



Почему нельзя создать вакцину против ВИЧ/СПИДа

М.В. Супотницкий¹

ВИЧ/СПИД-пандемия обнаружена в 1981 г. на пике уверенности человека в собственном могуществе в борьбе с возбудителями опасных инфекционных болезней. Только год назад Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) торжественно рапортовала о глобальном искоренении древнего бича человечества — натуральной оспы. Поэтому общая доминанта ученых того времени заключалась в том, что наука с новым вызовом природы справится, ведь мы уже накопили опыт разработки вакцин, у нас в руках технологии генной инженерии, опыт массовых вакцинаций и пр. и пр. Вопреки всем этим ожиданиям ВИЧ-вакцина так и не создана по сей день. Правда, сомнений в возможности ее создания в отечественной литературе я пока не читал. Наоборот: «Мы все знаем о СПИДе, дайте нам денег и мы создадим ВИЧ-вакцину» — требуют ученые. Далее обычно следует заявление, что этой вакциной они покончат с пандемией СПИДа «как когда-то с натуральной оспой» (см., например, труд Воробьева А.А., 2003). То, что академик РАМН придерживался такой позиции понятно. Пик его деятельности пришелся как раз на то время, когда массовыми вакцинациями пытались решать все эпидемические проблемы и при этом не отвечали за здоровье вакцинированных людей. Но, на мой взгляд, любопытно еще и другое — когда обсуждаешь проблему борьбы с пандемией ВИЧ/СПИДа с молодыми учеными и врачами, то сразу выясняешь, что и их представления о перспективе борьбы с этой пандемией не выходят за рамки массовых вакцинаций. Увы, нашим молодым коллегам не

свойственно бунтарство в науке даже при столь низком денежном содержании. Поэтому давайте сами попытаемся понять эти два феномена — почему не удастся в течение 25 лет создать ВИЧ-вакцину; и почему вера в нее стала уже частью менталитета современного российского ученого с медицинским образованием.

1. Методология исследования

Раз в медицинских кругах существует твердая уверенность в том, что с ВИЧ/СПИД-пандемией можно покончить вакцинацией, «как когда-то с натуральной оспой», то сначала мы сравним инфекционные процессы, вызываемые ВИЧ (вирус иммунодефицита человека) и вирусом натуральной оспы (ВНО) по крайней мере, в той их части, когда на проникший в организм человека вирус еще могут влиять иммунные ответы, инициированные предшествующей вакцинацией. Затем мы сопоставим антигенные детерминанты этих вирусов, рассматриваемые учеными как пригодные для конструирования вакцин, и иммунные ответы на них. Кратко разберем, как эти ответы влияют на течение эпидемических процессов, вызванных ВИЧ и ВНО. После чего вернемся к опыту борьбы с натуральной оспой и посмотрим, насколько он применим для противодействия ВИЧ/СПИД-пандемии. Далее попробуем выявить тупики, образовавшиеся в представлениях об инфекционных и эпидемических процессах; и проанализируем наиболее распространенные учебные пособия, используемые для подготовки российских врачей, т.е. попытаемся взглянуть на рассматриваемые в статье феномены взаимодействия ВИЧ с клетками иммунной системы человека глазами врача, получившего образование в российской высшей школе.

2. Характер начальных взаимоотношений ВНО и ВИЧ с клетками иммунной системы

Начальные взаимоотношения вирусов со своими хозяевами предопределяют дальнейшее течение инфекционного и, соответственно, эпидемического процесса.

Вирус натуральной оспы. ВНО относится к громадному семейству ортопоксвирусов, представители которого вызывают инфекционные процессы практически у всех позвоночных организмов (Маренникова С.С., Щелкунов С.Н., 1998). ВНО среди людей распространяется воздушно-капельным путем. В организме человека он предварительно накапливается в альвеолярных макрофагах, затем по лимфатическим путям проникает в лимфатические узлы, где происходит его репликация. Ортопоксвирусы в отношении фагоцитирующих клеток ведут себя как паразитические организмы и используют их для своего размножения. Разрушившиеся фагоцитирующие клетки становятся источником вируса, а через 2—3 суток его обнаруживают уже в крови (первичная виремия), костном мозге, печени и селезенке.

В пробах крови больного натуральной оспой в этот период инфекционного процесса можно обнаружить как инфицированные, так и не инфицированные лейкоциты, но в основном репликация ВНО происходит в моноцитах/макрофагах. Лимфоциты остаются неинфицированными, они сохраняют свою функцию, хотя при этом и наблюдается выраженная лимфопения. Вирус распространяется из лимфатических узлов фагоцитирующими клетками крови по внутренним органам через выносящие (эфферентные) лимфатические сосуды. Затем вирус проникает в эпителий кожи и слизистых, где начинается его репликация. Появляются энантемы и экзантемы, инфицирование которых вторичной микрофлорой определяет эволюцию кожных элементов из везикул в пустулы. Количество вируса через 4—5 суток уже превышает ем-

¹ Супотницкий М.В., 1956 г. р., микробиолог, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник. С 1979 г. по 2006 г. работал на разных должностях в научно-исследовательских учреждениях Министерства обороны России (СССР), полковник запаса. В настоящее время эксперт одной из федеральных организаций, Москва. Автор книг «Микроорганизмы, токсины и эпидемии» (2000, 2005), «Очерки истории чумы» (2006), «Словарь генетических терминов» (2007). Область научных интересов: эволюционная и молекулярная генетика микроорганизмов; механизмы возвращения «забытых» и появление «новых» инфекционных болезней.

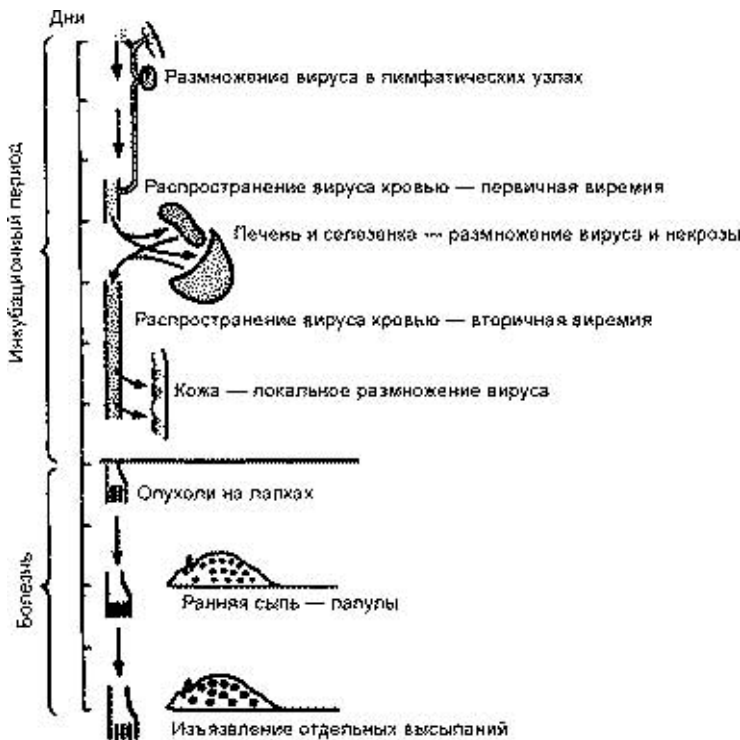


Рис. 1. Генерализация ортопоксивирусов на примере вируса экстремелии у мышей (по Fenner F., 1948). Процесс осуществляется благодаря макрофагам. Вирус ведет себя как их паразит, и быстро размножается. Он не поддерживается в макрофагах в качестве эндосимбионта, а активно их разрушает, затем попадает в кровь, где «встречается» со специфическими антителами.

кость ретикуло-эндотелиальной системы, и он вновь проникает в кровяное русло (рис. 1).

Вторичная виремия обычно соответствует началу клинической манифестации болезни. Специфические антитела выявляются в крови на седьмые сутки после инфицирования, и их максимальный уровень достигается на 14 сутки. Уже на 10-е сутки болезни заразность больного для окружающих резко снижается. Через 4 недели от начала болезни вирус невозможно выделить из отделяемого носоглотки и из мочи реконвалесцента. У выживших людей развивается стерильный иммунитет. Более подробно о патогенезе ВНО см. в работах Esteban D. J., Buller R. M., 2005; McFadden G., 2004; Маренниковой С.С., Щелкунова С.Н., 1998; Mark R. L. et al., 1991.

Способность к паразитическому размножению в макрофагах имеет однозначное значение для оценки патогенности ортопоксивирусов. Например, LD50 вируса экстремелии с инактивированным геном r28, ответственным за его репликацию в фагоцитирующих клетках, увеличивается, по крайней мере, в 106 раз, а вирусная нагрузка в печени и селезенке дефектного штамма вируса в 1000 раз меньше, чем у исходного (Senkevich T. G. et al., 1994).

Интенсивная репликация ВНО в макрофагах сопровождается явлением, которое из-

за его неблагоприятного исхода, назвали «цитокиновым штормом» («cytokine storm»). Оно проявляется каскадной активацией и выбросом инфицированными макрофагами значительных количеств различных лимфокинов (monocyte chemoattractant protein 1, macrophage inflammatory protein 1бета, IFN-гамма, IL-6 и др.) и развитием клиники токсемии и шока, приводящих больного к смерти (Jahrling P.B. et al., 2004).

По данным R. Xu et al. (2004), для освобождения организма от ортопоксивирусов, необходимо участие в иммунных ответах CD4+ Т-клеток — субпопуляция Т-клеток, оказывающая помощь В-клеткам в продукции специфических антител; и МНС класса II — эти молекулы локализованы на поверхности макрофагов и обеспечивают включение в иммунный ответ CD4 Т-клеток. В ответах на острую инфекцию, вирусоспецифические антитела наиболее эффективно освобождают организм от вируса. Вирус разрушается по различным механизмам, предполагающим участие таких антител. Во-первых, антитела могут непосредственно связывать вирус, вызывая его агрегацию и препятствуя адсорбции и интернализации в клетках. Во-вторых, они могут связывать вирус, вызывая его разрушение с помощью комплемента или опсонизации, а затем посредством фагоцитоза. Антитела могут свя-

зывать инфицированные клетки хозяина, вызывая цитотоксические реакции со стороны клеток-киллеров и др.

Информацию о важной роли гуморального звена иммунитета в патогенезе ВНО можно найти и в старых работах. По данным A. Downie et al. (1958), геморрагическая форма натуральной оспы с летальным исходом развивалась у людей с врожденными дефектами иммунной системы, проявившимися отсутствием антител в ответ на вакцинацию против натуральной оспы. При инфицировании таких больных ВНО, у них развивалась выраженная виремия, вирус в высоких титрах обнаруживали в фарингеальном тракте.

