

For citation: Kostyushev D.S., Brezgin S.A., Kostyusheva A.P., Lipatnikov A.D., Simirskii V.N., Mamonova N.A., Volchkova E.V., Maleyev V.V., Chulanov V.P. Increased formation of phosphorylated H2AX foci in nuclei of cells infected by hepatitis B and B+D viruses. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2018; 63(4): 165-170. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-4-165-170>

For correspondence: Dmitry S. Kostyushev, scientist, Laboratory of viral hepatitis, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, 111123, Russian Federation. E-mail: dk@revh.ru

Information about authors:

Kostyushev D.S., <http://orcid.org/0000-0002-1851-7441>;

Brezgin S.A., <http://orcid.org/0000-0003-4792-0739>;

Kostyusheva A.P., <http://orcid.org/0000-0001-8346-5839>;

Lipatnikov A.D., <http://orcid.org/0000-0003-2925-9924>;

Simirskii V.N., <http://orcid.org/0000-0001-5069-2939>;

Mamonova N.A., <http://orcid.org/0000-0003-1505-6931>;

Volchkova E.V., <http://orcid.org/0000-0003-4581-4510>;

Maleyev V.V., <http://orcid.org/0000-0002-8508-4367>;

Chulanov V.P., <http://orcid.org/0000-0001-6303-9293>

Acknowledgment. This study was supported by RSF grant №16-15-10426.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 23 October 2017

Accepted 06 March 2018

Введение

Хронический гепатит В (ХГВ) – тяжелое заболевание, вызываемое вирусом гепатита В (HBV). Частыми исходами ХГВ являются цирроз печени и гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК). По данным ВОЗ, на сегодняшний день более 250 млн человек инфицированы HBV, при этом около 1 млн человек ежегодно погибают от ГЦК. Причинами ГЦК при ХГВ является повреждение гепатоцитов, ассоциированное с длительным воздействием воспалительного микроокружения в печени, прямым ДНК-повреждающим действием HBs- и HBx-белков HBV, а также проонкогенными свойствами HBx-белка HBV. Нестабильность генома – одна из основных причин развития ГЦК при ХГВ. В 5–30% случаев инфекции, вызванной HBV, наблюдается коинфицирование вирусом гепатита D (дельта-агентом, HDV). В 5% случаев при этом развивается фульминантная форма гепатита, в 80–90% случаев происходит хронизация инфекции. ХГВ с дельта-агентом (ХГВ + D) – наиболее агрессивная форма гепатита, быстро приводящая к развитию цирроза печени и ГЦК [1, 2].

Фосфорилирование гистона H2AX (γ H2AX) происходит при индукции двухцепочечных разрывов (ДЦР) ДНК клеток, одного из самых опасных повреждений генома. Ранее было продемонстрировано, что Х-белок HBV может вызывать ДЦР генома, усиливая образование реактивных форм кислорода в цитоплазме клетки [3]. Вместе с этим при повреждении ДНК происходит активация сенсоров повреждения, киназ ATM и ATR, которые, с одной стороны, участвуют в фосфорилировании H2AX и репарации повреждений [4], а с другой – используются HBV для репликации [5]. Репарация ДЦР происходит при участии γ H2AX. В онкологии γ H2AX используется как надежный биомаркер оценки повреждения генома. Ранее было показано, что γ H2AX ассоциирован с повреждением генома гепатоцитов пациентов с ХГВ и может служить важным биомаркером

для оценки степени повреждения генома и рисков развития ГЦК [6].

Целью данного исследования было изучение распределения γ H2AX-фокусов в культуре клеток *in vitro* на индуцируемой модели HBV HepG2-1.1merHBV и в гепатоцитах пациентов с ХГВ и ХГВ + D.

Материал и методы

Культура клеток HepG2-1.1merHBV

Клетки HepG2-1.1merHBV (предоставлены проф. Dieter Glebe, University of Giessen) с интегрированным геномом 1.1merHBV под индуцибельным tet-on промотором выращивали в среде DMEM с содержанием глюкозы 4,5 г/л, 10% эмбриональной бычьей сывороткой, 1% раствором L-глутамина, 1% раствором стрептомицина/пенициллина. Для активации цикла HBV клетки инкубировали с раствором доксициклина (100 нг/мл) в течение 24 ч.

Выделение нуклеиновых кислот и ПЦР

Для подтверждения активации жизненного цикла HBV в клетках HepG2-1.1merHBV и определения вирусной нагрузки в сыворотках крови, полученных от пациентов за сутки до забора биопсийного материала, нуклеиновые кислоты выделяли при помощи набора AmpliSens «РИБО-преп». ДНК в дальнейшем использовалась для количественного определения ДНК HBV (AmpliSens «HBV monitor-FL») и РНК HDV (AmpliSens «HDV monitor-FRT»). Уровни экспрессии прегеномной РНК (пРНК) (после постановки реакции обратной транскрипции с помощью набора AmpliSens «РЕВЕРТА-FL») и кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК (ккзДНК) (после обработки ферментом plasmid-safe ATP-dependent DNase) в клетках HepG2-1.1merHBV определяли специфическими праймерами относительно внутриклеточного РНК GAPDH и бета-глобина генома соответственно. Расчет относительной экспрессии проводился по методу $\Delta\Delta Ct$.

