

ЛИЗОСОМАЛЬНО-ЗАВИСИМАЯ ГИБЕЛЬ ГЕПАТОЦИТОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ С

В. М. Цыркунов, В. П. Андреев, Р. И. Кравчук

Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

Введение. В настоящее время лизосомально-зависимая гибель клеток (LDCD) является общепризнанной и напрямую взаимосвязанной со многими механизмами апоптоза гепатоцитов при хроническом гепатите С (ХГС). В отечественной литературе существует дефицит визуализационных материалов данного процесса при ХГС.

Цель исследования – представить морфологические характеристики зависимой от лизосом клеточной гибели гепатоцитов.

Материал и методы. Объектом исследования были прижизненные биоптаты печени 18 пациентов с хронической HCV-инфекцией, полученные после подписания ими информированного согласия. Биоптаты печени изучали в электронном микроскопе JEM-1011 (JEOL, Япония) при увеличениях 10000-60000 при ускоряющем напряжении 80 кВт. Для получения снимков использовали цифровую камеру Olympus Mega View III с программой iTEM для обработки изображений (Olympus, Германия).

Результаты. В иллюстрациях и описании представлены взаимосвязанные между собой последовательные стадии лизосомально-зависимой гибели клеток (LDCD) и зависимой от аутофагии клеточной гибели (ADCD) гепатоцитов при ХГС. Представлен процесс формирования аутофагосомы, описаны три типа аутофагии (макроаутофагия, микроаутофагия, опосредованная шапероном аутофагия). Подробно иллюстрирована одна из основных форм аутофагии – митофагия. Изложены особенности аутофагии, ее провирусные и противовирусные механизмы, а также роль HCV в апоптозе, взаимосвязанном с аутофагией.

Выводы. Гибель гепатоцитов при ХГС, зависимая от аутофагии, является высоко регулируемым и консервативным клеточным механизмом поддержания клеточного гомеостаза и содействия выживанию клеток. HCV-индуцированная аутофагия подавляет апоптоз, чтобы способствовать выживанию клеток. Вызванный HCV аутофагический ответ снижает противовирусный врожденный иммунный ответ в гепатоцитах, инфицированных HCV, способствуя хронизации инфекционного процесса.

Визуализация процесса аутофагии позволяет более точно оценить механизмы и ультраструктурные компоненты разных видов и стадий аутофагии. Изменения во всех структурных компонентах аутофагии не носят изолированный характер, характеризуются комплексом специфических признаков, ассоциированных друг с другом и объединенных апоптозогенным механизмом патогенеза HCV-инфекции.

Ключевые слова: HCV-инфекция, лизосомально-зависимая гибель гепатоцитов, визуализация.

LYSOSOME-DEPENDENT DEATH OF HEPATOCYTES IN CHRONIC HEPATITIS C

V. M. Tsyrkunov, V. P. Andreev, R. I. Kravchuk

Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

Background. Currently, lysosome-dependent cell death (LDCD) is universally recognized and directly correlated with many mechanisms of hepatocyte apoptosis in chronic hepatitis C (CHC). In the domestic literature there is a shortage of visualization materials of this process in chronic hepatitis C.

Objective – to present the morphological characteristics of lysosome-dependent hepatocyte cell death.

Material and methods. The object of the study was intravital liver biopsy samples of 18 patients with chronic HCV infection, obtained after they had signed informed consent. Liver biopsies were studied in a JEM-1011 electron microscope (JEOL, Japan) at magnifications of 10,000 - 60,000 at accelerating voltage of 80 kW. To obtain images, we used an Olympus Mega View III digital camera with iTEM image processing software (Olympus, Germany).

Results. The illustrations and description show the interrelated sequential stages of lysosome-dependent cell death (LDCD) and autophagy-dependent cell death (ADCD) of hepatocytes in chronic hepatitis C. The process of autophagosome formation is presented, three types of autophagy are described (macroautophagy, microautophagy, chaperone-mediated autophagy). One of the main forms of autophagy, mitophagy, is illustrated in detail. The features of autophagy, its proviral and antiviral mechanisms, as well as the role of HCV in apoptosis associated with autophagy, are described.

Conclusions. Autophagy-dependent hepatocyte death in chronic hepatitis C is a highly regulated and conservative cellular mechanism for maintaining cell homeostasis and promoting cell survival. HCV-induced autophagy suppresses apoptosis to promote cell survival. The autophagic response caused by HCV reduces the antiviral innate immune response in HCV infected hepatocytes, contributing to the chronicity of the infectious process.

Visualization of the autophagy process allows for a more accurate assessment of the mechanisms and ultrastructural components of various types and stages of autophagy. Changes in all structural components of autophagy are not isolated, being characterized by a complex of specific signs associated with each other and united by the apoptogenic mechanism of the pathogenesis of HCV infection.

Keywords: HCV infection, lysosome-dependent death of hepatocytes, visualization.

Автор, ответственный за переписку:

Цыркунов Владимир Максимович, д-р мед. наук, проф.; Гродненский государственный медицинский университет; e-mail: tvn111@mail.ru

Для цитирования:

Цыркунов, В. М. Лизосомально-зависимая гибель гепатоцитов при хроническом гепатите С / В. М. Цыркунов, В. П. Андреев, Р. И. Кравчук // Гепатология и гастроэнтерология. 2020. Т. 4, № 1. С. 34-44. <https://doi.org/10.25298/2616-5546-2020-4-1-34-44>

Corresponding author:

Tsyrukunov Vladimir, PhD, MD (Medicine), Professor; Grodno State Medical University; e-mail: tvn111@mail.ru

For citation:

Tsyrukunov VM, Andreev VP, Kravchuk RI. Lysosomal dependent death of hepatocytes in chronic hepatitis C. *Hepatology and Gastroenterology*. 2020;4(1):34-44. <https://doi.org/10.25298/2616-5546-2020-4-1-34-44>

Введение

В течение многих лет исследования апоптоза были сосредоточены на каспазах и их роли в качестве единственных исполнителей запрограммированной гибели клеток. В настоящее время общепризнано существование «лизосомального пути апоптоза», который может быть активирован рецепторами смерти, липидными медиаторами и другими агентами (рис. 1).

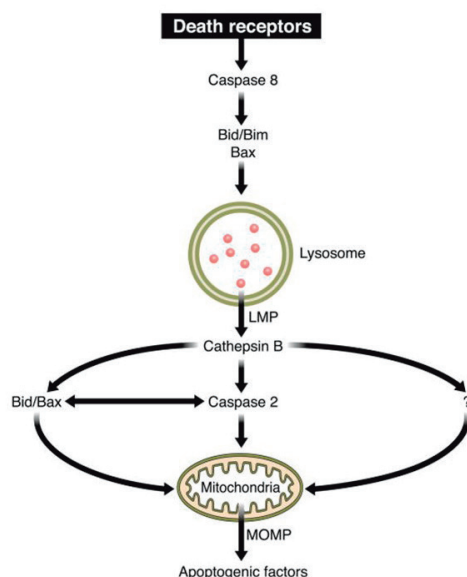


Рисунок 1. – Лизосомный путь апоптоза [2]
Figure 1. – Lysosomal apoptosis pathway [2]

В гепатоцитах и холангиоцитах различные формы стресса усиливают проницаемость лизосомальной мембраны (LMP), приводя к транслокации в цитоплазму внутрилизосомных компонентов, таких как катепсины, которые вносят существенный вклад в дисфункцию митохондрий путем расщепления и/или активации членов семейства Bcl-2, приводя к лизосомально-зависимой гибели клеток (LDCD) [1, 2].

Аутофагия – одна из самых новых и быстро развивающихся областей биомедицинских наук о жизни – представляет собой клеточную систему для переработки внутриклеточных ненужных материалов, включая белки и органеллы [2]. Это процесс, при котором клетка разрушает поврежденные органеллы и макромолекулы, используя собственные лизосомы [3, 4].