Вирус иммунодефицита человека. ВИЧ принадлежит к семейству ретровирусов (Retroviridae) — сложных РНК-геномных вирусов, образующих с помощью обратной транскриптазы ДНК-копию генома. Для включения вируса в это семейство обязательны следующие признаки:

- 1) наличие липидной оболочки и сердцевин (core) и характерная морфология, на основании которой их делят на типы В, С и D;
- 2) наличие обратной транскриптазы внутри вириона;
- 3) геном в виде однонитевой линейной РНК, которая образует комплекс, состоящий из двух идентичных субъединиц (т.е. они представляют собой диплоидные организмы, каждый их вирион содержит две идентичные цепи РНК размером от 8 тыс. до 10 тыс. нуклеотидов, соединенные вблизи своих 5'-концов);
- 4) репликация через стадию образования двунитевого ДНК-провируса, соответствующего по длине одной из субъединиц геномной РНК;
- 5) интеграция ДНК-провируса с клеточным геномом и осуществление транскрипции клеточной РНК-полимеразой (после интеграции ретровирусная ДНК реплицируется как часть клеточной ДНК), созревание вириона путем почкования на клеточных мембранах (Альштейн А.Д., 1982).

ВИЧ — экзогенный ретровирус, т.е. он способен размножаться в клетке с формированием инфекционной частицы и передаваться как между клетками, так и многоклеточными хозяевами. Однако в отличие от ВНО, он не представляет для клетки что-то новое. Геном человека на 45 % состоит из ретротранспозонов (эндогенных ретровирусов, ретротранспозонов и их производных), кодирующих обратную транскриптазу и перемещаются по геному через образование РНК-транскрипта.

Более подробно об эндогенных ретровирусах см. в работе N. Bannert и R. Kurth (2004). По приведенным ими данным получается, что структуры подобные ВИЧ, и есть геном человека.

В организм человека ВИЧ попадает как эволюционно сложившимися путями для передачи ретровирусов — половым (т. е. через слизистую оболочку полового пути) и через плаценту от матери к плоду; так и искусственными (искусственными) путями, не встречающимися при естественном распространении ретровирусов — через кровь ВИЧ-инфицированных людей и посредством инъекций ВИЧ-инфицированных наркотиков. В отличие от ВНО, ВИЧ распространяется по организму человека не только фагоцитирующими клетками, но Т- и В-клетками, тромбоцитами и эритроцитами (Horakova E. et al., 2004).

Другие принципиально важные отличия ВИЧ-инфекции от натуральной оспы включают участие в процессе генерализации ВИЧ клеток иммунной системы, отвечающих за Т- и В-клеточные ответы, ВИЧ-специфических антител и факторов, традиционно относимых учеными к системе врожденного иммунитета (innate immune system; см. ниже). Продолжительность самого процесса генерализации ВИЧ ограничена не ответными реакциями иммунной системы (как при генерализации ВНО), а продолжительностью жизни инфицированного человека. Стерильного иммунитета при ВИЧ-инфекции никогда не наступает. Во-первых, ВИЧ постоянно поддерживается и

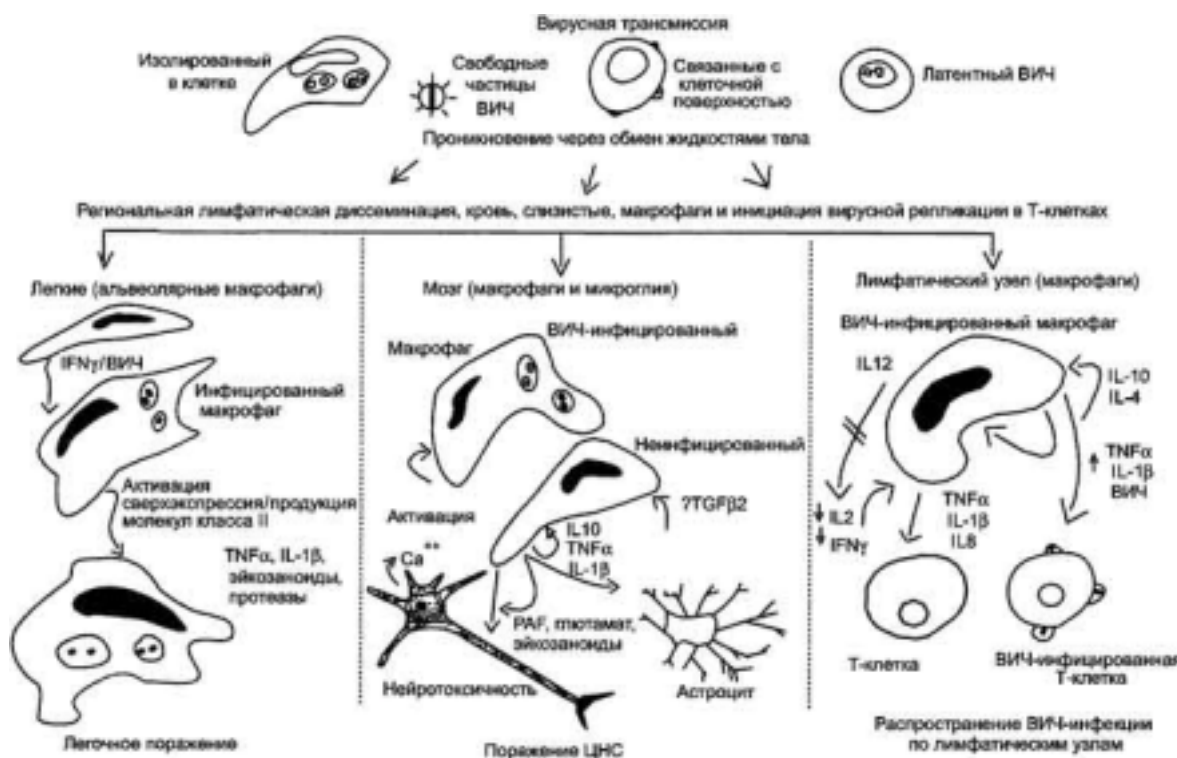
реплицируется в фагоцитирующих клетках (Trujillo R. et al., 2007). Во-вторых, отдельные активированные инфицированные Т-клетки «переживают» инфекцию и становятся длительно живущими латентными носителями вируса. Их реактивация дефектными частицами ВИЧ и другими факторами вновь приводит к активной репликации вируса (Finzi D. et al., 2006).

И, наконец, иммунная система человека сама поддерживает существование способных к инфекции вирионов ВИЧ посредством системы белков AID/APOBEC Т-хелперов и макрофагов, в чем ее никак не заподозришь при натуральной оспе. Ген APOBEC 3G (apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G) кодирует белок, который упаковывается в ретровирусные частицы, где дезаминирует цитозин на урацил в минус цепи вирусной ДНК в процессе обратной транскрипции. В результате чего в плюс цепи кДНК гуанозин заменяется аденином и репликация ВИЧ останавливается. Этот механизм распространяется только на ВИЧ, лишены гена белка Vif (фактор инфекционности вируса), и не влияет на продукцию вируса с полноценным Vif. Ген APOBEC 3G функционирует одинаковым образом как в Т-клетках-хелперах, так и в макрофагах (Conticello S.G. et al., 2005; Wahl S. et al., 2006; Cullen B.G., 2006). По своей сути этот странный механизм компенсирует ошибки в гене vif, допущенные обратной транскриптазой при синтезе ДНК на матрице РНК.

Теперь более внимательно присмотримся к взаимоотношениям ВИЧ с макрофагами. В отличие от ВНО, ВИЧ поражает различные клетки человека, но два типа являются критическими для развития ВИЧ-инфекции — это Т-лимфоциты-хелперы и макрофаги. ВИЧ избирательно поражает именно специфические к ВИЧ Т-хелперы. Такие клетки у инфицированных ВИЧ индивидуумов на всех стадиях болезни содержат больше ДНК ВИЧ, чем CD4+ Т-клетки с другой специфичностью (Douek D. C. et al., 2002). Если Т-хелперы постепенно устраняются из крови самим вирусом, то макрофаги, наоборот, приобретают устойчивость к апоптозу и используются ВИЧ до самой гибели больного СПИДом. Еще в 1994 г. Stevenson M. и Gendelman H.E. пришли к выводу, что именно макрофаги играют центральную роль в прогрессировании ВИЧ-инфекции (рис. 2).

Поведение макрофагов, вышедших из под контроля Т- и В-клеточной системы иммунитета, мало похоже на то, что приписывается им учебниками по иммунологии и представлениям о фагоцитозе, сложившимся еще со времен И.И. Мечникова. Трафаретным является представление о том, что макрофаги относятся к системе врожденного иммунитета, и основное их предназначение — удаление из крови микроорганизмов, опухолевых клеток, иммунных комплексов, презентация антигенов лимфоцитам и т.п. (см., например, работы Б.И. Кузника, 2004; А.С. Ройта с соавт., 2000; В.Г. Галактионова, 1998; Воробьева с соавт., 1994). Приведенные выше данные

Рис. 2. Роль макрофагов в генерализации ВИЧ-инфекции. Вирус проникает в организм человека как в составе макрофагов, так и с тканевыми жидкостями в виде свободных частиц. В начальном периоде инфекции ВИЧ не разрушает макрофаги и поддерживается у части из них в качестве эндосимбионта. Макрофаги распространяют ВИЧ по тканям и органам. От моноцитов вирус передается к взаимодействующим с ними Т-хелперами. В этом процессе Т-хелперы активируются через представление антигена главным комплексом гистосовместимости макрофагов, но постепенно их функция ослабевает и макрофаги выходят из под «контроля» Т- и В-клеточной системы иммунитета (Stevenson M., Gendelman H.E., 1994).



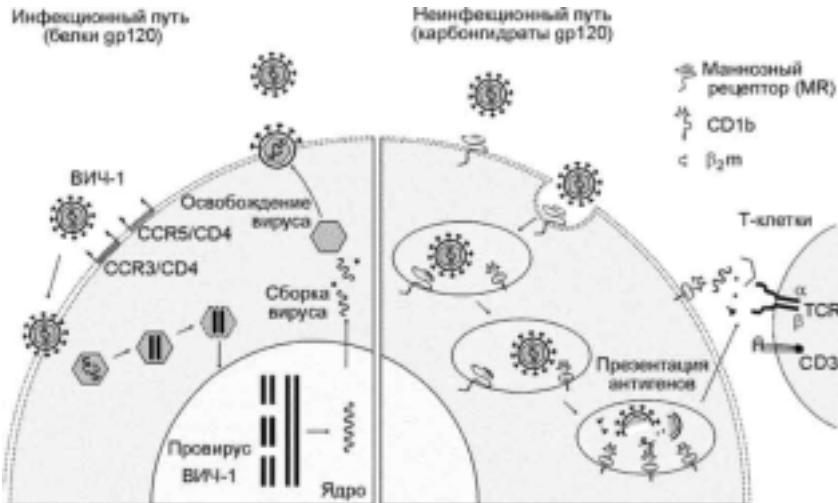


Рис. 3. Модели проникновения ВИЧ-1 в макрофаги/микроглию. Неинфекционный путь HIV-1 (правая схема) — в присутствии маннозного рецептора (MR), богатые маннозой карбонгидраты gp120 иницируют проникновение вируса в макрофаг. Этот путь проявляет себя презентацией антигенов вируса через CD1b-антиген, и индуцирует клеточное звено иммунитета. Инфекционный путь HIV-1 (левая схема) регулируется через белок/протеиновое взаимодействие между gp120 ВИЧ-1 и клеточными белковыми рецепторами, сгруппированными с корецепторами. MR — маннозный рецептор (Trujillo R. et al., 2007).