Анализ апоптоза

Анализ апоптоза проводили на неактивированных клетках HepG2-1.1merHBV и клетках с активированным циклом HBV на 3-и сутки после активации с помощью двух описанных ранее методов: 1) методом оценки морфологических изменений ядер клеток по двойному окрашиванию красителем Hoechst 33342 и пропидия йодидом [7]. Клетки, снятые с планшетов с помощью трипсина, инактивированные полной средой и промытые ледяным фосфатным буфером до плотности $5 \cdot 10^5$ кл/мл, инкубировали в растворе Hoechst 33342 (10 мкг/мл) при 37°C в течение 7 мин, окрашивали пропидия йодидом (2,5 мкг/мл). Образцы держали в темноте на льду в течение 15 мин, после чего сразу же анализировали на флуоресцентном микроскопе Leica DMI6000 (20-кратное увеличение) после нанесения суспензии образцов на предметные стёкла. По крайней мере 400 клеток были использованы для анализа морфологических изменений. Процент апоптотических и некротических клеток рассчитывали по формулам:

$$\% \text{ апоптотических клеток} = [(LA + DA)/(LN + LA + DN + DA)] \cdot 100,$$

$$\% \text{ некротических клеток} = [DN/(LN + LA + DN + DA)] \cdot 100,$$

где LN – живые клетки с нормальным ядром (голубое окрашивание хроматина организованной структуры), LA – живые клетки с апоптотическим ядром (голубое окрашивание конденсированного или фрагментированного хроматина), DN – мёртвые клетки с нормальным ядром (розовое окрашивание хроматина организованной структуры), DA – мёртвые клетки с апоптотическим ядром (ярко-розовое окрашивание высококонденсированного или фрагментированного хроматина); 2) по оценке области суб-G1 в клетках, как описано ранее [8], с модификациями. Вкратце, клетки снимали с планшетов с помощью трипсина, трипсин инактивировали полной средой, центрифугировали 5 мин при 500 г, промывали в фосфатном буфере с последующей фиксацией в ледяном 70% этаноле в течение 30 мин при 4°C, после чего клетки промывали дважды фосфатным буфером (600 г, 5 мин), обрабатывали 50 мкл РНКазы А (100 мкг/мл) и 200 мкл пропидия йодида (50 мкг/мл). Анализ и интерпретацию данных выполняли, как описано ранее («Absam»), с помощью флуоресцентного проточного цитометра (NovoCyte ACEA Biosciences) на канале PI-A.

Биопсийный материал

Срезы толщиной 6 мкм были получены из парафинового блока с биопсийным материалом от 1 здорового донора, 1 пациента с ХГВ и 2 пациентов с ХГВ + D (B + D_1 и B + D_2). Парафиновые срезы последовательно помещали в подставки по схеме: ксилол (2 раза по 3 мин), 100% этанол (2 раза по 3 мин), 95% этанол (2 раза по 3 мин), 70% этанол (3 мин). После промывки водой (3 мин) стёкла со срезами выдерживали в фосфатном буфере, затем проводили иммуноцитохимическое окрашивание. Все клинические образцы были получены с информированного согласия, полученного от каждого пациента. Протокол исследования и информированное согласие одобрены этическим комитетом ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии».

Иммуноцитохимия и микроскопия

Монослойные культуры клеток HepG2-1.1merHBV, выращенных на покровных стёклах, фиксировали 4% раствором параформальдегида в течение 10 мин и промывали трижды раствором Tris-HCl (50 мМ, pH 8,0). Далее культуры клеток или депарафинизированные срезы биоптатов

промывали блокирующим буфером (0,02% Тритон X-100, 10% лошадиная сыворотка и 150 мМ NaCl в Tris-HCl (50 мМ, pH 8,0)), инкубировали с первичными кроличьими поликлональными анти-yH2AX-антителами (ab11174) в течение 1 ч при комнатной температуре, промывали 3 раза промывочным буфером (0,2% Тритон X-100 и 200 мМ NaCl в Tris-HCl (50 мМ, pH 8,0)), затем инкубировали со вторичными антикроличьими IgG-антителами Alexa Fluor 488 (ab150077) и раствором Hoechst33342 для окрашивания ядра, вновь промывали трижды отмывочным буфером и фиксировали с помощью реагента Fluoroshield (ab104135). Фокусы yH2AX визуализировали на микроскопе Leica DMI6000 при 100-кратном увеличении с помощью иммерсионного объектива. Для подсчёта брали более 200 клеток для культур клеток и более 400 клеток для биопсийного материала.

Патологогистологическое исследование биопсийного материала

Использованы результаты патологогистологических исследований (индекс гистологической активности и степень фиброза), проведенных у пациентов в ФГБНУ «Российский научный центр хирургии им. академика Б.В. Петровского» по медицинским показаниям.

Статистика

Статистический анализ проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента или однофакторного дисперсионного анализа (где это применимо) в программе IBM SPSS 19.0. Отличия с $p < 0.05$ считали значимыми.