Лизосомы – это мембранные органеллы, обеспечивающие внутриклеточную деградацию макромолекул, сохранение целостности и функции которых имеет решающее значение для клеточного гомеостаза. Условно выделяют 4 вида лизосом: первичные и вторичные лизосомы, аутофагосомы и остаточные тельца. При электронной микроскопии лизосомы определяются как пузырьки, ограниченные от гиалоплазмы (цитозоля) мембраной. Первичные лизосомы диаметром 100-500 нм заполнены гомогенным мелкодисперсным, электронно-плотным содержимым (рисунок 2). Вторичные лизосомы образуются либо слиянием первичных лизосом с пиноцитозными или фагоцитозными вакуолями, либо путём захвата собственных макромолекул и органелл клетки (рисунок 3).

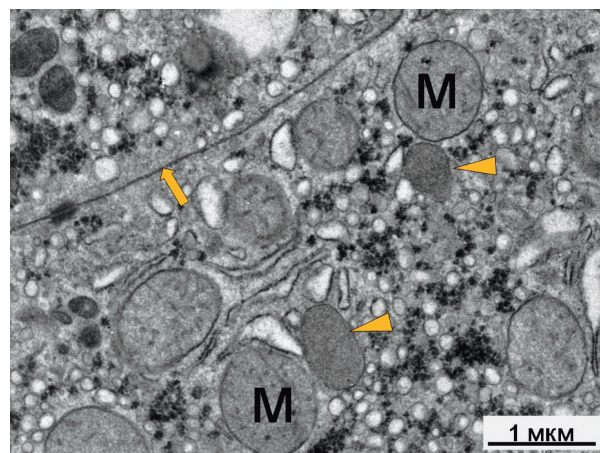


Рисунок 2. – Первичные лизосомы (наконечники стрелок), имеющие гомогенный, выраженный электронно-плотный матрикс. Стрелкой обозначены плазмолеммы смежных гепатоцитов. М – митохондрии
Figure 2. – Primary lysosomes (arrowheads) having a homogeneous, pronounced electron-dense matrix. The arrow indicates the plasmalemma of adjacent hepatocytes. M - mitochondria

Вторичные лизосомы подразделяются на гетеролизосомы и аутолизосомы. По размеру они больше первичных, их содержимое неоднородное, с плотными тельцами (рисунок 4). При их наличии говорят о фаголизосоме (гетерофагосоме) или аутофагосоме, если тельца – фрагменты собственных органелл клетки.

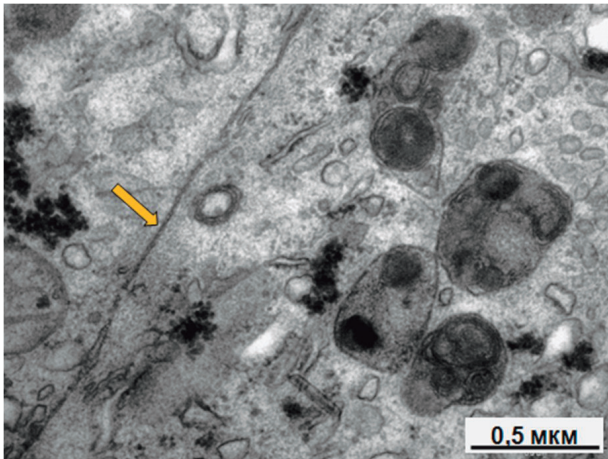


Рисунок 3. – Вторичные лизосомы (фагосомы), в содержимом которых располагаются аутофагические вакуоли и продукты гидролиза разной плотности и текстуры; граница гепатоцитов (стрелка)

Figure 3. – Secondary lysosomes (phagosomes), in the contents of which autophagic vacuoles and hydrolysis products of various densities and textures are located; border of hepatocytes (arrow)

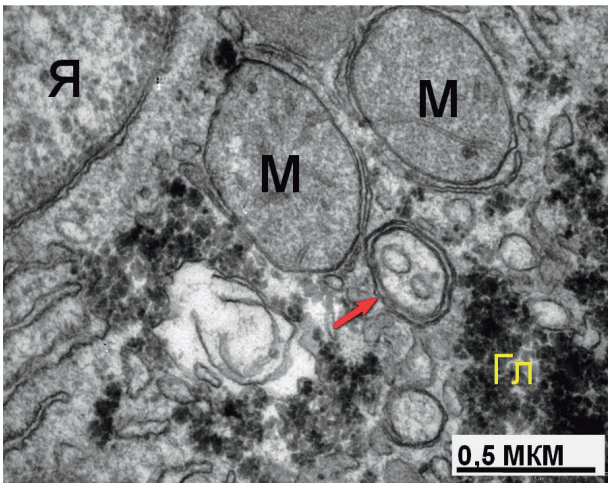


Рисунок 4. – Аутофагосома (красная стрелка) вблизи ядра гепатоцита (Я) и митохондрий (М); Гл – гранулы гликогена. Мультивезикулярное тельце, окруженное двумя мембранами, характерно для структуры, образованной путем отпочковывания от ядерной оболочки

Figure 4. – Autophagosome (red arrow) near the nucleus of hepatocyte (Я) and mitochondria (М); Гл – granules of glycogen. A multivesicular body surrounded by two membranes is characteristic of a structure formed by budding from the nuclear membrane

Цель исследования – представить морфологические характеристики клеточной гибели гепатоцитов, зависимой от лизосом.

Материал и методы

Объектом исследования были прижизненные биоптаты печени 18 пациентов с хронической HCV-инфекцией (РНК+), полученные до назначения противовирусной терапии, после подписания информированного согласия.

Биоптаты печени изучали в электронном микроскопе JEM-1011 (JEOL, Япония) при увеличении 10000-60000 при ускоряющем напряжении 80 кВт. Для получения снимков использовали цифровую камеру Olympus Mega View III

с программой iTEM для обработки изображений (Olympus, Германия).

Результаты и обсуждение

Зависимая от лизосом клеточная гибель (Lysosome-dependent cell death, LDCD) начинается с изменения проницаемости мембран лизосом и завершается выходом содержимого лизосом (протеолитических ферментов семейства катепсинов) в цитозоль и разрушением содержимого клетки. Важную роль в запуске повышения проницаемости лизосомальных мембран играют активные формы кислорода (АФК, ROS) [5, 6]. Зависимая от аутофагии клеточная гибель (Autophagy-dependent cell death, ADCD) подразумевает активацию молекулярных механизмов аутофагии, приводящих к образованию аутофагосом – везикул с двойной мембраной (ДМВ/DMV) [7, 8].

Не так давно была описана разновидность зависимой от аутофагии клеточной гибели – аутоз, в которой задействована Na^+/K^+ -АТФаза [6]. Аутоз включает усиление адгезии клеток к субстрату, очаговое раздувание перинуклеарного пространства, расширение и фрагментацию эндоплазматического ретикулума (ЭР, ER) [6, 9].

Аутофагия активируется широким спектром клеточных стрессоустойчивых состояний и опосредует деградацию белковых агрегатов, окисленных липидов, поврежденных органелл и внутриклеточных патогенов. Этот процесс обычно включает образование двойных мембранных везикул, аутофагосом, которые секвестрируют цитоплазматический материал и затем сливаются с лизосомами. Материалы, которые захватывают лизосомы, расщепляются гидролазами, а полученные продукты распада используются для получения новых клеточных компонентов и энергии в ответ на пищевые потребности клетки [10, 11].

Одна из наиболее отличительных черт аутофагии – образование аутофагосом, которые поглощают цитоплазматические макромолекулы и поврежденные органеллы, доставляют их в лизосомы для деградации и рециркуляции. В то время как клеточное происхождение мембраны аутофагосомы полностью не установлено, эндоплазматическая сеть может быть одним из ее мембранных источников [12].

Аутофагосомы (ДМВ/DMV) – большие двухмембранные везикулы, содержащие цитоплазматические компоненты, нацеленные на деградацию (рис. 4). Происхождение липидных бислоев этих транспортных носителей было центральной загадкой с момента открытия аутофагии. В ряде недавних исследований показано, что некоторые клеточные органеллы являются возможным источником аутофагосомальных мембран [12].