показывают активное участие макрофагов в поддержании и распространении ВИЧ в организме человека, но никак не «удаление» ВИЧ из организма человека. А так как макрофаги и другие фагоцитирующие клетки позвоночных — это эволюционные потомки простейших одноклеточных организмов, существовавших еще до образования многоклеточной жизни (Купер Э., 1980), то можно предположить, что их отношения с ретровирусами сложились еще в Архее (более подробно см. в моей монографии: Супотницкий М.В., 2007).

В плане развития работ по установлению природного резервуара ВИЧ, интерес представляет еще и взаимодействие ВИЧ с макрофагами не только посредством хемокиновых рецепторов, но и маннозных, что более характерно для взаимоотношений паразитов почвенных и водных простейших со своими хозяевами (Allen P.G., Dawidowicz E.A., 1990; Zhantao Yang et al., 1997). Причем в последнем случае он ведет себя как эндосимбионт, т.е. не интегрируется с геномом макрофага и

не реплицируется (рис. 3).

По данным S. Wahl et al. (2006), клеточная поверхность и внутриклеточные механизмы макрофагов оказались весьма эффективными для поддержания ретровирусов на всех этапах их жизненного цикла. И хотя многие из них «подражают» таковым у CD4+ Т-клеток, этими авторами получены доказательства существования у макрофагов хорошо отлаженных индивидуальных механизмов, позволяющих ВИЧ более эффективно колонизировать макрофаги, чем Т-клетки-хелперы. Например, в дополнение к хемокиновому рецептору CD4 и корецептору CCR5 Т-клеток-хелперов, наружная мембрана макрофагов содержит белок аннексин II (annexin II), облегчающий ранние этапы проникновения ВИЧ в клетку. Связывание ВИЧ с макрофагами осуществляется более просто, чем с Т-клетками-хелперами, так как для этого он может использовать значительно большее количество поверхностных молекул клетки, а не только рецептор CD4 (рис. 4).

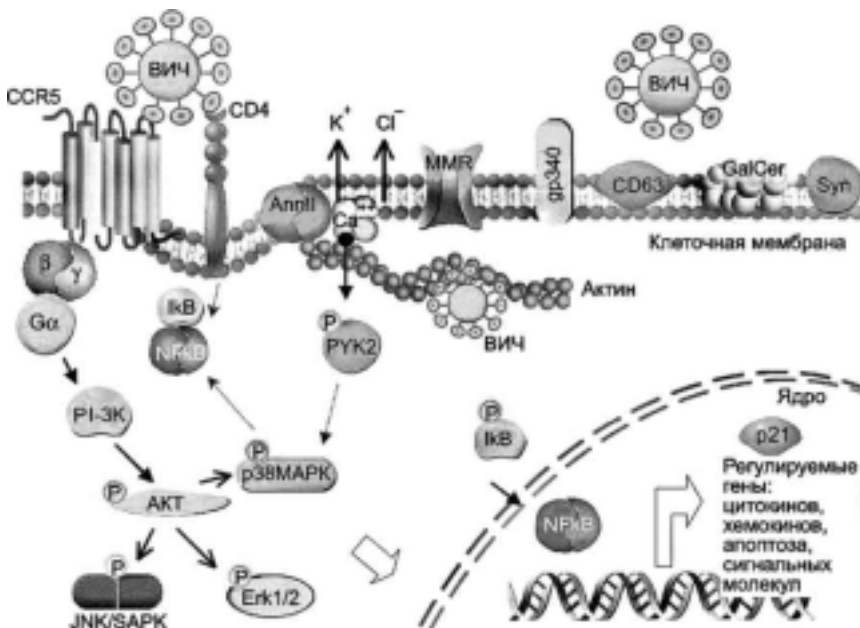


Рис. 4. Схематическое изображение участка мембраны макрофага, способного к взаимодействию с ВИЧ. (no Wahl S. et al., 2006)

В дополнение к каноническим рецепторным структурам типа CD4 и CCR5/CXCR4 (имеющимся у Т-хелперов), мембрана макрофага имеет дополнительные молекулярные структуры, позволяющие вирусу эффективно узнавать макрофаг, присоединяться к его наружной поверхности и проникать во внутрь клетки. Они играют важную роль в сигнальных клеточных актах, лежащих в основе жизненного цикла вируса. Взаимодействие гликопротеина gp120 ВИЧ с CCR5 приводит к сигнальной трансдукции, активирующей PI-3K (PI — ингибитор протеазы). PI-3K, в свою очередь, активирует серин/треонин протеин киназу (serine/threonine protein kinase, AKT). Далее запускается каскад реакций фосфорилирования, формирующих связи между транскрипционными актами. Аннексин (annexin II, Ann II) — это кальцийсвязывающий белок [calcium (Ca++)-binding protein], он взаимодействует с фосфатидилсеринем (phosphatidylserine) Env ВИЧ, участвует в актин-цитоскелетных перестановках (actin cytoskeletal rearrangement) и в транспорте вируса во внутрь макрофага. Актин и аннексин II «вовлекают» вирус в эндосомальный компартмент, где он чувствует себя «как дома». В «узнавании» ВИЧ также участвуют маннозный рецептор макрофага (macrophage mannose receptors, MMR; см. рис. 3), gp340, CD63, галактозилцереброзид (galactosylcerebroside, GalCer) и синдекан (syndecan, Syn). Точечные линии относятся к путям, предполагаемым для Т-клеток. Pyk2 (proline-rich tyrosine kinase-2) — пролин-обогащенная тирозин киназа-2; SAPK (stress-activated protein kinase) — стресс-активированная протеин киназа (Wahl S. et al., 2006).

Среди компонентов мембраны макрофагов в качестве кандидатов в кофакторы, позволяющих gp120 или gp41 ВИЧ взаимодействовать с этими клетками, помимо маннозных рецепторов, уже описаны протеогликаны гепарин-сульфата (heparan sulfate proteo-glycans), такие как синдекан (syndecan); цистеин-богатый рецептор-мусорщик (cysteine-rich scavenger receptor), gp340; эластаза лейкоцитов человека (human leukocyte elastase), локализованная на клеточной поверхности и др.

В зависимости от обстоятельств каждая из этих молекул (вместе или по отдельности с другими), может присоединять и концентрировать ВИЧ на поверхности макрофага, обеспечивать ему слияние с клеточной мембраной и/или влиять на его внутриклеточное «благополучие» посредством сигнальной трансдукции. S. Wahl et al. (2006), исследовавшие возможные клеточные механизмы торможения репликации ВИЧ, которые могли бы рассматриваться как «защита клетки от вируса», не нашли убедительных доказательств их наличия.

В отличие от ВНО, ВИЧ не разрушает макрофаг, а использует его для длительного существования в макроорганизме. После взаимодействия с макрофагом, он индуцирует сигнально-трансдукционные акты, приводящие к транскрипции генов хозяина. Эти ответы, как правило, скоротечные и клетка возвращается к покоящемуся фенотипу («resting» phenotype) в течение 24–48 часов. Если взаимоотношения ВИЧ с макрофагом начали складываться по инфекционному пути (см. рис. 3), то в этих временных пределах вирус начинает свой жизненный цикл. Между 5 и 10 сутками после инфицирования макрофага, начинается активная продукция ВИЧ. Ее мак-

симум достигается на 14 сутки (для сравнения — у человека, инфицированного ВНО, к этому времени уже развивается стерильный иммунитет). В макрофаге у ВИЧ экспрессируются гены, важные не только для его собственной репликации, но и способные эффективно оказывать влияние на функцию клетки-хозяина (рис. 5).

Гены сигнальной трансдукции наиболее активно экспрессируются ВИЧ-инфицированным макрофагом в 1-е и 14-е сутки; пики экспрессии генов транскрипции, клеточного цикла и апоптоза приходятся на 1-е сутки и на 7–14; гены метаболических процессов, цитокинов и хемокинов наиболее активны в 1-е сутки после инфицирования (Vazquez N. et al., 2005).

Многокомпонентные инфекционные процессы

Одной из самых ранних находок у ВИЧ-иммунокомпромированных людей стала их повышенная чувствительность к оппортунистическим инфекциям. По мере прогрессирования болезни, обычно тогда когда количество хелперных Т-лимфоцитов становится меньше 400 — 200 на мм³, у ВИЧ-инфицированных пациентов развиваются инфекционные процессы, называемые СПИД-ассоциируемыми.

Наиболее чувствительными к ослаблению иммунной защиты организма являются вирус герпеса зостер (опоясывающий лишай), грибок кандиды (молочница), вирус Эпштейна-Барра (волосатая лейкоплакия полости рта), туберкулезная палочка (стадия пре-СПИДа). На фоне прогрессирующего паралича иммунной системы (ранняя стадия СПИДа) активируются пневмоцисты, гистоплазмы,

кокцидии, криптококки, токсоплазмы, вирус простого герпеса, криптоспоры. Терминальная стадия СПИДа (число Т-хелперов падает до минимума) сопровождается активацией цитомегаловируса и атипичных микобактерий — предвестников фатального исхода (Милз Д., Мазур Г., 1990).

Но у многих исследователей ВИЧ/СПИД-пандемии вызывает недоумение то обстоятельство, что нет логики в «подборе» перечня СПИД-ассоциируемых инфекций. Их возбудители таксономически крайне неоднородны, отсутствуют видимые признаки сходства в жизненных циклах и экологии. Иными словами, между условно-патогенными паразитами и СПИД-ассоциируемыми инфекциями нет обязательной обусловленности (см. работу Лысенко А.Я. с соавт., 1996). Отсутствие ожидаемой «логики» или «обусловленности» СПИД-ассоциируемых инфекций все же указывает на возможность определенной специфичности в подборе их возбудителей. Вот только два примера, отражающих надклеточный уровень взаимодействия ВИЧ и возбудителей других инфекционных болезней.