Результаты**Активный цикл HBV индуцирует многочисленные ДЦР генома**

Поскольку ранее образование yH2AX-фокусов на культурах клеток с активным вирусным циклом показано не было, модель клеток HepG2-1.1merHBV с трансгеном HBV под индуцибельным tet-on промотором была использована для воспроизведения жизненного цикла HBV и анализа повреждений генома. Для оценки пригодности культуры HepG2-1.1merHBV *in vitro* и изучения влияния HBV на генерацию фокусов yH2AX в активированных и неактивированных клетках были изучены основные показатели репликации HBV (ДНК HBV, пгРНК, ккзДНК). В результате через 48 ч после инкубации клеток с доксициклином происходит увеличение внутриклеточной ДНК HBV с 262 507 ± 5990 до 1 176 571 ± 46 281 копии ($p < 0,05$). Экспрессия пгРНК HBV возрастает в ≈10 раз (уровень пгРНК $0,085 \pm 0,025$ ($p < 0,05$) относительно активных клеток) и уровень ккзДНК – в ≈3,3 раза (уровень ккзДНК $0,318 \pm 0,172$ ($p < 0,05$) относительно активных клеток) соответственно. Эти данные говорят об активном протекании вирусного цикла, таким образом, модель HepG2-1.1merHBV может быть использована для изучения эффектов, связанных с действием HBV на клетку.

Вместе с этим активация цикла HBV вызывает генерацию фокусов yH2AX в клетках HepG2-1.1merHBV (рис. 1, см. 3-ю полосу обложки). Клетки HepG2 являются клетками гепатомы, генетически нестабильной линией, поэтому число спонтанных фокусов в неактивированных клетках довольно высокое (≈2 фокусов на клетку). Тем не менее при активации цикла HBV число фокусов возрастает в ≈4 раза с $2,0 \pm 0,4$ до $13,5 \pm 1,1$ ($p < 0,05$) на клетку (рис. 2). Анализ распределения клеток по числу фокусов yH2AX показал, что с неактивным циклом HBV yH2AX-фокусы не образуются в 70% клеток, еще около 10% клеток со-

Таблица 1

Распределение фокусов уН2АХ на клетках по популяциям

Количество фокусов уН2АХ на ядро клетки	НерG2-1.1merHBV, %	актНерG2-1.1merHBV, %
0	70,5 ± 0,0	0
Диффузное ядро	3,1 ± 0,0	2,2 ± 3,9
1–10	23,3 ± 0,0	51,1 ± 4,8
11–20	2,6 ± 0,0	26,7 ± 9,3
21–30	0,5 ± 0,0	12,5 ± 3,3
31–50	0	6,3 ± 5,6
50	0	1,1 ± 1,0

Примечание. Диффузное ядро – окрашивание на уН2АХ паннуклеарное, без дискретных фокусов. Здесь и в табл. 4: 0 – клетки без фокусов; 1–10, 11–20, 21–30, 31–50, > 50 – доля клеток с числом уН2АХ-фокусов в пределах указанных значений.

Таблица 2

Изменение процентных долей клеток в состоянии апоптоза и некроза

Клетки	Апоптоз	Некроз	Живые клетки	Суб-G1 (апоптоз)
Неактивные	15,2 ± 2,6	30,7 ± 4,6	54,1 ± 2,0	2,25 ± 0,1
Активированные	16,3 ± 3,5	29,7 ± 6,8	53,9 ± 3,3	3,67 ± 0,7

Примечание. Все различия статистически незначимы. Образование фокусов уН2АХ в гепатоцитах пациентов с ХГВ и ХГВ + D.

держат от 1 до 10 фокусов на клетку, небольшая пропорция содержит 11–20 и 21–30 фокусов на клетку (табл. 1). С другой стороны, при активации HBV полностью исчезают клетки, негативно окрашиваемые на уН2АХ-гистон. От 1 до 10 фокусов детектируется более чем в 50% клеток (51,1 ± 4,8% в активированных клетках против 23,3 ± 0,0% в неактивированных клетках; $p < 0,05$). В значительной доле клеток число генерируемых фокусов составляет 11–20 (26,7 ± 9,3% против 2,6 ± 0,0%; $p < 0,05$), 21–30 (12,5 ± 3,3% против 0,5 ± 0,0%; $p < 0,05$) и 31–50 на клетку (6,3 ± 5,6% против 0). В редких ядрах идентифицировано более 50 фокусов уН2АХ (1,12 ± 1,02). В результате было наглядно продемонстрировано, как активная репликация HBV *in vitro* индуцирует образование многочисленных фокусов уН2АХ, ассоциированных с ДЦР ДНК.