Процесс аутофагии состоит из нескольких этапов (рис. 5): образование фагофора (PAS) или изолирующей мембраны; расширение фагофора вокруг материала, предназначенного для расщепления и образование омегасомы – промежуточного продукта фагофорного расширения; закрытие растущего фагофора с образованием полной аутофагосомы, слияние аутофагосомы с эндосомными структурами и превращение в амфисому, органеллу, специфичную для клеток высших эукариот, где секвестрируемый материал начинает деградировать; слияние амфисомы с лизосомами и образование аутолизосом; расщепление резидентными гидролазами аутофагосом на основные метаболиты, которые транспортируются в цитоплазму, где они повторно используются в качестве источника энергии или строительных блоков для новых белков и липидов.

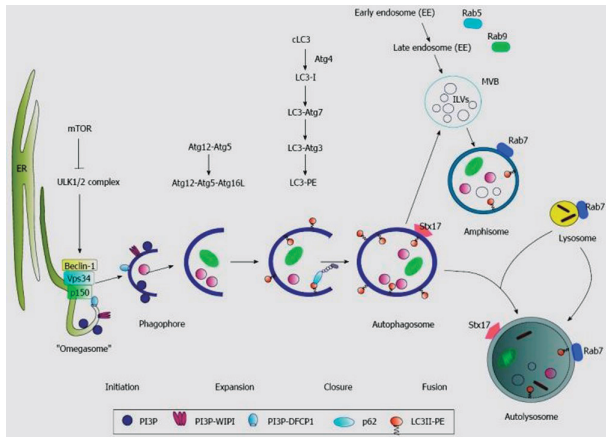


Рисунок 5. – Схематическая модель аутофагии [13]
Figure 5. – Schematic model of autophagy [13]

Во время аутофагии цитоплазматические материалы поглощаются вновь синтезированными везикулами. Закрытые фагофоры, в которые включены цитоплазматические компоненты, становятся двойными мембранными структурами, называемыми аутофагосомами. Наружная мембрана аутофагосом сливается с лизосомальной мембраной и образующиеся в результате этого структуры слияния называются аутолизосомами. Цитоплазматические компоненты во внутренней мембране аутофагосом доставляются в просветное пространство лизосом, где гидролитические ферменты, такие как катепсины, разлагают их [14].

До настоящего времени зарегистрировано три типа аутофагии: макроаутофагия, микроаутофагия и опосредованная шапероном аутофагия (рис. 6).

Во время макроаутофагии материал, предназначенный для разрушения, заключен в двухмембранные пузырьки, называемые аутофагосомами, которые доставляют содержимое внутрь лизосомы посредством слияния мембран; мета-

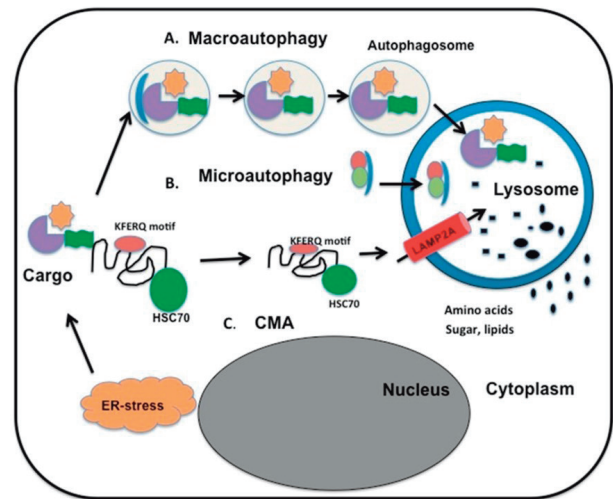


Рисунок 6. – Схематические иллюстрации разных видов аутофагии [13, 14]
Figure 6. – Schematic illustrations of different types of autophagy [13, 14]

болиты (аминокислоты, сахара и липиды) высвобождаются в цитоплазму для синтеза новых макромолекул или в качестве источника энергии. При микроаутофагии материал напрямую попадает в лизосому путем инвагинации и деградации мембраны. Во время опосредованной шапероном аутофагии (CMA) белки с пентапептидными KFERQ-подобными последовательностями распознаются шапероном когнитивного белкового комплекса 70 (HSC70) теплового шока; этот комплекс затем связывается с LAMP2A на мембране лизосомы для последующей интернализации и деградации [13].

Концепция макроаутофагии была основана в 1963 г., вскоре после открытия лизосом в печени крысы. Печень богата лизосомами и обладает высоким уровнем аутофагии, вызванной метаболическим стрессом, которая точно регулируется концентрацией гормонов и аминокислот. В печени аутофагия обеспечивает голодные клетки аминокислотами, глюкозой и свободными жирными кислотами для использования в производстве энергии и синтезе новых макромолекул, а также контролирует качество и количество органелл, таких как митохондрии. Появляются доказательства того, что аутофагия печени вносит свой вклад в гликогенолиз, глюконеогенез и β-окисление благодаря избирательному обмену специфических веществ, контролируемых рядом факторов транскрипции [15].

Наиболее изученным процессом является макроаутофагия, называемая в настоящее время «аутофагией», при которой происходит деградация крупных органелл клетки и белковых агрегатов через строго регулируемый процесс, начинающийся с выделения и поглощения цитоплазматических компонентов двухслойной липидной мембраной, образующей аутофагосому (рис. 7, 8).

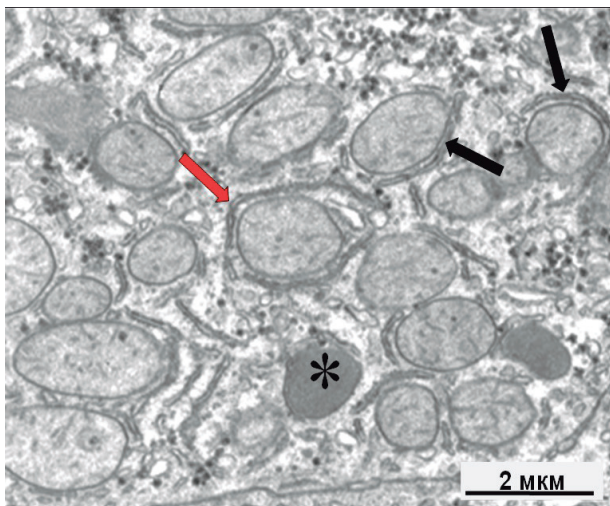


Рисунок 7. – Сформированная изолирующая мембрана, окружающая нефункционирующую митохондрию, обозначена красной стрелкой; формирующаяся – черной; лизосома – звездочкой

Figure 7. – The formed insulating membrane surrounding the non-functioning mitochondria is indicated by a red arrow; emerging - black; lysosome with an asterisk

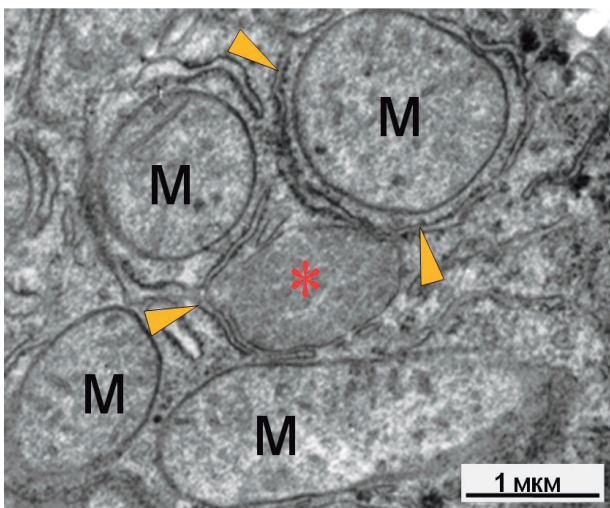


Рисунок 8. – Формирующиеся изолирующие мембраны (наконечники стрелок) вокруг митохондрий (M) с состоянием растворения крист, которые еще различаются; митохондрия с полным лизисом крист (звездочка).

Figure 8. – The emerging insulating membranes (arrowheads) around mitochondria (M) with the process of dissolution of cristae that can still be seen; mitochondria with complete cristae lysis (an asterisk)

При макрофагии большие части цитоплазмы и клеточного содержимого (долгоживущие белки, агрегированные белки, поврежденные органеллы и внутриклеточные патогены) преобразуются в двухмембранную вакуоль (аутофагосому), которая сливается с лизосомами или поздними эндосомальными мультивезикулярными телами (MVBs), чтобы разложить материалы внутри нее, образуя аутолизосому, разлагает аутолизосомное содержимое и перерабатывает макромолекулы для повторного использования [16, 17].