Сурфактантный белок А (SP-A), присутствующий в бронхоальвеолярной жидкости ВИЧ-инфицированных людей, усиливает прикрепление *Mycobacterium tuberculosis* к альвеолярным макрофагам, провоцируя туберкулезную инфекцию (Downing J.P. et al., 1995). Этот процесс на стадии «преСПИДа» не связан с ослаблением иммунной системы, так как инфицирование человека туберкулезной палочкой обычно происходит еще до истощения Т-хелперов (Downing J.P. et al., 1995). *M. tuberculosis* и их белки, в свою очередь, способны активировать репликацию ВИЧ в макрофагах (Toossi Z. et al., 1997). Развитие ту-

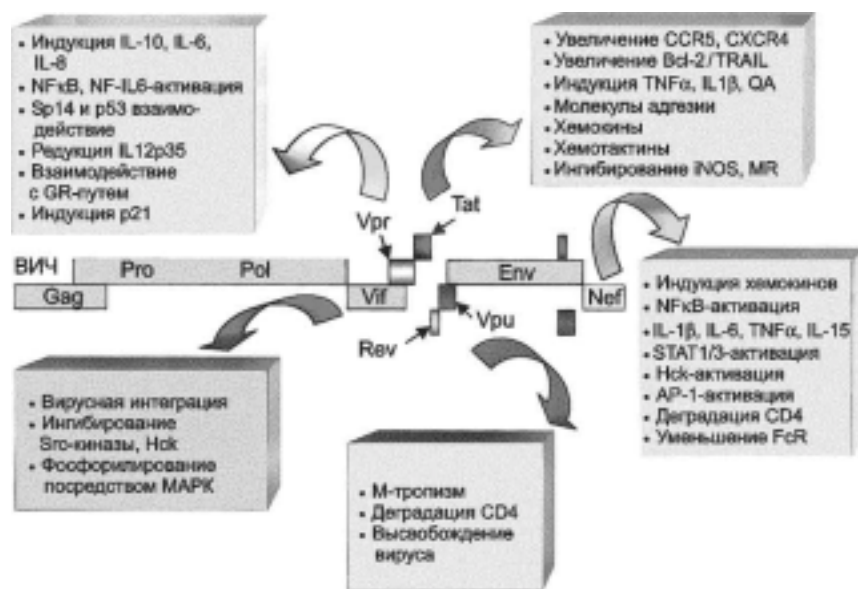


Рис. 5. Механизмы контроля со стороны ВИЧ над внутриклеточными процессами макрофагов. Белки ВИЧ Vpr, Vpu, Vif и Nef, в дополнение к Tat-регуляторному белку, влияют на сигнальную трансдукцию, генную экспрессию и белковый синтез клетки.

Сокращения:

- Sp1 (specificity protein-1) - специфичный белок-1;
- GR (glucocorticoid receptor) - глюкокортикоидный рецептор;
- QA (quinolinic acid) - квинолиновая кислота;
- TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) - TNF-связанный апоптоз-индуцирующий лиганд;
- iNOS (inducible nitric oxide synthase) - индуцибельная окись-азота синтаза;
- MR (mannose receptor) - маннозный рецептор;
- STAT (signal transducer and activator of transcription) - сигнальный преобразователь и активатор транскрипции;
- AP-1 (activated protein-1) - активированный белок-1;
- HCK (hematopoietic cell kinase) - гематопоэтическая клеточная киназа;
- FcR (Fc receptor) - Fc-рецептор;
- p21 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A);
- CDKN1A - циклин-зависимый ингибитор киназы 1A) (Wahl S. et al., 2003).

беркулезной инфекции усиливает репликацию ВИЧ и, соответственно, увеличивает вирусную нагрузку в крови ВИЧ-инфицированных пациентов. По данным Goletti D. et al. (1996), она возрастает от 5 до 160 раз в период острой фазы туберкулеза.

Для возбудителя другой СПИД-индикаторной инфекции — *Mycobacterium avium*, известны, по крайней мере, три таких фактора. Первый, это интерлейкин 6 (IL-6). Его повышенный синтез у ВИЧ-инфицированных людей резко увеличивает чувствительность макрофагов к *M. avium*. Второй — гликопротеин gp120 самого ВИЧ. Он усиливает размножение *M. avium* в альвеолярных макрофагах, — заражение человека этой микобактерией становится специфическим и неизбежным (Denis M., 1994a). Третий, это Tat-белок ВИЧ, транскриптор транскрипции вируса (transactivator of transcription), обеспечивающий усиление репликации вируса и регулирующий экспрессию клеточных генов. Он с высокой аффинностью присоединяется к *M. avium* посредством интегрин (integrin alpha 5 beta 1), присутствующего на поверхности микобактериальной клетки. В результате у *M. avium* значительно возрастает инфективность в отношении альвеолярных макрофагов человека (Denis M., 1994b).

Клеточный уровень таких взаимодействий так же еще только начинает изучаться, но уже имеются примеры специфичности взаимодействия ВИЧ и возбудителей ВИЧ-индикаторных инфекций. Например, по данным S. Wahl et al. (2003), *M. avium* активирует основной транскрипционный активатор воспалительных цитокинов, NF-κB (nuclear factor κB) и увеличение экспрессии CCR5 и цитокинов. Оба фактора стимулируют репликацию ВИЧ у инфицированного макрофага, и восприимчивость неинфицированного макрофага к этому вирусу (рис. 6).

Обнаружены и более сложные механизмы активации экзогенных ретровирусов возбудителями оппортунистических инфекций. Например, экспрессия генов ВИЧ, регулируемая посредством LTR, может быть транскрипирована регуляторными генами многих ДНК-вирусов, обычно инфицирующих людей. Среди них вирус простого герпеса первого и второго типов, цитомегаловирусы, герпес-вирус 6, вирус гепатита В (Urnovitz H. B., Murphy W. H., 1996).

Имеются доказательства специфичности процессов взаимодействия экзогенных ретровирусов и эндогенных ретроэлементов, т.е. на уровне генома человека. Например, эндогенные ретровирусы и ретроэлементы

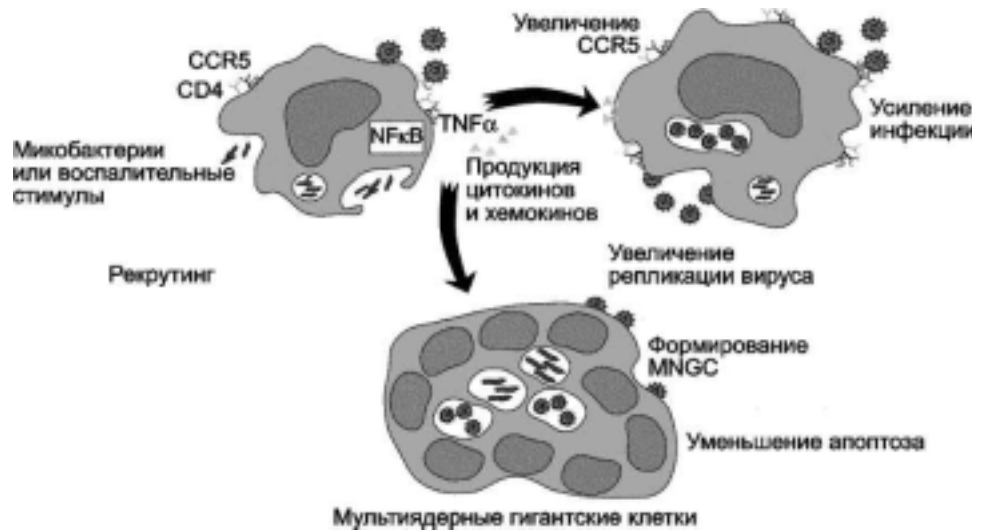


Рис. 6. Один из механизмов индукции благоприятных для ВИЧ факторов в макрофагах, инфицированных *M. avium*. Микобактерия активирует NF-κB, экспрессию CCR5, синтез хемокинов и цитокинов; и подавляет апоптоз. В результате у макрофага повышается восприимчивость к ВИЧ, а в ВИЧ-инфицированных макрофагах вирус активно размножается. Образование бактериальных скоплений в макрофаге вызывает у людей гранулематозоподобные поражения, наполненные мультиядерными гигантскими клетками (multinucleated giant cells; MNGC), активированными макрофагами и заново рекрутированными мононуклеарными клетками (Wahl S. M. et al., 2000).

усиливают инфекционный процесс, вызванный экзогенным ретровирусом. H.B. Urnovitz и W.H. Murphy (1996) описали ВИЧ-инфицированного пациента, чья иммунная система, благодаря активности эндогенного ретровируса млекопитающих типа С, находилась в хронически активированном состоянии. В результате прогрессирование ВИЧ-инфекции шло очень стремительно.

Эндогенные ретровирусы и ретроэлементы способны к комплементации нарушенных функций экзогенных ретровирусов. Отдельные HERV-K (эндогенные ретровирусы человека) имеют транскрипционно активные открытые рамки считывания и кодируют собственную протеазу, идентичную протеазе ВИЧ. Протеаза HERV-K может комплементировать функцию протеазы ВИЧ у ВИЧ-инфицированных пациентов, подвергнутых лечению ингибиторами протеаз, и тем самым значительно снизить эффективность таких препаратов (Padow M. et al., 2000).

Экзогенные ретровирусы в свою очередь могут активизировать эндогенные ретровирусы и ретроэлементы. J.J. Goedert et al. (1999) показали усиление экспрессии генов эндогенного ретровируса K10 (HERV-K10) у ВИЧ-инфицированных людей и больных СПИДом. И, соответственно, повышение риска развития у них тестикулярного рака (testicular cancer). ВИЧ индуцирует появление вирусных частиц HERV-K(HML-2) в сыворотке человека (Contreras-Galindo R. et al., 2006). Пока неизвестно, способна ли ВИЧ-инфекция стимули-

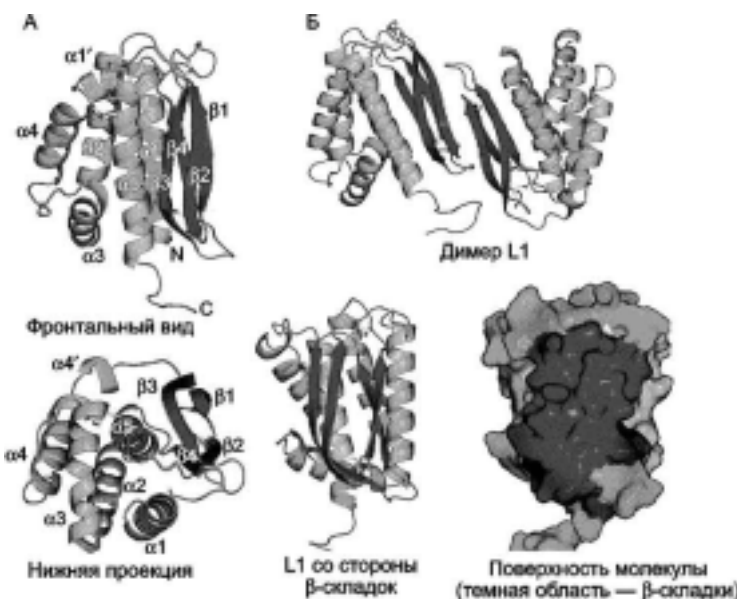
ровать горизонтальный перенос HERV-K(HML-2) между людьми, но такую возможность нельзя исключать.