Усиление образования фокусов уН2АХ не связано с увеличением уровней апоптоза при активации цикла HBV

Одной из причин масштабного фосфорилирования H2АХ-гистона является апоптоз, гибель клетки, сопро-

вождаемая фрагментацией ДНК эндогенными нуклеазами [10]. Считается, что при репарации ДЦР уН2АХ способствует удержанию двух концов ДНК в области разрыва, тогда как при апоптозе фосфорилирование уН2АХ-гистона участвует в упаковке фрагментированной ДНК в апоптотические тельца. Показано, что при репликации HBV белки вируса могут действовать как проапоптотические или как антиапоптотические факторы. Методами морфологического анализа ядер клеток с помощью флуоресцентной микроскопии мы показали, что значимого увеличения доли апоптотических и некротических клеток при активации цикла HBV в клетках НерG2-1.1merHBV не происходит (табл. 2). Результаты морфологического анализа были подтверждены данными проточной цитофлуориметрии.

Несмотря на то что в недавних исследованиях уже было установлено важное практическое значение образования уН2АХ-фокусов у пациентов с ХГВ в оценке рисков развития ГЦК [6], генерации уН2АХ у пациентов с ХГВ + D описано не было. В табл. 3 представлены данные об 1 здоровом доноре без заболеваний печени, 1 пациенте с ХГВ и 2 пациентах с ХГВ + D, биопсийный материал которых был использован в работе. Все пациенты и здоровый донор не принимали препараты прямого противовирусного действия на момент взятия биопсии, не страдали алкогольной или табачной зависимостью и не употребляли наркотические вещества. Пациенты с ХГВ и ХГВ + D и здоровый донор не были инфицированы ВИЧ или HCV. В биопсийном материале здорового пациента иммуноцитохимически были выявлены редкие клетки (4,5% от общего числа анализированных клеток), в которых детектировались немногочисленные (от 1 до 10) фокусы.

Среднее число фокусов составило всего 0,5 ± 0,16 на клетку (табл. 4). Редкие явления образования спонтанных фокусов уН2АХ в норме происходят при коллапсе репликативной вилки, делении клеток и спонтанных разрывах [11]. По результатам морфологического исследования биоптата пациента с ХГВ был выявлен склероз стромы с расширением без формирования фиброзных септ (фотографии не представлены). В подавляющем большинстве трактов наблюдалась умеренная лимфоидно-клеточная инфильтрация с примесью единичных плазмочитов и эозинофильных лейкоцитов. На территории порталных трактов лимфоидные фолликулы с небольшими реактивными центрами, обнаруживаются признаки лёгкого лобулита в виде мелкоочаговых лимфогистиоцитарных инфильтратов в отдельных долях, очаги крупнокапельного ожирения гепатоцитов.

При иммуноцитохимическом окрашивании среднее число фокусов уН2АХ (см. табл. 4) составило 2,4 ± 0,4 на клетку, что несколько выше в сравнении с биопсией материала от здорового донора, но незначимо статистически. Однако при анализе распределения фокусов (см. табл. 4) выяснилось, что доля клеток без фокусов на 30% ниже (49,9 ± 12,3% у пациента с ХГВ против 85,5 ± 0,9% у здорового донора; $p < 0,05$), а доля клеток с числом фокусов 1–10 значительно выше (49,3 ± 12,6% против 14,5 ± 0,9%; $p < 0,05$) в сравнении со здоровым донором.

Далее были изучены биопсии от двух пациентов с ХГВ + D. У пациента В+D_1 в биоптате печени наблюдается расширение порталных трактов за счёт фиброза и воспалительной инфильтрации (фотографии не представлены). Форма портал-

Таблица 3

Клинико-лабораторная характеристика пациентов, включённых в исследование

Показатель	Здоровый донор	Пациент с гепатитом В	Пациент с гепатитом В и D (В + D_1)	Пациент с гепатитом В и D (В + D_2)
Пол	м.	ж.	м.	ж.
Возраст, годы	25	35	56	39
ИМТ	22,58	32,79	26,84	21,87
ДНК ВГВ, МЕ/мл	Отр.	5 176 470	787,9	71,1
РНК HDV, МЕ/мл	-	-	128 855,8	1 422 547,5
Шкала METAVIR	-	A1F1	A2F1-2 с преобладанием F1	A3F2

Примечание. ИМТ – индекс массы тела.

Таблица 4
Распределение клеток по числу уН2АХ-фокусов и среднее число уН2АХ-фокусов на клетку в биоптатах пациентов

Пациент	Доля клеток по числу уН2АХ-фокусов, %				уН2АХ/клетку, ед.
	0	1–10	11–20	21–30	
Здоровый пациент	85,5 ± 0,9	14,5 ± 0,9	0,0	0,0	0,5 ± 0,16
Пациент с ХГВ	49,9 ± 12,3	49,3 ± 12,6	0,84 ± 0,8	0,0	2,4 ± 0,4
V + D_1	42,3 ± 8,3	50,9 ± 7,1	6,5 ± 0,8	0,27 ± 0,5	3,5 ± 1,1
V + D_2	28,4 ± 14,6	56,2 ± 6,3	13,4 ± 5,0	1,9 ± 3,3	5,5 ± 1,5

ных трактов изменена за счёт расходящихся в разных направлениях стенок склерозированных синусоидов. Воспалительный инфильтрат представлен преимущественно лимфоидными клетками с примесью эозинофильных лейкоцитов и единичных плазмочитов. В перипортальных зонах, а также на территории долек неравномерно распределены мелкие некровоспалительные очаги, в паренхиме – неравномерное крупнокапельное ожирение гепатоцитов. Наблюдается гиперплазия купферовских клеток и зернистая дистрофия цитоплазмы гепатоцитов. В биоптате печени пациента V + D_2 более чем в половине портальных трактов наблюдается воспалительная лимфоидно-клеточная инфильтрация с примесью эозинофильных лейкоцитов и умеренной воспалительной активностью в перипортальных зонах и очагами лобулярной активности воспалительного процесса. Выражен фиброз портальных трактов, а также формирование отдельных фиброзных септ. Выявляются участки склероза стенок синусоидов. В участках среза биоптата наблюдается активное воспаление перипортальных зон, определяется дистрофия гепатоцитов и некроз отдельных клеток.