Митофагия – специализированная форма аутофагии (или, более конкретно, – макроаутофагии), которая доставляет поврежденные митохондрии в лизосомы для деградации через аутофагосомы с двумя мембранами (рис. 9, 10) [18].

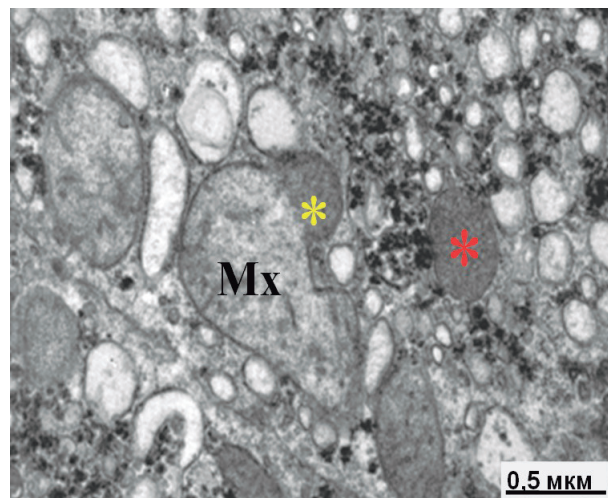


Рисунок 9. – Электронограмма, демонстрирующая слияние первичной лизосомы (желтая звездочка) с матрисом увеличенной митохондрии (Mx), в которой наблюдается разрушение крист; первичная лизосома обозначена красной звездочкой

Figure 9. – Electron diffraction pattern demonstrating the fusion of the primary lysosome (yellow star) with the matrix of increased mitochondria (Mx), in which the destruction of cristae is observed; primary lysosome is indicated by a red asterisk

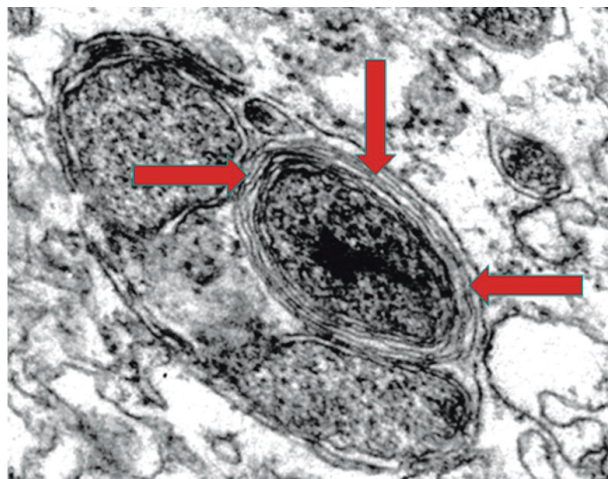


Рисунок 10. – Многослойные изолирующие мембраны (стрелки). В аутофагических вакуолях содержатся элементы гладкой эндоплазматической сети и свободные рибосомы. ×30 000

Figure 10. – Multilayer insulating membranes (arrows). Autophagic vacuoles are contained the elements of the smooth endoplasmic reticulum and free ribosomes. ×30 000

Удаляя поврежденные митохондрии, митофагия играет неоценимую роль в снижении клеточного стресса, вызванного окислительным взрывом, и в свою очередь помогает поддерживать клеточный гомеостаз. В общем, многие этапы,

связанные с митофагией, пересекаются с неселективной аутофагией, так как они оба включают формирование аутофагосомы, которая поглощает материал, и его созревание до аутофаголизосомы для деградации. Некоторые митохондрии клетка не может фагоцитировать из-за недостатка энергии (рис. 11, 12).

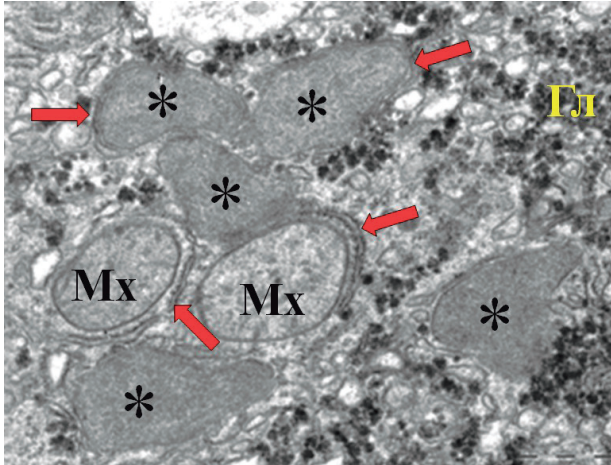


Рисунок 11. – Формирование изолирующей мембраны (красные стрелки) вокруг кластера митохондрий (Mx), у которых наблюдается полная утрата (лизис) крист (звездочки); Гл – гранулы гликогена. $\times 40\ 000$
Figure 11. – The formation of an insulating membrane (red arrows) around a mitochondrial cluster (Mx), in which complete loss (lysis) of cristae is observed (asterisk); Гл - granules of glycogen. $\times 40\ 000$

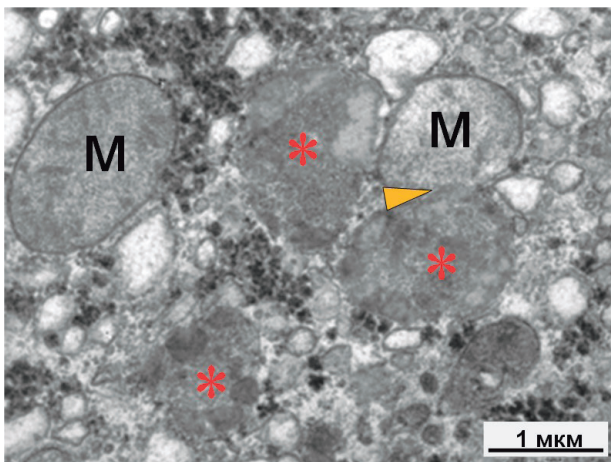


Рисунок 12. – Электронограмма, демонстрирующая момент слияния митохондрии (M) с полным лизисом крист с вторичной лизосомой без образования изолирующей мембраны (место слияния обозначено наконечником стрелки); вторичные лизосомы (звездочки)
Figure 12. – Electron diffraction pattern showing the moment of mitochondrial (M) fusion with complete lysis of cristae with secondary lysosome without formation of an insulating membrane (the fusion site is indicated by the arrowhead); secondary lysosomes (asterisks)

Тем не менее, в отличие от неспецифической аутофагии, включающей массовую деградацию старого или дисфункционального цитоплазматического содержимого, митофагия требует дополнительных молекулярных регуляторов для селективной деградации митохондрий. Ключевые среди этих регуляторов – убиквитинлигаза E3,

паркин, преимущественно локализованный в цитоплазме [19], и предполагаемые PTEN, киназа 1 (PINK1), серин-треонин киназа [20]. В поляризованных митохондриях PINK1 экспортируется в митохондрии, но его уровень поддерживается низким с помощью пресенилина, ассоциированного с ромбоид-подобной протеазой (PARL) [21]. Однако в деполаризованных митохондриях PINK1 накапливается на внешней мембране митохондрий и запускает транслокацию паркина в митохондрии. Паркин затем убиквитинирует себя и внешние митохондриальные белки, тем самым инициируя митохондрии для аутофагической деградации [22].

Микроаутофагия – это перенос цитозольных компонентов в лизосому путем прямой инвагинации лизосомальной мембраны и последующего образования везикул в просвете лизосомы. Микроаутофагия относится к процессу, посредством которого лизосомы непосредственно поглощают и переваривают небольшие объемы цитозольного субстрата [23, 24], в то время как опосредованная шапероном аутофагия индуцируется физиологическими стрессами (длительное голодание) [25] и включает родственный белок теплового шока (HSC70; 71 кДа), также известный как HSPA8, который содержит KFERQ-подобную пентапептидную последовательность [26].