Таким образом, иммунная система легко распознает и ВИЧ, и ВНО, об этом свидетельствуют клеточно-опосредованные и гуморальные иммунные реакции. Ответы иммунной системы на оба вируса весьма эффективны, но прямо противоположны по содержанию:

1. ВНО вызывает инфекционный монопроцесс, имеющий циклическое течение. На начальном этапе инфекции он ведет себя как облигатный паразит макрофагальных клеток, имеет короткий цикл размножения, разрушает клетку и в течение первых двух суток с момента проникновения в организм человека становится доступным как для антител, так и клонов лимфоцитов, несущих иммунологическую память об антигене, использованном для вакцинации. Сохранение Т- и В-клеточных звеньев иммунитета формирует полноценные гуморальные и клеточные ответы на вирус, способствующие его полной элиминации из организма, инфекционный процесс прекращается. Поэтому ВНО меняет хозяина на 8–10 суток от начала болезни, но так как люди, перенесшие натуральную оспу, формируют иммунную прослойку, препятствующую дальнейшему распространению вируса, вызываемый им эпидемический процесс ограничивается, т.е. носит циклический характер.

Рис. 7. Структура белка L1.

- А. Две проекции белка L1 на ленточной диаграмме. Фронтальный вид (верхнее изображение) показывает расположение спиралей на одной стороне молекулы, на другой стороне изображены параллельные бета-складки, сформированные непараллельными бетацепями, соединенными через петлю и тремя дисульфидными связями. Нижняя проекция показывает бета3, бета4 и альфа5, упакованные вблизи центра молекулы. Обозначены спирали (альфа1-альфа5), N-конец (N), и C-конец (C).
- Б. Вверху показан димер L1. Взаимодействие двух L1 молекул происходит через края бета-складок. Нижнее изображение показывает L1 со стороны бета-складок (темная область). L1 – это крупная консервативная белковая молекула-мономер с несколькими конформационными эпитопами, презентирется иммунным клеткам в виде хоорошо им заметного димера (Su Hua-Poo, 2005).



2. На начальном этапе инфекции ВИЧ взаимодействует с клетками иммунной системы более сложно, чем ВНО. Он колонизирует как макрофаги, так и Т-клетки-хелперы, и устанавливает контроль над их генетическим аппаратом. Вирус блокирует апоптоз макрофага и интегрируется с геномом Т-хелпера, поэтому его персистенция по макроорганизму не может контролироваться специфическими антителами, как это происходит в отношении ВНО. В зависимости от рецепторов, посредством которых ВИЧ взаимодействует с макрофагом, он вступает с ним либо в симбиотические отношения, либо начинает размножаться. Оба этих процесса идут одновременно, и усиливают диссеминацию ВИЧ (механизмы этого процесса мы рассмотрим в следующей главе). Инфекционный процесс постоянно усложняется, к моменту смерти больного он представляет уже комплекс нециклических инфекционных процессов, в которых участвуют не только ВИЧ и возбудители СПИД-ассоциируемых инфекций, но и эндогенные ретровирусы генома человека. Так как ВИЧ передается в основном половым путем, а иммунная система человека не способна ограничить размножение вируса и сформировать иммунную прослойку среди населения, как это имеет место в отношении ВНО, то вызванный им эпидемический процесс носит необратимый нециклический характер.

3. Сопоставление антигенных детерминант ВНО и ВИЧ, используемых для создания вакцин

ВНО и другие ортопоксвирусы представляют собой очень благодарный для иммуноло-

га объект исследования, так как реакции иммунной системы человека на них всегда укладываются в представления об иммунитете и инфекции, сложившиеся еще в начале XX столетия. В таких исследованиях открывается обширное поле деятельности по детализации прописных истин из старых учебников, поэтому они всегда «глубоко научны». Но как мы увидим ниже, реакции иммунной системы на антигены ВИЧ не вписываются в эти привычные рамки.

Антигенные детерминанты ВНО. Основной антигенной детерминантой поксвирусов и мишенью для протективных антител является консервативный белок L1 (другое название L1R). У вируса вакцины (так называют ортопоксвирус, используемый в настоящее время для вакцинации людей против ВНО), вируса оспы обезьян и ВНО этот белок различается отдельными аминокислотами. Антитела к L1 способны блокировать инвазию ортопоксвирусов в клетки. Поэтому он рассматривается учеными в качестве кандидата на включение в перспективные противооспенные вакцины (рис. 7).

По данным Н. Su et al. (2005), L1 играет основную роль в «созревании» вирионов ортопоксвирусов. На заключительной стадии морфогенеза вируса образуются так называемые внутриклеточные созревающие вирионы (intracellular mature virions, IMVs), которые имеют липидные мембраны и представляют собой уже способные к инфекции формы вируса. Большинство IMV высвобождаются из фагоцитирующей клетки после ее лизиса. Некоторые из них могут транспортироваться через клеточную мембрану хозяина до лизиса клетки. После чего они остаются присоединенными к ее наружной поверхности или отделяются от нее уже как внеклеточный обо-

лочный вирус (extracellular enveloped virus, EEV). Главную роль в передаче вируса от одного хозяина к другому играет его IMV-форма. L1 представляет собой миристиолированный оболоченный белок (myristoylated envelope protein), состоящий из 250 аминокислотных остатков. Он экспрессируется на поверхности IMV-формы вируса. Его С-гидрофобный сегмент погружен в вирусную мембрану, но консервативная часть L1, включающая 185 аминокислотных остатков, локализуется в цитоплазме клетки-хозяина. В области N-конца белка формируется гидрофобная «каверна», необходимая для сборки вириона. После лизиса клетки этот эктодомен экспонируется Т- и В-клеткам иммунной системы, и вызывает сильный ответ с их стороны. Следовательно, ключевая роль белка L1 в морфогенезе вируса предопределяет его консервативность как антигена. Поэтому другого варианта поддержания в популяциях человека, кроме как эстафетной смены хозяина воздушно-капельным путем, у ВНО нет.

Вакцинация обычно предупреждает заражение ВНО в течение, по меньшей мере, 5-10 лет. При развитии болезни ее симптомы у вакцинированных лиц менее выражены, чем у невакцинированных. Так как специфические антитела считаются «первой линией обороны» против вторжения возбудителей инфекционных болезней, их обычно выявляют для оценки иммунной защиты индивидуума. По данным Gallwitz S. et al. (2003), использовавших ферментативный иммуноанализ для поиска антител к вирусу вакцины у лиц, вакцинированных 30-60 лет назад, их можно обнаружить у 65% обследуемых, вакцинированных однократно; и у 80% обследуемых, вакцинированных два раза и более. Crotty S. et al. (2003) продемонстрировали присутствие

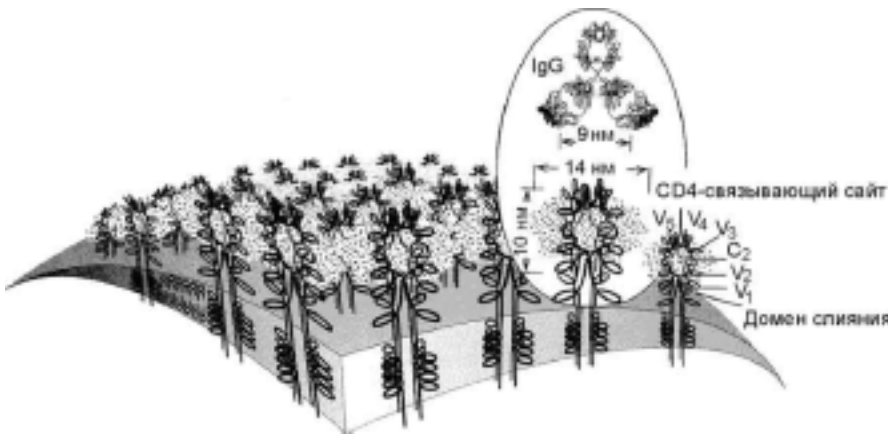


Рис. 8. Топография поверхности вириона ВИЧ-1. Оболочечные гликопротеины (gp120/gp41) изображены как тетрамерные олигомеры. Карбонгидратный комплекс, включающий преимущественно олигоманнозу, изображен в виде «облака» вокруг гликопротеина. Показано антитело (IgG), нейтрализующее ВИЧ. Оно не может взаимодействовать с gp120/gp41, потому что гликопротеин экранирован карбонгидратным комплексом. В то же время сайт связывания с рецептором CD4 Т-лимфоцитов остается открытым (Nara P.L. et al., 1991).

у лиц, вакцинированных более 50 лет назад, В-клеток памяти, специфических к вирусу вакцины. Количество таких клеток после вакцинации снижается течение нескольких лет до уровня, представляющего примерно десятую часть от достигнутого максимума. Далее количество противоопынных антител (0,1% от общего количества IgG+ В-клеток) не меняется практически на протяжении всей оставшейся жизни вакцинированного. Этим объясняется выраженная антителная реакция на противоопынную ревакцинацию. В опытах Frey S.E. et al. (2003) вакцинация ранее вакцинированных лиц давала очень хороший результат даже при десятикратном разведении вакцины. Теперь, когда мы получили представление об антигенных детерминантах ВНО, нам проще будет понять, почему антигенные детерминанты ВИЧ не могут быть использованы для конструирования ВИЧ-вакцин.

Антигенные детерминанты ВИЧ. В-клеточные ответы на ВИЧ-инфекцию, многообразны. У людей, инфицированных ВИЧ, обнаруживают антитела к его структурным (p17, p24, gp41, gp120) и регуляторным белкам (vif, nef, RT), а также аутоантитела. Основным изотипом синтезируемых антител является IgG1 (более подробно см. у J.E. Bovis, K. James, 1992; и у Е.Н. Шуваловой с соавт., 2001). Основной антигенный раздражитель системы Т-и В-иммунитета, это оболочечный шип (spike) ВИЧ. Он состоит из тримера гетеродимеров (trimer of heterodimers), сформированных двумя гликопротеинами, gp120 и gp41. Гликопротеин gp120 представляет собой высокогликозилированный белок, приблизительно половина массы которого составляют карбонгидраты, присоединенные к N-концу молекулы (Poignard P. et al., 2001). Анализ последовательностей различных изолятов ВИЧ позволил установить у gp120 переменные (V1-V5)

и консервативные (C1-C5) регионы (рис. 8).

Гликопротеины имеют рецепторный сайт для CD4-молекулы, определяющей тропизм ВИЧ к CD4 Т-клетки; и второй сайт — связывающий вирус с хемокиновыми корцепторами, обычно с CCR5 и CXCR4. Поверхность кора gp120 закрыта карбонгидратами, а большая часть оставшейся не экранированной молекулы вовлечена во взаимодействие с gp41 или с другими единицами gp120 в трехмерном шипообразном выступе оболочки. Относительно консервативный сайт связывания с CD4 «заглублен» и малодоступен для антител. Консервативный корцепторный сайт является наиболее недоступным для антител даже на мономерном gp120. Роль gp120 в инфекционном процессе в основном заключается в связывании вируса с клетками-мишенями и обеспечении ему тесного соприкосновения с мембранами таких клеток. Трансмембранный белок gp41 играет ключевую роль на этой стадии взаимодействия вируса и клетки, так как он вызывает слияние вируса с мембраной клетки-мишени и доставляет генетический материал в ядро клетки. Этот белок относительно консервативен, но большая часть его поверхности скрыта от антител, распознающих шипообразные выступы оболочки (Zwick M.B. et al., 2004).