Среднее число фокусов уН2АХ на клетку значительно различается между здоровым донором и пациентами V + D_1, V + D_2 (0,5 ± 0,16 против 3,5 ± 1,1 ($p < 0,05$) и 0,5 ± 0,16 против 5,5 ± 1,5 ($p < 0,01$)) (см. табл. 4; рис. 3, см. 3-ю полосу обложки). Кроме того, число уН2АХ на клетку у пациента V+D_2 значительно выше, чем у пациента с ХГВ ($p < 0,05$). Также выявлены значительные различия в доле клеток без уН2АХ-фокусов и доле кле-

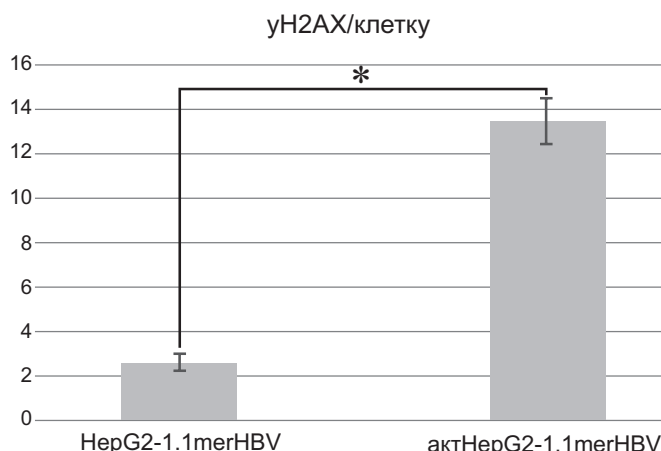


Рис. 2. Подсчёт среднего числа фокусов уН2АХ на клетку в клетках с активацией цикла HBV и без неё. Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям. * – $p < 0,05$.

ток с 1–10 уН2АХ на клетку между здоровым донором и V + D_1 ($p < 0,05$), V + D_2 ($p < 0,01$). Процент клеток с 11–20 уН2АХ на клетку значительно выше у V + D_2 ($p < 0,01$) в сравнении со здоровым донором. Кроме того, в биопсиях пациентов V + D_1 и V + D_2 появляются редкие клетки с числом уН2АХ-фокусов 20–30 на клетку.

Визуально уН2АХ в биоптатах могут распространяться равномерно по ядру, образуя дискретные, удалённые фокусы, либо концентрироваться в определённом компартменте ядра. В сравнении с культурами клеток гепатомы *in vitro*, фокусы уН2АХ в биоптатах пациентов выглядят менее крупными и встречаются с меньшей частотой на клетку. Это может быть связано с гиперэкспрессией HBx-белка HBV на модели клеток *in vitro* [12], генетической нестабильностью клеток гепатомы и массивной гиперпродукцией вирусных частиц и белков при активации интегрированного трансгена под сильным промотором цитомегаловируса.

Обсуждение

Образование фокусов фосфорилированного гистона H2АХ (уН2АХ) обычно связано с генерацией ДЦР в ДНК клетки. Тем не менее образование уН2АХ-фокусов в клетках, инфицированных вирусом, может быть вызвано рядом других факторов, в том числе:

- репликацией вирусов и повреждением ДНК; этот механизм характерен для представителей семейства *Herpesviridae* (вирус простого герпеса, вирус Эпштейна – Барр, вирус саркомы Капоши). В таком случае вирусы индуцируют ДЦР и используют активные пути репарации и фокусы уН2АХ как центры репликации вирусного генома;

- репликацией вирусов без повреждения генома (представители семейства *Adenoviridae*). Аденовирусная инфекция активирует ответ клеток на повреждение (DNA damage response, DDR) и пути репарации. Несмотря на то что уН2АХ является маркером ДЦР, при репликации аденовирусов фосфорилирование H2АХ происходит без повреждения ДНК;

- ДНК-повреждающим действием вирусов, в частности Х-белок HBV (HBx) не только дизрегулирует метаболизм нуклеиновых кислот клеткой, но и может индуцировать ДЦР, что в совокупности приводит к хромосомным аномалиям [13].