Опосредованная шапероном аутофагия (СМА) является одним из ключевых клеточных механизмов в гомеостазе белка. Путь СМА доставляет целевые белки через лизосомальные мембраны в просвет лизосомы путем взаимодействия с ассоциированным с лизосомами мембранным белком типа 2А (LAMP-2А) [27]. Следовательно, СМА отличается от микроаутофагии и макроаутофагии, так как не требует везикулярного оборота. Независимо от типа аутофагия действует как механизм очистки, удаляя или разрушая ненужные материалы из организма (белки, органеллы, микробы) и удерживая или поддерживая материалы (биохимические, метаболиты и органеллы), необходимые для выживания, функционирования и развития [28, 29].

Только белки с С-концевым пентапептидным мотивом KFERQ подвергаются СМА. Кошаперон HSC70 идентифицирует цитозольные белки и доставляет их в лизосому (рис.13) [30]. На рисунке 13 представлены этапы СМА.

Как показано на рисунке 13, при СМА KFERQ (1), присутствующий в 30% растворимых цитозольных белков (2), распознается цитозольным белком шаперона HSPA8/HSC70, находящимся в комплексе с другими белками шаперона (3). Связывание субстрата (4) с белком лизосомального рецептора (LAMP-2А) приводит к олигомеризации рецепторов (5). С помощью HSP90 субстрат разворачивается и транслоцируется через транслокационный комплекс, обогащенный LAMP-2А (6). После проникновения внутрь

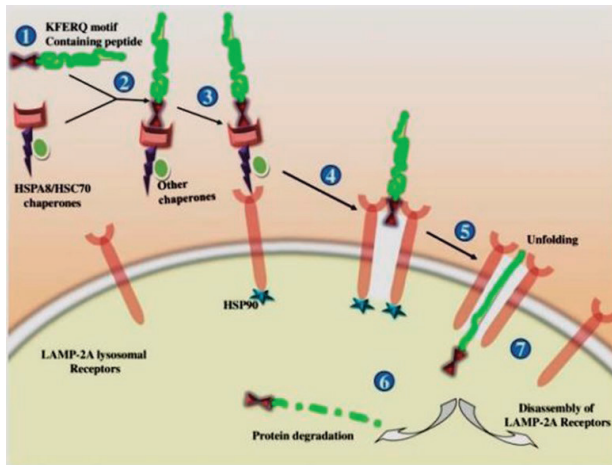


Рисунок 13. – Опосредованная шаперонами аутофагия [30]
Figure 13. – Chaperone-mediated autophagy [30]

лизосом белки распадаются (7) и рецепторы LAMP-2A освобождаются.

Физиологические процессы аутофагии регулируются многочисленными клеточными регуляторами, влияющими на гомеостатический процесс, нарушенный генетическими или функциональными причинами или перенапряжением. Следовательно, дефекты аутофагии могут влиять на патогенез многих заболеваний [31].

Аутофагия может быть селективной или неселективной [32]. При селективной аутофагии материал распознается специфическими рецепторами для их специфической идентификации, секвестрации и деградации аутофагосомой, тогда как при неспецифической аутофагии все материалы деградируются лизосомой неспецифическим образом (рис. 14) [33].

Кроме того, известно, что аутофагия существует в двух формах: конститутивная и реактивная (индуцированная) аутофагия.

Установлено, что аутофагия – важное средство в борьбе с патогенами в организме, может активировать врожденный и приобретенный иммунный ответ и поддерживать нормальную функцию иммунных клеток, эффективно разрушая патогенные микроорганизмы [34].

Патогенные микроорганизмы могут использовать аутофагию, чтобы увеличить самовоспроизведение в несколько раз. Увеличение аутофагии может способствовать размножению микроорганизмов. До сих пор нет четкого ответа на вопрос о характере взаимоотношений инфекции и аутофагии [3]. Кроме того, аутофагия участвует в развитии у человека разных заболеваний, например, хронических заболеваний печени, гепатоцеллюлярной карциномы.

Установлено, что аутофагия участвует в жизненном цикле HCV, включая проникновение [35], репликацию [36], сборку и выход из клетки [37]. Кроме того, сообщалось, что ВГС-индуцированная аутофагия ухудшает врожденную анти-вирусную активность [38], играет определенную роль в развитии вирусного гепатита С (ВГС) [39].

Репликация и сборка HCV происходит в так называемой мембранной паутине (фабриках по сборке вирусов), которая состоит из липидных капель и перестроенной мембраны эндоплазматической сети, включающей одно-, двух- и мультимембранные везикулы (DMV) в качестве компартмента вирусной репликации (VRC) [3, 40].

Установлено, что двухмембранные везикулы содержат NS3, NS5A, вирусную РНК и белок 1, связанный с аутофагосомным маркером микротрубочек, легкую цепь 3, что подтверждает участие аутофагического пути в жизненном цикле HCV [41].

Репликация HCV происходит в репликационных комплексах, которые собираются в ЭР (ER),

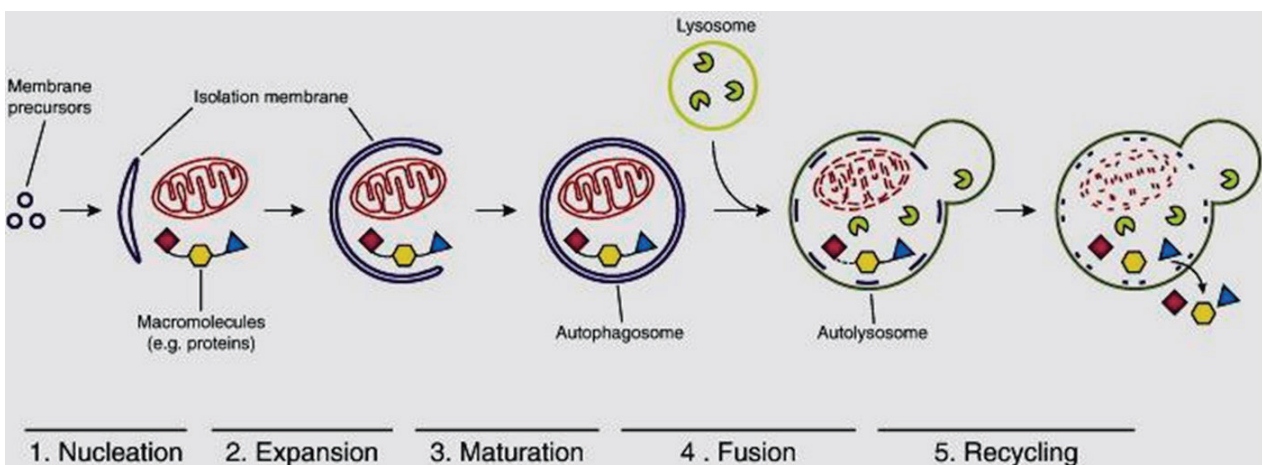


Рисунок 14. – Механизмы селективной аутофагии [33]
Figure 14. – Mechanisms of selective autophagy [33]

Обозначения: доставка цитоплазматического материала в лизосомальный компартмент для деградации (1); мембранные доноры, включая везикулы Atg9, образуют изолирующую мембрану (2); изолирующая мембрана расширяется и охватывает цитоплазматический материал, включая органеллы и макромолекулы (3); изолирующая мембрана созревает в закрытой двойной мембранной аутофагосоме (4); внешняя аутофагосомальная мембрана сливается с лизосомой, что приводит к деградации внутренней мембраны и материала (5); затем компоненты возвращаются в цитоплазму

Рисунок 14. – Механизмы селективной аутофагии [33]
Figure 14. – Mechanisms of selective autophagy [33]

что приводит к его стрессу и индукции развернутого белкового ответа (UPR).