Переменные последовательности оболочки ВИЧ концентрируются в оболочечных петлях (V1 — V4), которые и являются главными целями для нейтрализующих антителных ответов иммунной системы человека. В оболочку ВИЧ входят также несколько белков человека. Но их роль как антигенов, незначительна.

Антитела с широким нейтрализующим действием. Здесь я сразу поясню, что в специальной литературе под ВИЧ-нейтрализую-

щими антителами обычно понимаются те, которые нейтрализуют вирус в условиях *in vitro*. В условиях *in vivo* их действие очень сложно опосредовано, так как функция связывания с антигеном у антител не единственная. Более древней у них является эффекторная функция, т. е. способность передавать сигналы между клетками, взаимодействуя со специфическими рецепторами на их поверхности (например, известны антитела-агонисты рецепторов DR4 или DR5, вызывающие апоптоз раковых клеток; см. С. Odoux et al., 2002). К эффекторным функциям относится и способность антител, связываясь с антигеном активировать каскад протеолитических реакций, осуществляемых системой комплемента (более подробно об эффекторных функциях антител см. в работе А. Ройта с соавт., 2000). К этим аспектам проблемы я вернусь ниже, а пока нам надо условиться о том, что в «чистом виде» феномен нейтрализации антителами ВИЧ или любого другого микроорганизма встречается только в эксперименте в условиях *in vitro*, т.е. «в пробирке».

Длительные исследования В-клеточных ответов на ВИЧ показали, что у людей появляются антитела, нейтрализующие доминирующий вариант вируса, но как только их уровень достигает определенного порога, селекционируется вариант вируса, способный избежать их нейтрализующее действие (Burton D.R. et al., 2005). Скорость появления как ВИЧ-нейтрализующих антител, так и избегающих их вирусов, сильно варьируют у разных лиц, однако сам цикл многократно повторяется на протяжении жизни ВИЧ-инфицированного и больного СПИДом человека (Frost S. et al., 2005).

Антитела, способные распознавать сразу несколько штаммов ВИЧ (антитела с широким нейтрализующим действием), появляются медленно и только у отдельных индивидуумов. Но так как их рассматривают уже в течение двух десятилетий в качестве средства для лечения и профилактики ВИЧ-инфекции, то локализация эпитопов на оболочке ВИЧ, вызывающих такие ответы, хорошо изучена (рис. 9).

Эпитоп для МАТ b12. Моноклональное антитело (МАТ) b12 распознает CD4-связывающий сайт на поверхности вируса. Хотя такие МАТ способны распознавать мономерный gp120, они его «не находят» на поверхности вируса, где он организован в тример.

Эпитоп для МАТ CD4i. Антитело распознает корцепторный связывающий сайт на gp120. Этот рецептор предназначен для интеграции ВИЧ с корцепторами хемокинов CCR5 и CXCR4. Fab-фрагмент такого антитела, изолированный из фаговой библиотеки, по-

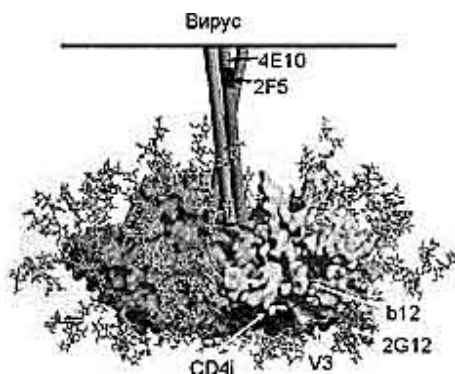


Рис. 9. Локализация на оболочечных гликопротеинах ВИЧ/SIV эпитопов для антител с «широким нейтрализующим действием». Модель шипа оболочки вируса основана на структуре gp120 с тремя мономерами гликопротеина; gp41 показан на схеме в виде ножки из трех трубочек (Burton D.R. et al., 2005).

казал нейтрализующую активность (в условиях *in vitro*, естественно) против нескольких первично выделенных штаммов ВИЧ-1. Однако интактные антитела (IgG) не оказывают такое действие на ВИЧ.

Гликаны на «безмолвной» поверхности gp120. Исследования структуры кора gp120 показали локализацию N-гликанов на одной поверхности белка (Wyatt R. et al., 1998). Плотность карбонгидратного щита такова, что он защищает вирус от взаимодействия с антителами. Такая структура на поверхности gp120 была названа «безмолвной поверхностью» (*silent face*), что означает ее невосприятие системой Т- и В-иммунитета. Однако недавно было показано, что mAT2G12 с высокой афинностью все же распознает этот пептидогликан (Scanlan C.N. et al., 2002). Был обнаружен ранее не охарактеризованный тип антитела, в котором два Fab-фрагмента IgG собраны в сцепленный VH-димерный домен. Экстраординарная конфигурация этого антитела обеспечивает обширное пространственное соответствие двух классических связывающих сайтов (VL-VH) и одного ранее неохарактеризованного димерного межповерхностного региона (VH-VH) для мультивалентного взаимодействия с консервативным кластером олигоманнозы на gp120. Следовательно, хотя индивидуальные олигоманнозные цепи являются однородными, кластер олигоманнозы может рассматриваться как неоднородный. В настоящее время неизвестно, как часто возникают антитела такого типа у ВИЧ-инфицированных людей. По мнению D.R. Burton et al. (2005), это происходит весьма редко.

Мембрано-проксимальный внешний регион gp41 (membrane-proximal external region of gp41; MPER gp41). Большая часть поверхности gp41 скрыта от антител, за исключением региона, непосредственно прилегающего к вирусной мембране — MPER (Zwick M. B. et al., 2002). Уже описаны два типа человеческих mAT — 2F5 и 4E10, распознающие эпитопы в этой области. Однако все попытки показать протективный эффект антител к пептидам, соответствующим этим эпитопам, ока-

зались неудачными. Эти результаты предполагают, что антитела вовлекаются в распознавание последовательностей пептидов gp41 в специальном контексте, таком как их близость к вирусной мембране. MPER богаты триптофаном, благодаря которому может возникать конформационное взаимодействие этого региона gp41 с вирусной мембраной.

Эпитопы петли V3 gp120. V3-петля gp120 у разных изолятов ВИЧ варьирует по аминокислотным последовательностям. Однако корона петли имеет относительно консервативный мотив GPGR или GPGQ, играющий важную роль при связывании вируса с корецептором (Hartley O. et al., 2005). До 90% нейтрализующих антител к ВИЧ, циркулирующих в крови ВИЧ-инфицированного человека, специфичны к V3 (Profy A. T. et al., 1990). Этот эпитоп является единственным у ВИЧ, для которого показано доминирующее участие в развитии гуморального иммунного ответа как при естественной и при искусственной инфекции, так и после введения экспериментальному животному ВИЧ-вакцины на основе оболочечных белков вируса. Следовательно, его, как и белок L1 для ВНО, можно считать основной антигенной детерминантой для ВИЧ. Ниже мы остановимся на антигенных свойствах V3-домена gp120 более подробно.

Хотя он расположен в гипервариабельном регионе gp120 (т. е. с частыми аминокислотными заменами в первичной структуре этого участка молекулы), аминокислотный анализ V3-домена сотен изолятов ВИЧ продемонстрировал его консервативность (LaRosa G. J. et al., 1990; Wolf T. F. et al., 1990). Домен играет основную роль в процессе проникновения ВИЧ в клетку. Корецепторы CCR5 и CXCR4 посредством V3-домена gp120 катализируют слияние вируса с мембраной клетки-мишени (Berger E.A. et al., 1999). Этим механизмом поддерживается его «консервативность». Но с иммунологической точки зрения V3-домен оказался более сложным явлением, чем простой линейный эпитоп, как по началу полагали разработчики ВИЧ-вакцин. Изучение мутантов ВИЧ, избегающих нейтрализации ан-

тителами (*neutralization escape mutants*, NEN) в условиях *in vitro*, показало большое количество замен аминокислот молекулы gp120 как впереди, так и позади V3 (Wei X. et al., 2003). Исследование серийных изолятов ВИЧ-1 у людей и экспериментально инфицированных шимпанзе позволило выявить любопытную закономерность. Ранние NEN ВИЧ появлялись *de novo* у шимпанзе перед сероконверсией! Исследования возможности нейтрализации вируса сывороткой, полученной в это же время, обнаружили низкий титр нейтрализующих антител в отношении штамма ВИЧ, использованного для инфицирования шимпанзе. Полный сиквенинг-анализ gp120 у 8-, 16- и 32-недельных изолятов ВИЧ выявил множественные аминокислотные замены в доменах C IV и V4, и, что оказалось сюрпризом для исследователей, полную консервацию V3. NEN, выделенные от шимпанзе, оказались в 8-32 раза более резистентными к V3-штаммоспецифическим mAT и к V3-штаммоспецифической поликлональной сыворотке, чем исходный штамм вируса (Nara P. et al., 1991). Такие же результаты были получены при острой сероконверсии у людей (Albert J. et al., 1990).

P. Nara et al. (1990, 1991) предложили шарнирно-сгибающую модель V3-домена, объясняющую данные по дистанционной конформационной нестабильности V3-домена применительно к NEN, полученных от шимпанзе. R.A. McCaffrey et al. (2004) представили в виде схемы расположение у молекулы gp120 консервативных регионов (CI-C5) и вариабельных петель (V1-V5) (рис. 10).

Подобный феномен нейтрализационной резистентности ранее был описан для близкородственных ВИЧ ретровирусов — вируса кошачьей лейкемии (Nicolaisen-Strouss K. et al., 1987); и вируса висны, поражающего ЦНС овец (Stanley J.S., 1987).