Ещё в 2008 г. Fan Zhao и соавт. [14] показали, что уровень фосфорилированной формы H2АХ увеличивается при инфицировании HBV. Фундаментальное значение уН2АХ-фокусов в инфекции HBV остаётся неясным. В частности, в наших [данные не представлены] и других исследованиях [14] было выявлено, что ингибирование путей репарации ДЦР влияет на репликацию HBV. Кроме этого, в недавней работе G. Shah и С. O'Shea [15] было обнаружено, что вирусные геномы и клеточный геном активируют отличающиеся друг от друга пути репарации повреждения ДНК. В результате появляется потенциальная возможность разработки противовирусных препаратов, действующих на пути репарации повреждённый ДНК, не подвергая риску генетической нестабильности клетки человека.

Масштабное фосфорилирование уН2АХ происходит при фрагментации ДНК, связанной с процессами апоптоза [9]. Известно, что белки HBV могут действовать как проапоптотические, так и антиапоптотические фак-

торы [10]. В данной работе на модели клеток HepG2-1.1merHBV мы исключили возможность влияния апоптоза на интерпретацию данных, связанных с образованием фокусов уН2АХ на культуре клеток HepG2-1.1merHBV *in vitro*. Действительно, несмотря на значительное увеличение фокусов уН2АХ в активированных клетках к 3-м суткам в сравнении с неактивированными клетками, доля апоптотических клеток практически не меняется.

Кроме того, как показали результаты недавних исследований [6], образование уН2АХ-фокусов в клинике коррелирует с рисками развития цирроза и ГЦК.

В данном исследовании объём выборки пациентов недостаточен для того, чтобы отследить возможные корреляции между данными о уН2АХ-фокусах и данными о пациентах (см. табл. 3). Исследования по выявлению корреляций между вирусной нагрузкой при ХГВ или ХГВ + D и уН2АХ-фокусами ранее не проводились, однако в культуре клеток *in vitro* активация HBV индуцирует образование многочисленных фокусов. Если концентрация ДНК HBV в сыворотке крови пациента с ХГВ составляет 5 176 470 МЕ/мл, нагрузка ДНК HBV в сыворотке крови пациентов В + D 1 и В + D 2 оказывается значительно ниже (787,9 и 71,1 МЕ/мл). Это хорошо согласуется с общими представлениями о явлении подавления вирусом гепатита D репликации вируса гепатита В [16]. Действительно, концентрация РНК HDV в сыворотке крови В + D 1 и В + D 2 составляет 128 855 и 1 422 547 МЕ/мл. Поскольку, как показано нами на культуре клеток *in vitro*, репликация HBV вызывает индукцию фокусов уН2АХ, высокая нагрузка вируса должна быть ассоциирована с большим числом фокусов уН2АХ. В случае с пациентами В + D, возможно, HDV оказывает ещё более сильное генотоксическое действие либо усиливает повреждение ДНК генома, связанное с HBV.

В 2017 г. в крупном исследовании, проводившемся на образцах биопсий, взятых в период с 2004 по 2014 г. от пациентов с ХГВ, было показано, что сформированные фокусы уН2АХ ассоциированы с высокими уровнями гамма-глутамилтрансферазы, щелочной фосфатазы, аланинаминотрансферазы и аспаргатаминотрансферазы (индикаторами повреждения печени), низкими уровнями альбумина, более длительным протромбиновым временем (индикаторами функции гепатоцитов) и высокими концентрациями ДНК HBV (индикатором активной репликации вируса). В целом исследователи делают вывод, что уН2АХ-фокусы можно использовать в качестве нового маркера в прогнозировании ГЦК, а также предполагают использование уН2АХ в виде потенциальной терапевтической мишени [17].

Чтобы выяснить, оказывает ли HDV генотоксическое действие напрямую, или это может быть связано с другими механизмами, необходимо детальное изучение явлений повреждения генома, связанного с репликацией HDV, в культуре клеток. Отметим, что числовые показатели уН2АХ возрастают в ряду В- > В + D 1- > В + D 2, что соответствует градации степени фиброза по шкале METAVIR A1F1- > A1F1-2- > A3F2 (см. табл. 1). В более ранней работе У. Matsuda и соавт. [6] было показано, что индекс окрашивания на уН2АХ значимо увеличен при хроническом гепатите (В и С) и циррозе печени, что согласуется с данными, полученными в нашей работе. В целом необходимо изучение распределения фокусов уН2АХ в биопсиях пациентов с ХГВ + D, а также определение их прогностической значимости на крупных выборках пациентов.