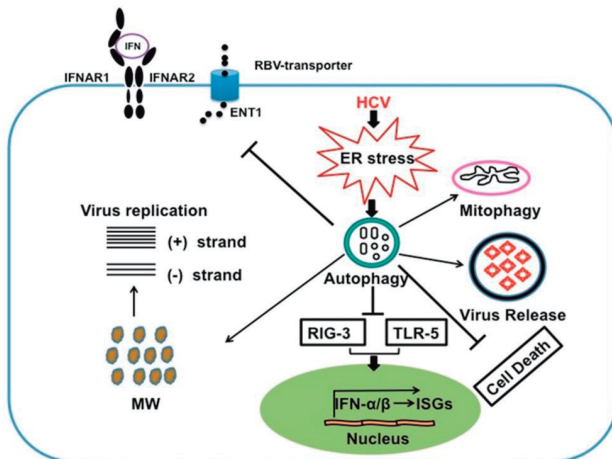


Рисунок 15. – Схема адаптации аутофагии к клеточному стрессу, вызванному HCV [14]

Figure 15. – Scheme of adaptation of autophagy to cell stress caused by HCV [14]

Как следует из рисунка 15, репликация HCV вызывает ER-стресс/ответ UPR, который запускает аутофагию, способствующую выживанию клеток посредством ингибирования апоптоза и митофагии. Индуцированный HCV ответ на аутофагию ингибирует продукцию интерферона и транскрипцию индуцируемых интерфероном генов (ISG), ухудшает передачу сигналов киназы Janus/активаторов транскрипции (JAK/STAT) за счет деградации рецептора IFN- α 1 (IFNAR1) и транспортера RBV. В результате формируется аутофагосомы, которая поддерживает репликацию и продукцию HCV.

UPR активирует три сигнальных пути (ATF6, IRE1, PERK) и, наконец, аутофагию. Кроме того, UPR может быть вызван NS4B ВГС посредством активации пути IRE1 и ATF6, поскольку NS4B вмешивается в Ca²⁺-гомеостаз, приводящий к повышенным активным окислителям (ROS, АФК). Повышенные уровни АФК запускают фосфорилирование p62 на Ser351 (p-p62) после последующей активации Nrf2. NS4B далее образует комплекс с Rab5, Vps34 и Beclin-1, стимулирующий аутофагический ответ. Кроме того, белок семейства GTPase, связанный с иммунитетом человека (IRGM), взаимодействует с NS3/4A и аутофагосомными белками Atg5, Atg10 и LC3, которые запускают аутофагию. Активация аутофагии способствует репликации HCV, играет решающую роль в высвобождении вирусных частиц. При этом взаимодействие TIP47 и активированного Rab9 (aRab9) с частицами является существенным. Кроме того, HCV-индуцированная аутофагия нарушает врожденный иммунитет и способствует выживанию клеток посредством ингибирования апоптоза [16].

За последние несколько лет в ходе исследований установлено, что индуцированный HCV UPR надежно активирует аутофагию для поддержания репликации вируса в инфицированных гепатоцитах. Индукция клеточного аутофагического ответа необходима для улучшения выживаемости инфицированных клеток путем ингибирования клеточного апоптоза. Аутофагический ответ также ингибирует клеточную врожденную анти-вирусную программу, которая обычно ингибирует репликацию HCV [42, 43]. Аутофагия играет неодинаковую по направлению роль в репликации и патогенезе разных инфекций, вызванных вирусами: коронавирусом, вирусом Коксаки В3, полиовирусом, вирусом гепатита С (HCV), DENV и другими [11].

Было показано, что обработка клеток, инфицированных вирусами, увеличивает их репликацию, в то время как ингибирование аутофагосомного пути с использованием 3-метиладена или РНК с небольшими интерференциями снижает репликацию вируса [44]. Кроме того, разрушение аутофагии с использованием метода нокдауна в гепатоцитах, инфицированных HCV, стимулировало путь передачи сигналов интерферона и индукцию апоптоза, что указывает на то, что аутофагия, вызванная HCV, может нарушать врожденный иммунный ответ [45]. Подавление HCV-индуцированной аутофагии может быть многообещающим подходом для ингибирования экзосом-опосредованной вирусной передачи [46]. Показано, что аутофагия снижает клиренс HCV после применения антивирусной терапии на основе IFN- α /рибавирина (RBV) [47, 48].

Репликация РНК HCV и продукция структурных и неструктурных белков в ГрЭС, их разделение на субклеточные структуры приводят к стрессу ЭР, повреждению митохондрий и производству АФК. Это активирует процесс аутофагии без увеличения деградации белка. Таким образом, аутофагосомы, количество которых при ХГС возрастает, накапливаются в инфицированных HCV клетках (рис. 16, 17).

Образование двойных мембранных везикул (ДМВ/DMV) может включать аутофагию или несколько ее компонентов, и осуществляться способом, аналогичным образованию аутофагических вакуолей [49]. Это подтверждается морфологическим сходством ДМВ/DMV и аутофагосом. В гетеролизосомах (или фаголизосомах) протекает процесс переваривания материала, поступающего в клетку извне путем активного транспорта (пиноцитоза и фагоцитоза).

Телолизосомы, или остаточные (резидуальные) тельца, появляются тогда, когда внутрилизосомальное переваривание не приводит к полному разрушению захваченных структур. Остаточные тельца – одна из финальных стадий существования фаго- и аутолизосом. Они обнаруживаются при незавершенном фаго- или

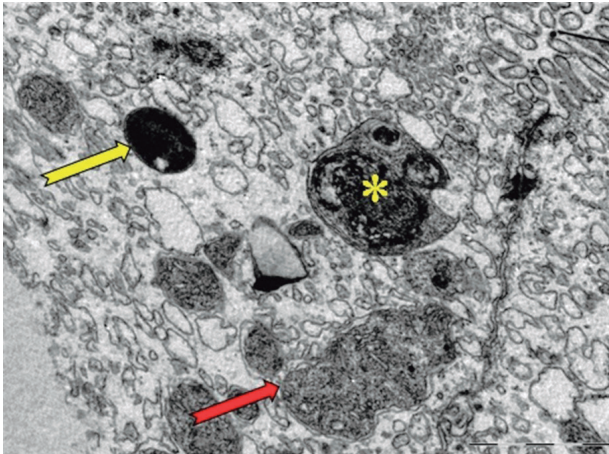


Рисунок 16. – Фаголизосома, содержащая остатки разрушающейся митохондрии (звездочка). Митохондрия, подвергающаяся деструкции (красная стрелка). Первичная лизосома (желтая стрелка). ×30 000
Figure 16. – A phagolysosome containing the remains of a collapsing mitochondria (asterisk). Mitochondria undergoing destruction (red arrow). Primary lysosome (yellow arrow). ×30 000

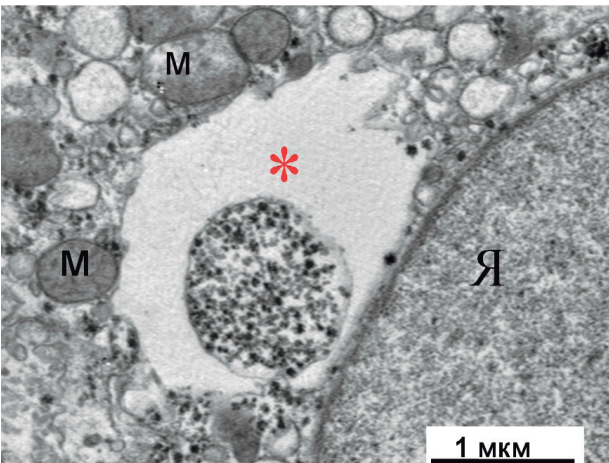


Рисунок 17. – Аутофагическая вакуоля (звездочка), М – митохондрии, Я – ядро гепатоцита. Процесс санации гепатоцита от HCV
Figure 17. – Autophagic vacuole (asterisk), М - mitochondria, Я - hepatocyte nucleus. HCV hepatocyte repair process

аутофагоцитозе, затем выделяются из клетки путем экзоцитоза. При этом непереваренные остатки уплотняются, в них часто откладывается пигмент, а сама лизосома теряет свою гидролитическую активность. Телолизосомы имеют уплотненное содержимое, нередко с вторичной структуризацией непереваренных соединений (рис. 18, 19).

Гранулы гемосидерина более 1 мкм состоят из частиц ферритина и окружены одноконтурной мембраной. В неделящихся клетках накопление телолизосом становится важным признаком старения. Так, с возрастом в клетках печени накапливаются телолизосомы с пигментом «старения» – липофусцином (рис. 20).