Позже было установлено, что конформационные эпитопы gp120 нарушаются и в результате изменений в первичной структуре gp41. Однако у таких мутантов ВИЧ оставались прежними способность связываться с рецепторами-мишенями и инфекционность (см. в работе V. Kalia et al., 2005). Антигенные вариации функционально нейтрализуемых эпитопов могут изменять клеточный тропизм ВИЧ; его антигенные свойства и вирулентность. P. Nara et al. (1991) считают, что данный механизм лежит в основе способности ВИЧ приобретать тропность то к макрофагам, то к В- и Т-клеткам. Макрофаготропные варианты ВИЧ (M-tropic или R5) предпочтительно нацеливаются на CC-хемокиновый корецептор 5 (CCR5)-экспрессирующих клеток. Т-тропные варианты ВИЧ (T-tropic или X4) используют

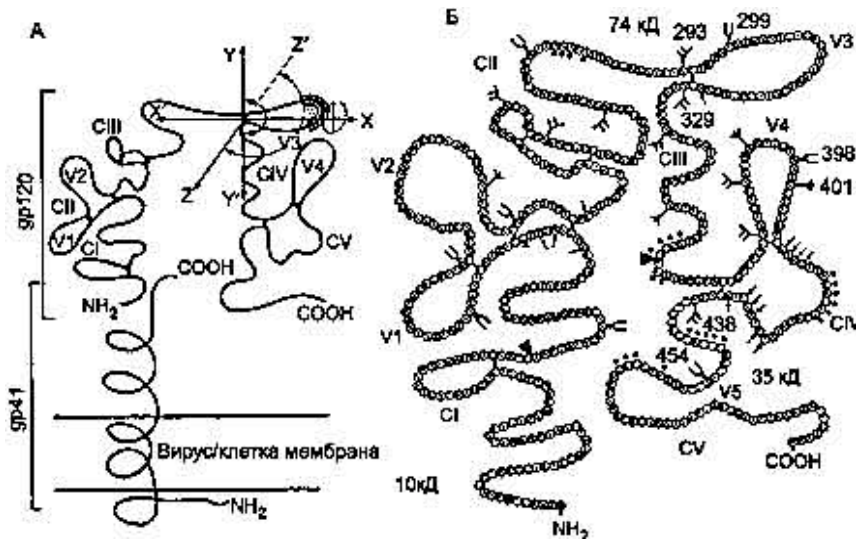


Рис. 10. V3-домен gp120 ВИЧ. Содержит эпитопы для штаммоспецифических нейтрализующих антител и определяет клеточный тропизм вируса.

- Трехосевая модель вращения и белкового фолдинга V3-домена, уменьшающих валентность его взаимодействия со специфическим антителом. V3-связывающий сайт показан штриховкой (Nara P. et al., 1991).
- Схематическое расположение у молекулы gp120 консервативных регионов (C1-C5) и варибельных петель (V1-V5) на примере последовательности штамма ВИЧ SF162. Показаны позиции и типы потенциальных N-связанных сайтов гликозилирования (символы снаружи цепи), треугольниками обозначены участки, по которым ледяная уксусная кислота (glacial acetic acid) расщепляет gp120 на три фрагмента (10, 35 и 74 kDa); стрелками снаружи V3-петли показаны аминокислоты, вовлеченные в корцепторное связывание, а звездочками обозначены аминокислоты, участвующие в связывании с CD4; кД - килодальтон (McCaffrey R.A. et al., 2004).

для проникновения в клетку СХС-хемокиновый корцептор 4 (CXCR4). Бывают варианты вируса с двойной тропностью (dual-tropic isolates). Х4-варианты ВИЧ начинают преобладать над М-тропными вариантами в конце асимптоматического ВИЧ-инфекции (Nankar R. et al., 1999). Этот процесс не случаен. Наиболее опасны такие варианты вируса для Т-клеток. Элиминация Т-тропными ВИЧ Т-клеток-хелперов облегчает существование ВИЧ-инфицированных макрофагов, и, соответственно, самого ВИЧ, так как Т-клетки-хелперы выступают в роли организаторов многосторонних процессов, направленных на уничтожение инфицированных макрофагов.

Феномен первичного антигенного греха (original antigenic sin, OAS) при ВИЧ-инфекции. Суть феномена в следующем. В большинстве случаев антиген представляет собой несколько эпитопов и поэтому он индуцирует синтез химически гетерогенных антител, различающихся своей специфичностью. Однако если клональность антигена ограничена, в его селекцию могут вмешиваться факторы хозяина. Отдельные карбонгидратные антигены, антигены со структурной и функциональной гомологией, индуцируют мало отличающиеся иммунные ответы (Briles D. E., Davie J. M., 1980). Но иммунная система позвоночного организма, иммунизированного одной такой антигенной детерминантой (первой) и позже экспонированная к другому антигену (второму), имеющему структурное сходство с первой детерминантой, отвечает не на вторую, а на первую. Этот феномен и называется «первичным антигенным грехом» (OAS).

Феномен OAS впервые описан на примере иммунных ответов у людей на вируса гриппа (Francis T., 1953) и различных представителей тога-, парамикс- и энтеровирусов (Fenner F. et al., 1974). При ВИЧ-инфекции он

обнаружен P. Nara et al. (1991). Перечень иммунологических и физико-химических характеристик патогенов и их антигенных детерминант, способных вызывать OAS-подобный феномен, обнаруженных и предполагаемых для gp120 ВИЧ, приведен в табл. 1.

P. Nara et al. (1991) «вышли» на феномен OAS при ВИЧ-инфекции, случайно. Первоначальной целью их экспериментов было расширение иммунного ответа на ВИЧ-вакцину на основе gp120 таким образом, чтобы нейтрализации антителами подвергались вирусы различного географического происхождения. Введя экспериментальным животным gp120, полученный из штамма ВИЧ-1 IIIB, они исследовали кинетику, напряженность и продолжительность штаммо-специфического иммунного ответа. Через 175 суток они начали вторую серию опытов по иммунизации животных gp120 штамма ВИЧ-1 RF, имеющего другое географическое происхождение. После примирившей иммунизации (7 – 14 суток) исследователи неожиданно для себя, так как они основывались «на представлениях о штаммоспецифическом гуморальном ответе на ВИЧ», обнаружили рост титров антител к gp120 штамма IIIB. Про-

веденный этими авторами ретроспективный анализ научной литературы показал, что феномен OAS уже был описан для других ретровирусных инфекций, в частности, вызываемых вирусом висны у овец (Narayan O. et al., 1978) и вирусом инфекционной анемии у лошадей (Kono Y. et al., 1971). На основе собственных данных и данных, накопленных в научной литературе, они предложили следующую модель

Таблица 1 Иммунологические и физико-химические характеристики патогенов и иммуногенных детерминант, способных вызывать OAS-подобный феномен, обнаруженные для gp120 ВИЧ*

Характеристики	gp120 ВИЧ
Ограниченность антигенных эпитопов	Да
Большое количество карбонгидратов, экранирующих эпитопы; и/или ограниченные иммунодоминантные эпитопы	Да
Перекрестно-реактивные детерминанты у семейств малосвязанных патогенов	Да
Излишняя и олигомерная презентация эпитопов иммунной системе	Да
Незначительные различия в аминокислотных последовательностях или в форме антигена и гомологичных белков хозяина (генетическая рестрикция)	Да
Анамнестический ответ, наступающий вслед за введением гетерологичного антигена	Да
Рекуррентная инфекция или бустинг вирусами или антигенами, увеличивающие гуморальный иммунный ответ к первоначальному инфекционному агенту или антигену	Да
Пул длительно живущих клеток В-памяти	Да
Олигоклональный сывороточный профиль	Да
Преобладание клонально-производных В-клеток и популяций антител, специфичных для эпитопа	?

* По P. Nara et al. (1991).

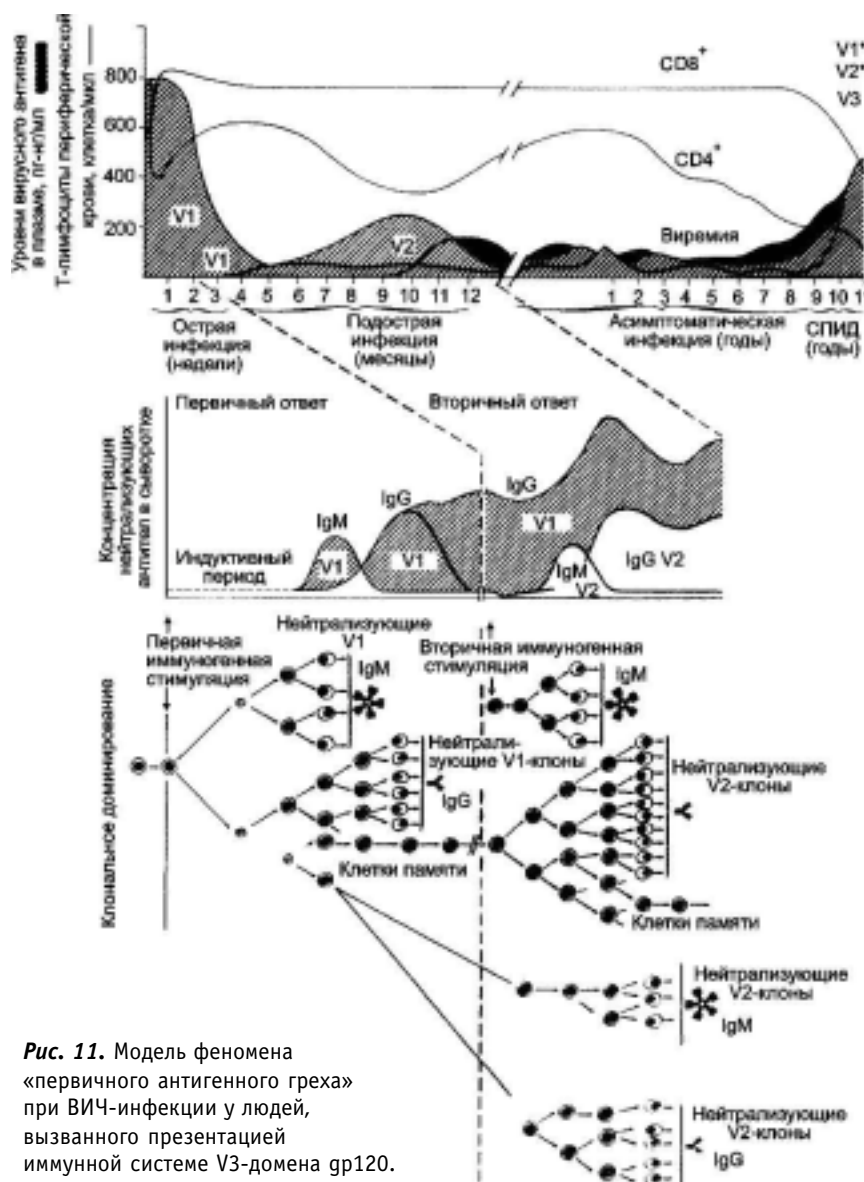


Рис. 11. Модель феномена «первичного антигенного греха» при ВИЧ-инфекции у людей, вызванного презентацией иммунной системе V3-домена gp120. Заштрихованная область, обозначенная как V1 (не путать с названием антигенного домена), соответствует вирусной нагрузке, образовавшейся в результате первичной клональной экспансии инфицирующего вирусного генома. Тесно связанные с ним варианты, способные избегать нейтрализующие антитела, обозначены как V2. Индукция последующих антительных ответов показана на нижних двух панелях. Нейтрализующие антитела появляются вследствие индукции V3-специфических клонов В-клеток, которые продолжают экспансию из-за перекрестной реактивности близкими вариантами вируса, т.е. V2 (Nara P. et al., 1991).

OAS-феномена при ВИЧ-инфекции у людей (рис. 11).

Эта модель объясняет крайнюю неэффективность гуморального иммунного ответа на ВИЧ, если, конечно, понимать термин «иммунный» буквально, как «защищенный от всех антигенно чужеродных веществ» (см., например, учебник В.Г. Галактионова, 2005).