Заключение

В данной работе впервые было показано, что фокусы уН2АХ генерируются не только при инфекции HBV *in vitro* и в гепатоцитах пациента с ХГВ, но и при коинфекции HBV + HDV, проведён подсчёт среднего числа уН2АХ-фокусов на клетку, впервые изучено распределение клеток по числу фокусов уН2АХ и приведена морфологическая характеристика распределения фокусов в ядрах клеток. Образование фокусов уН2АХ – важная эпигенетическая модификация генома клеток, ассоциированная с репликацией вируса и ДЦР, и может использоваться для оценки рисков развития ГЦК и цирроза печени.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке гранта РФ №16-15-10426.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Bahcecioglu I.H., Sahin A. Treatment of delta hepatitis: today and in the future – a review. *Infect. Dis. (Lond)*. 2017; 49(4): 241-50.
2. Mallet V., Hamed K., Schwarzinger M. Prognosis of patients with chronic hepatitis B in France (2008-2013): A nationwide, observational and hospital-based study. *J. Hepatol*. 2017; 66(3): 514-520.
3. Kim S., Lee H.S., Ji J.H., Cho M.Y., Yoo Y.S., Park Y.Y., et al. Hepatitis B virus X protein activates the ATM-Chk2 pathway and delays cell cycle progression. *J. Gen. Virol*. 2015; 96(8): 2242-51.
4. Maréchal A., Zou L. DNA Damage Sensing by the ATM and ATR Kinases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. 2013; 5(9): a012716.
5. Zhao F., Hou N.B., Song T., He X., Zheng Z.R., Ma Q.J., et al. Cellular DNA Repair Cofactors Affecting Hepatitis B Virus Infection and Replication. *World J. Gastroenterol*. 2008; 14(32): 5059-65.
6. Matsuda Y., Wakai T., Kubota M., Osawa M., Takamura M., Yamagiwa S., et al. DNA Damage Sensor γ -H2AX Is Increased in Preneoplastic Lesions of Hepatocellular Carcinoma. *Sci. World J*. 2013; 2013: 597095.
7. Syed Abdul Rahman S.N., Abdul Wahab N., Abd Malek S.N. In Vitro Morphological Assessment of Apoptosis Induced by Antiproliferative Constituents from the Rhizomes of *Curcuma zedoaria*. *Evid. Based Complement Alternat. Med*. 2013; 2013: 257108.
8. Wlodkovic D., Skommer J., Darzynkiewicz Z. Flow Cytometry-Based Apoptosis Detection. *Methods Mol. Biol*. 2009; 559: 19-32.
9. Rogakou E.P., Nieves-Neira W., Boon C., Pommier Y., Bonner W.M. Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J. Biol. Chem*. 2000; 275(13): 9390-5.
10. Lee W.P., Lan K.H., Li C.P., Chao Y., Lin H.C., Lee S.D. Pro-apoptotic or anti-apoptotic property of X protein of hepatitis B virus is determined by phosphorylation at Ser31 by Akt. *Arch. Biochem. Biophys*. 2012; 528(2): 156-62.
11. Turinetti V., Giachino C. Multiple facets of histone variant H2AX: a DNA double-strand-break marker with several biological functions. *Nucleic. Acids Res*. 2015; 43(5): 2489-98.
12. Kim S., Lee H.S., Ji J.H., Cho M.Y., Yoo Y.S., Park Y.Y., et al. Hepatitis B virus X protein activates the ATM-Chk2 pathway and delays cell cycle progression. *J. Gen. Virol*. 2015; 96(8): 2242-51.
13. Dan Y., Zhang Y., Cheng L., Ma J., Xi Y., Yang L., et al. Hepatitis B virus X protein (HBx)-induced abnormalities of nucleic acid metabolism revealed by 1H-NMR-based metabolomics. *Sci. Rep*. 2016; 6: 24430.
14. Zhao F., Hou N.B., Song T., He X., Zheng Z.R., Ma Q.J., et al. Cellular DNA repair cofactors affecting hepatitis B virus infection and replication. *World J. Gastroenterol*. 2008; 14(32): 5059-65.
15. Shah G.A., O'Shea C.C. Viral and Cellular Genomes Activate Distinct DNA Damage Responses. *Cell*. 2015; 162(5): 987-1002.
16. Arribas J.R., González-García J.J., Lorenzo A., Montero D., Ladrón de Guevara C., Montes M., et al. Single (B or C), dual (BC or BD) and triple (BCD) viral hepatitis in HIV-infected patients in Madrid, Spain. *AIDS*. 2005; 19(13): 1361-5.
17. Chen W.D.P. Chronic inflammation injury promotes hepatocellular carcinoma development via up-regulation of γ -H2AX. *Int. J. Clin. Exp. Pathol*. 10(4); 4431-40.

Поступила 23.10.17

Принята в печать 06.03.18

К статье Костюшева Д.С. с соавт.