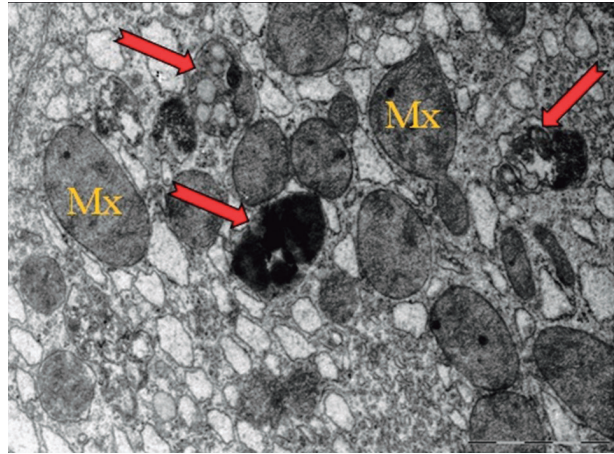


Рисунок 18. – Телолизосомы, или остаточные (резидуальные) тельца (стрелки). Мх – митохондрии. ×30 000
Figure 18. – Telolysosomes, or residual (residual) bodies (arrows). Mx - mitochondria. × 30 000

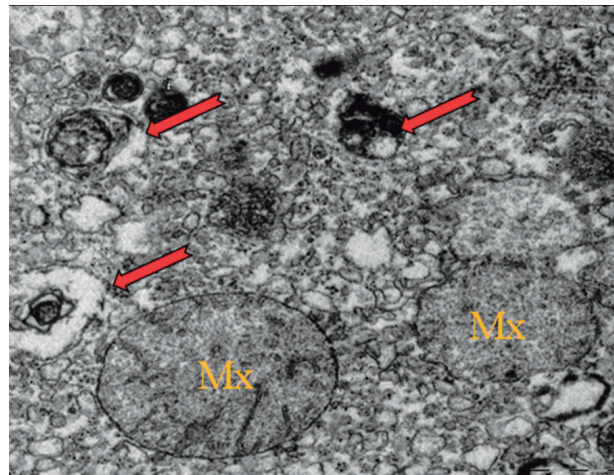


Рисунок 19. – Телолизосомы, или остаточные (резидуальные) тельца (стрелки); Мх - митохондрии. ×40 000
Figure 19. – Telolysosomes, or residual (residual) bodies (arrows); Mx - mitochondria. × 40 000

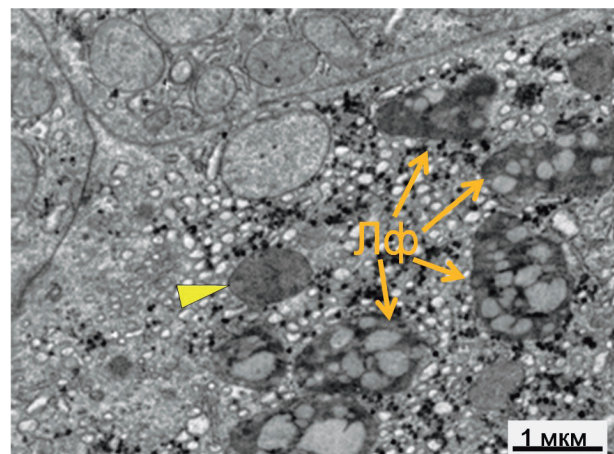


Рисунок 20. – Структуры, содержащие электронно-плотный матрикс, в который погружены множественные, мелкие липидные глобулы (липофусцинсодержащие лизосомы – Лф), локализованные на билиарном полюсе гепатоцита; наконечник стрелки - первичная лизосома
Figure 20. – Structures containing an electron-dense matrix, into which multiple, small lipid globules (lipofuscin-containing lysosomes - Лф) are immersed, located at the biliary pole of the hepatocyte; primary lysosome (arrowhead)

Выводы

Гибель гепатоцитов при ХГС, зависящая от аутофагии, – высоко регулируемый и консервативный клеточный механизм поддержания клеточного гомеостаза и содействия выживанию клеток. HCV-индуцированная аутофагия подавляет апоптоз, чтобы способствовать выживанию клеток. Вызванный HCV аутофагический ответ снижает противовирусный врожденный иммунный ответ в гепатоцитах, инфицирован-

ных HCV, способствуя хронизации инфекционного процесса.

Визуализация процесса аутофагии позволяет более точно оценить механизмы и ультраструктурные компоненты разных видов и стадий аутофагии. Изменения во всех структурных компонентах аутофагии не носят изолированный характер, характеризуются комплексом специфических признаков, ассоциированных друг с другом и объединенных апоптозогенным механизмом патогенеза HCV-инфекции.

References

- Wang F, Gómez-Sintes R, Boya P. Lysosomal membrane permeabilization and cell death. *Traffic*. 2018;19(12):918-931. doi: 10.1111/tra.12613.
- Guicciardi ME, Leist M, Gores GJ. Lysosomes in cell death. *Oncogene*. 2004;23(16):2881-2890. doi: 10.1038/sj.onc.1207512.
- Klionsky DJ. Autophagy revisited: a conversation with Christian de Duve. *Autophagy*. 2008;4(6):740-743. doi: 10.4161/auto.6398.
- Liu C, Qu A, Han X, Wang Y. HCV core protein represses the apoptosis and improves the autophagy of human hepatocytes. *Int. J. Clin. Exp. Med*. 2015;8(9):15787-15793.
- Mizushima N. Autophagy: Process and function. *Genes Dev*. 2007;21(22):2861-2873. doi: 10.1101/gad.1599207.
- Malhi H, Guicciardi ME, Gores GJ. Hepatocyte death: a clear and present danger. *Physiol. Rev*. 2010;90(3):1165-1194. doi: 10.1152/physrev.00061.2009.
- Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 2011;27:107-132. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154005.
- Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat. Cell Biol*. 2007;9(10):1102-1109. doi: 10.1038/ncb1007-1102.
- Liu Y, Levine B. Autophagy and autophagic cell death: The dark side of autophagy. *Cell Death Differ*. 2015;22(3):367-376. doi: 10.1038/cdd.2014.143.
- Pu J, Guardia CM, Keren-Kaplan T, Bonifacio JS. Mechanisms and functions of lysosome positioning. *J. Cell Sci*. 2016;129(23):4329-4339. doi: 10.1242/jcs.196287.
- Khandia R, Dadar M, Munjal A, Dhama K, Karthik K, Tiwari R, Yattoo MI, Iqbal HMN, Singh KP, Joshi SK, Chaicumpa W. Comprehensive Review of Autophagy and Its Various Roles in Infectious, Non-Infectious, and Lifestyle Diseases: Current Knowledge and Prospects for Disease Prevention, Novel Drug Design, and Therapy. *Cells*. 2019;8(7):674. doi: 10.3390/cells8070674.
- Mari M, Tooze SA, Reggiori F. The puzzling origin of the autophagosomal membrane. *F1000 Biol. Rep*. 2011;3:25. doi: 10.3410/B3-25.
- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. 2008;451(7182):1069-1075. doi: 10.1038/nature06639.
- Dash S, Chava S, Aydin Y, Chandra PK, Ferraris P, Chen W, Balart LA, Wu T, Garry RF. Hepatitis C Virus Infection Induces Autophagy as a Prosurvival Mechanism to Alleviate Hepatic ER-Stress Response. *Viruses*. 2016;8(5):E150. doi: 10.3390/v8050150.
- Aki T, Unuma K, Uemura K. Emerging roles of mitochondria and autophagy in liver injury during sepsis. *Cell Stress*. 2017;1(2):79-89. doi: 10.15698/cst2017.11.110.
- Ueno T, Komatsu M. Autophagy in the liver, functions in health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol*. 2017;14(3):170-184. doi: 10.1038/nrgastro.2016.185.
- Anding AL, Baehrecke EH. Cleaning house, Selective autophagy of organelles. *Dev. Cell*. 2017;41(1):10-22. doi: 10.1016/j.devcel.2017.02.016.
- Lemasters JJ. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation Res*. 2005;8(1):3-5. doi: 10.1089/rej.2005.8.3.
- Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Iwai K, Chiba T, Tanaka K, Suzuki T. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat. Genet*. 2000;25:302-305. doi: 10.1038/77060.
- Lazarou M, Jin SM, Kane LA, Youle RJ. Role of PINK1 binding to the TOM complex and alternate intracellular membranes in recruitment and activation of the E3 ligase Parkin. *Dev. Cell*. 2012;22(2):320-333. doi: 10.1016/j.devcel.2011.12.014.
- Greene AW, Grenier K, Aguilera MA, Muise S, Farazifard R, Haque ME, McBride HM, Park DS, Fon EA. Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment. *EMBO Rep*. 2012;13(4):378-385. doi: 10.1038/embor.2012.14.
- Jin SM, Youle RJ. PINK1-and Parkin-mediated mitophagy at a glance. *Cell Sci*. 2012;125(Pt 4):795-799. doi: 10.1242/jcs.093849.
- Nagar R. Autophagy: A brief overview in perspective of dermatology. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol*. 2017;83(3):290-297. doi: 10.4103/0378-6323.196320.
- Paolini A, Omairi S, Mitchell R, Vaughan D, Matsakas A, Vaiyapuri S, Ricketts T, Rubinsztein DC, Patel K. Attenuation of autophagy impacts on muscle fibre development, starvation induced stress and fibre regeneration following acute injury. *Sci. Rep*. 2018;8(1):9062. doi: 10.1038/s41598-018-27429-7.
- Campbell P, Morris H, Schapira A. Chaperone-mediated autophagy as a therapeutic target for Parkinson disease. *Expert Opin. Ther. Targets*. 2018;22(10):823-832. doi: 10.1080/14728222.2018.1517156.
- Majeski AE, Dice JF. Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2004;36(12):2435-2444. doi: 10.1016/j.biocel.2004.02.013.
- Kunz JB, Schwarz H, Mayer A. Determination of four sequential stages during microautophagy in vitro. *Biol. Chem*. 2004;279(11):9987-9996. doi: 10.1074/jbc.M3079052009.
- Cooper KF. Till death do us part: The marriage of autophagy and apoptosis. *Oxid. Med. Cell Longev*. 2018;2018:4701275. doi: 10.1155/2018/4701275.
- Füllgrabe J, Ghislat C, Cho DH, Rubinsztein DC. Transcriptional regulation of mammalian autophagy at a glance. *J. Cell Sci*. 2016;129(16):3059-3066. doi: 10.1242/jcs.188920.
- Tasset I, Cuervo AM. Role of chaperone-mediated autophagy in metabolism. *FEBS J*. 2016;283(13):2403-2413. doi: 10.1111/febs.13677.
- Hsu P, Shi Y. Regulation of autophagy by mitochondrial phospholipids in health and diseases. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids*. 2017;1862(1):114-129. doi: 10.1016/j.bbalip.2016.08.003.
- Kissová I, Salin B, Schaeffer J, Bhatia S, Manon S, Camougrand N. Selective and non-selective autophagic degradation of mitochondria in yeast. *Autophagy*. 2007;3(4):329-336. doi: 10.4161/auto.4034.
- Zaffagnini G, Martens S. Mechanisms of selective autophagy. *J. Mol. Biol*. 2016;428(9 Pt A):1714-1724. doi: 10.1016/j.jmb.2016.02.004.
- Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, Iemura S, Natsume T, Takehana K, Yamada N, Guan JL, Oshiro N, Mizushima N. Nutrient-dependent mTORC1