P. Nara et al. (1991) получили любопытные данные по развитию ВИЧ-инфекции и гуморальных иммунных ответов у шимпанзе, уже иммунизированных вакциной на основе gp120 IIIB (рис. 12).

Они показывают следующее: во-первых, у иммунизированных животных ВИЧ-инфекция все же развивается, но иммунная реакция на ВИЧ у них наступает быстрее и развивается более интенсивно; во-вторых, иммунная реакция на введение 6- и 16-недельных штаммов ВИЧ, имитирующих изменчивость вируса во время инфекционного процесса, развивается менее интенсивно, чем в контроле. При этом проявляется феномен OAS по отношению к штамму ВИЧ, gp120 которого был использован для иммунизации. Следовательно, сходство иммунных ответов на введение ВИЧ-вак-

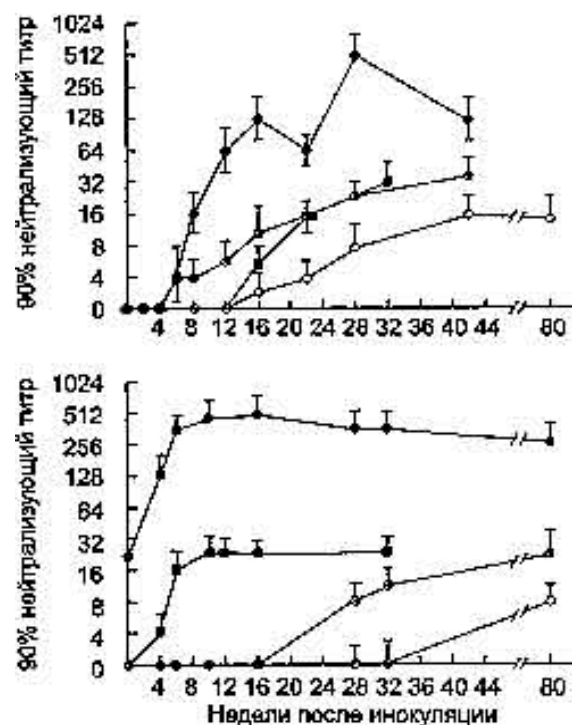


Рис. 12. Влияние gp120 IIIB-иммунизации на последующие ответы системы В-клеточного иммунитета на ВИЧ. Верхняя панель (А) показывает динамику титров нейтрализующих антител на ВИЧ IIIB (круги, закрашенные черным цветом), RF (черные квадраты) и 6- и 16-недельные вирусные изоляты из лимфоцитов этих животных (круги с точкой в центре и круги без точек, соответственно). На нижней панели (Б) показаны иммунные ответы животных, предварительно иммунизированных gp120 IIIB. Символы те же, что и на А (Nara P. et al., 1991).

цины и противоопухолевой вакцины (вирус вакцины) только внешнее — и на ту, и на другую образуются антитела. В деталях эти процессы различаются до такой степени, что становятся антиподами.

Комплемент и ВИЧ. Антитела к ВИЧ синтезируются клонами В-клеток почти до самой смерти больного СПИДом. В-клетки, в отличие от Т-клеток, менее подвержены инфицированию ВИЧ. На первый взгляд их роль в инфекционном процессе пассивная — они всего лишь связывают вирусные частицы на своей поверхности посредством рецептора комплемента CD21 и тем самым играют роль внеклеточного резервуара ВИЧ. Да еще В-клетки синтезируют бесполезные антитела, которые вроде бы должны нейтрализовать ВИЧ, но из-за «коварства» последнего не могут выполнить это свое предназначение. Попробуем понять роль комплемента и антител к ВИЧ в вызванном им инфекционном процессе.

В соответствии с представлениями о роли иммунной системы в защите макроорганизма от патогенных микроорганизмов, сло-

жившихся в начале XX столетия, и до сегодняшнего дня кочующих из учебника в учебник (см., например, Воробьев А.А., 1994), комплемент должен контролировать ВИЧ-инфекцию. Тем более что процесс развивается медленно, не сопровождается симптомами шока (как, например, это происходит при натуральной оспе или чуме). Но, как оказалось, плазма крови человека усиливает инфекционность ВИЧ. По данным S. Wu et al. (1995), в условиях *in vitro* все четыре выделенных ими штамма ВИЧ, инкубированные с плазмой крови неинфицированного ВИЧ человека, увеличивали свою инфекционность от 3 до 30 раз в отношении мононуклеарных клеток и моноцит-производных макрофагов. В более детальных исследованиях C. Pinter et al. (1995) установлено непосредственное связывание С1-домена gp120 ВИЧ (см. рис. 10) с фактором Н комплемента (синтезируется макрофагом) и увеличение формирования синцития CD4-зависимым образом. Далее исследователями показано участие фактора Н (негативный регулятор активности комплемента) и еще какого-то неизвестного фактора крови в защите ВИЧ и инфицированных им клеток от лизиса. Такая функция комплемента при ВИЧ инфекции противоречит тому, что пишут о ней в классических руководствах по иммунологии. Например, А. Ройт с соавт. (2000) относят комплемент к системе врожденного иммунитета, способного распознавать «своих» и «чужих» и вызывать опсонизацию микроорганизмов, активацию фагоцитирующих клеток и лизис клеток мишеней. Это действительно так и происходит, когда система комплемента реагирует на ортопоксвирусы. Оба, классический и альтернативный пути активации комплемента, усиливают нейтрализацию вируса вакцины антителами в условиях *in vitro*; и ускоряют процесс освобождения организма от вируса в условиях *in vivo* (см. обзорную работу R.M.L. Buller, G.J. Palumbo, 1991). Получается, что для системы комплемента человека ВИЧ является «своим», а ВНО «чужим».

Феномен антителозависимого усиления инфекции (antibody-dependent enhancement, ADE) при ВИЧ-инфекции. Антитела — связующее звено приобретенного иммунитета с врожденным, т.е., комплементом (классический путь активации комплемента). Но для ВИЧ-инфекции их «связь» проявляется еще одним феноменом, не афишируемым имитаторами разработки ВИЧ-вакцин. Это так называемый феномен антителозависимого усиления инфекции (ADE). Суть феномена заключается в следующем — вирусспецифические антитела усиливают проникновение вируса в фагоцитирующие клетки и в отдельных случаях его репликацию в этих клетках посредством взаимодействия с рецептором Fc и/или

рецепторами комплемента. Fc-рецептор (FcR) экспрессируется фагоцитирующими клетками для взаимодействия с иммуноглобулином G (Tirado S.M., Yoon K.S., 2003). Поэтому феномен наблюдается в двух формах: а) комплемент-опосредованное антителозависимое усиление инфекции (complement-mediated ADE; C-ADE); и б) независимое от комплемента и связанное с Fc-рецептором усиление инфекции (Fc-receptor-mediated ADE; FcR-ADE). Феномен ADE изучается с 1980-х гг. на примере вирусных инфекций (Porterfield J.S., 1986). Для ВИЧ он показан W.E. Robinson et al. (1988) и J. Homsy et al. (1989).

Наиболее важным эпитопом для развития C-ADE является иммунодоминантный регион gp41. Развитие FcR-ADE происходит благодаря антителам к V3-петле gp120 (Fust G., 1997).

G. Fust (1997) кратко суммировал клиническое значение феномена ADE у ВИЧ-инфицированных людей — это прогрессирование ВИЧ-инфекции; и облегчение переноса вируса от матери к плоду. Иммуной системой человека «подстраховывается» передача ВИЧ от матери к плоду. Его транспорт через синцитиотрофобластный слой плаценты осуществляется с помощью антител к gp120 и gp41 по обоим механизмам осуществления феномена антителозависимого усиления инфекции.

Инфекционно-эволюционные качели при ВИЧ-инфекции. Исследование деталей инфекционного процесса, вызванного ВИЧ, позволяет установить еще один феномен. По данным A. Takeda et al. (1988), в условиях *in vitro* добавление к клеткам моноцитов сыворотки ВИЧ-инфицированных людей в субнейтрализующих концентрациях, значительно усиливает репликацию вируса. Высокие же концентрации такой сыворотки показывают вируснейтрализующую активность. Следовательно, ВИЧ не удается «увильнуть» от специфических антител до того момента, когда под их давлением селекционируется вариант вируса, «избегающий» таких антител. Но в отличие от антител к ВНО, они не блокируют его инфекционность, а усиливают ее. Поэтому у антител к ВИЧ двойная роль в инфекционном процессе — в низких титрах они способствуют повышению инфекционности вируса в отношении фагоцитирующих клеток; в высоких способствуют эволюции вируса. И с каждым новым серовариантом вируса цикл повторяется. Результатом работы такого механизма является распространение ВИЧ по фагоцитирующим клеткам и постепенное доминирование Х4-вариантов ВИЧ, наиболее опасных для Т-клеток (см. «Антигенные детерминанты ВИЧ»).

Итак, сравнение антигенных детерминант ВНО и ВИЧ и иммунных ответов на них, показало следующее:

1. Иммунная система человека воспринимает ВНО и другие ортопоксвирусы как антигенно-чужеродные объекты и элиминирует их из организма. Роль основной антигенной детерминанты у вирусов данного семейства играет консервативный белок L1, участвующий в морфогенезе вирусной частицы. Это крупный миристилированный оболочечный белок, экспрессирующийся на поверхности внутриклеточных созревающих вирионов возбудителя натуральной оспы (IMV-форма вируса). Его консервативная часть формирует гидрофобную «каверну», необходимую для сборки вириона, поэтому он не может подвергаться конформационным изменениям и маскироваться полисахаридными «экранами». После лизиса клетки L1 экспонируется функционально неповрежденным Т- и В-клеткам иммунной системы, и вызывает полноценные гуморальные и клеточные ответы на ВНО.
2. Иммунная система человека не только не воспринимает ВИЧ как антигенно-чужеродный объект, но и способствует его размножению, эволюции и распространению по человеческим популяциям. Причины данного явления видимо кроются в совместной эволюционной истории ретровирусов и многоклеточных организмов, и нуждаются в исследовании. Основные консервативные домены оболочечных белков интактных частиц ВИЧ относятся к структурам, связывающимся с рецепторами и корецепторами на поверхности макрофагов и Т-хелперов. Они либо экранированы карбонгидратными группами, либо «заглублены» и малодоступны для антител. Роль основной антигенной детерминанты у ВИЧ играет консервативный домен V3 гликопротеина gp120, однако антитела к нему усиливают проникновение вируса в фагоцитирующие клетки посредством взаимодействия с рецептором Fc. Благодаря феномену антитело-зависимого усиления инфекции, антитела к V3 и к некоторым другим «антигенам» способствуют прогрессированию ВИЧ-инфекции и переносу вируса от матери к плоду. Иммунизация приматов оболочечными белками ВИЧ сопровождается феноменом «первичного антигенного греха» и не предотвращает развитие ВИЧ-инфекции.

Окончание статьи, глава «Механизм будущих неудач в борьбе с ВИЧ/СПИД-пандемией», будет опубликовано в следующем выпуске журнала.