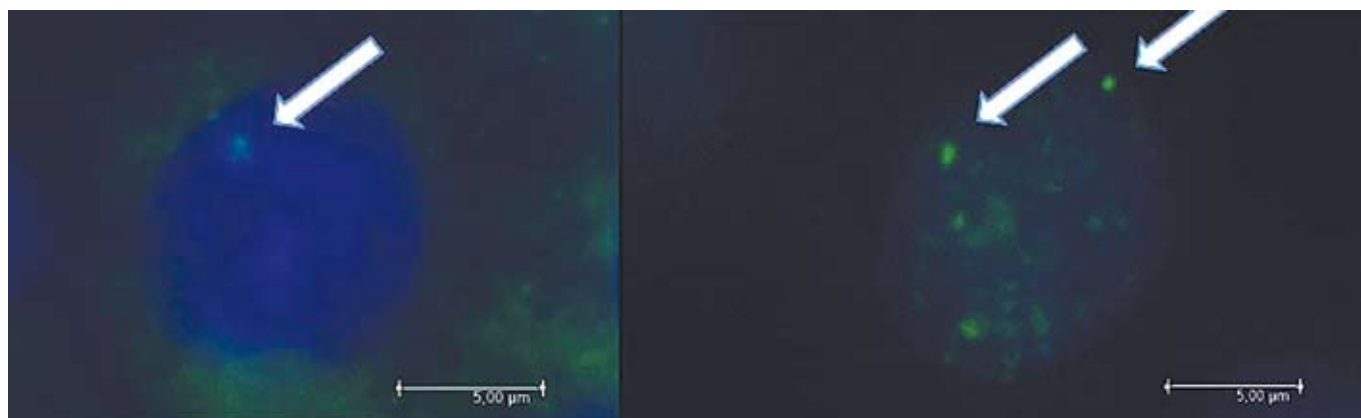


Рис. 1. Увеличение образования фокусов уН2АХ в клетках с активным циклом HBV. Иммуноцитохимическое окрашивание моно-
слойной культуры клеток HepG2-1.1merHBV (X 100).

Неактивированные клетки (слева), активированные клетки (справа). Синий канал (365 нм): ядра клеток; зеленый канал (488 нм): уН2АХ-гистон.

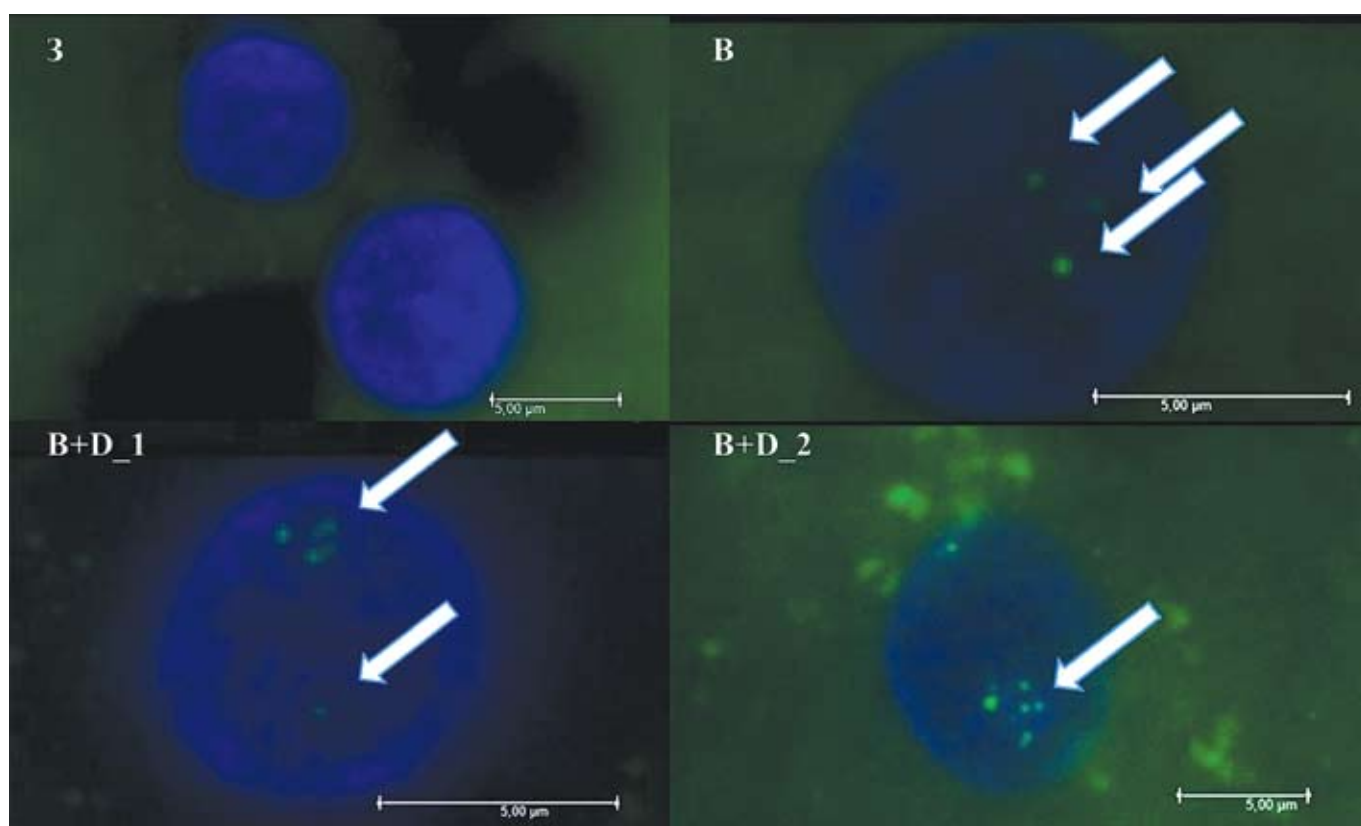


Рис. 3. Иммуноцитохимическое окрашивание срезов биоптатов печени здорового донора и пациентов с ХГВ и ХГВ + D.
3 -- здоровый пациент; B -- пациент с ХГВ (X 100). Синий канал (365 нм): ядра клеток; зеленый канал (488 нм): уН2АХ-гистон. Стрелками отмечены фокусы уН2АХ.