- association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol. Biol. Cell.* 2009;20(7):1981-1991. doi: 10.1091/mbc.E08-12-1248.
35. Dreux M, Gastaminza P, Wieland SF, Chisari FV. The autophagy machinery is required to initiate hepatitis C virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009;106(33):14046-14051. doi: 10.1073/pnas.0907344106.
 36. Shrivastava S, Bhanja Chowdhury J, Steele R, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus upregulates Beclin1 for induction of autophagy and activates mTOR signaling. *J. Virol.* 2012;86(16):8705-8712. doi: 10.1128/JVI.00616-12.
 37. Grégoire IP, Richetta C, Meyniel-Schicklin L, Borel S, Pradezynski F, Diaz O, Deloire A, Azocar O, Baguet J, Le Breton M, Mangeot PE, Navratil V, Joubert PE, Flacher M, Vidalain PO, André P, Lotteau V, Biard-Piechaczyk M, Rabourdin-Combe C, Faure M. IRGM is a common target of RNA viruses that subvert the autophagy network. *PLoS Pathog.* 2011;7(12):e1002422.
 38. Ke PY, Chen SS. Activation of the unfolded protein response and autophagy after hepatitis C virus infection suppresses innate antiviral immunity in vitro. *J. Clin. Invest.* 2011;121(1):37-56. doi: 10.1172/JCI41474.
 39. Ke PY, Chen SS. Autophagy in hepatitis C virus-host interactions: potential roles and therapeutic targets for liver-associated diseases. *World J. Gastroenterol.* 2014;20(19):5773-5793. doi: 10.3748/wjg.v20.i19.5773.
 40. Wang H, Tai AW. Mechanisms of Cellular Membrane Reorganization to Support Hepatitis C Virus Replication. *Viruses.* 2016;8(5):E142. <https://doi.org/10.3390/v8050142>.
 41. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Molecular biology of the cell. 2nd ed. New York; London: Garland Publ.; 1989. 1219 p.
 42. Lazar C, Uta M, Branza-Nichita N. Modulation of the unfolded protein response by the human hepatitis B virus. *Front. Microbiol.* 2014;5:433. doi: 10.3389/fmicb.2014.00433.
 43. Katze MG, Fornek JL, Palermo RE, Walters KA, Korth MJ. Innate immune modulation by RNA viruses: emerging insights from functional genomics. *Nat. Rev. Immunol.* 2008;8(8):644-654. doi: 10.1038/nri2377.
 44. O'donnell V, Pacheco JM, LaRocco M, Burrage T, Jackson W, Rodriguez LL, Borca MV, Baxt B. Foot-and-mouth disease virus utilizes an autophagic pathway during viral replication. *Virology.* 2011;410(1):142-150. doi: 10.1016/j.virol.2010.10.042.
 45. Ait-Goughoulte M, Kanda T, Meyer K, Ryerse JS, Ray RB, Ray R. Hepatitis C virus genotype 1a growth and induction of autophagy. *J. Virol.* 2008;82(5):2241-2249. doi: 10.1128/JVI.02093-07.
 46. Shrivastava S, Devhare P, Sujjantarat N, Steele R, Kwon YC, Ray R, Ray RB. Knockdown of autophagy inhibits infectious hepatitis C virus release by the exosomal pathway. *J. Virol.* 2016;90(3):1387-1396. doi: 10.1128/JVI.02383-15.
 47. Dash S, Chava S, Aydin Y, Chandra PK, Ferraris P, Chen W, Balart LA, Wu T, Garry RF. Hepatitis C Virus Infection Induces Autophagy as a Prosurvival Mechanism to Alleviate Hepatic ER-Stress Response. *Viruses.* 2016;8(5):E150. doi: 10.3390/v8050150.
 48. Ploen D, Hildt E. Hepatitis C virus comes for dinner: How the hepatitis C virus interferes with autophagy. *World J. Gastroenterol.* 2015;21(28):8492-8507. doi: 10.3748/wjg.v21.i28.8492.
 49. Ballabio A. The awesome lysosome. *EMBO Mol. Med.* 2016;8(2):73-76. doi: 10.15252/emmm.201505966.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом.

Сведения об авторах:

Цыркунов Владимир Максимович, д-р мед. наук, проф.; Гродненский государственный медицинский университет; e-mail: tvm111@mail.ru, ORCID: 0000-0002-9366-6789

Андреев Виктор Павлович, канд. биол. наук, проф.; Гродненский государственный медицинский университет; e-mail: vpandreev@mail.ru

Кравчук Римма Ивановна, канд. биол. наук; Гродненский государственный медицинский университет; e-mail: kravchuk@mail.ru

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

Financing. The study was performed without external funding.

Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the local ethics committee.

Information about authors:

Tsyrunov Vladimir, PhD, MD (Medicine), Professor; Grodno State Medical University; e-mail: tvm111@mail.ru, ORCID: 0000-0002-9366-6789

Andreev Viktor, PhD (Biology), Professor; Grodno State Medical University; e-mail: vpandreev@mail.ru

Kravchuk Rimma, PhD (Biology); Grodno State Medical University; e-mail: kravchuk@mail.ru

Поступила: 07.05.2020

Принята к печати: 13.05.2020

Received: 07.05.2020

Accepted: 13.05.2020