

МОНИТОРИНГ АКТИВНОСТИ АНТИТЕЛ К СТРУКТУРНЫМ БЕЛКАМ ВИЧ-1 В ОТСУТСТВИЕ ЛЕЧЕНИЯ АНТИРЕТРОВИРУСНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ И НА ФОНЕ ТЕРАПИИ

Рязанова Г.А., Фазулзянова И.М.

Серологическая лаборатория Республиканского центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями МЗ РТ, г. Казань

Резюме. У больных ВИЧ-инфекцией процесс образования антител к отдельным структурным белкам вируса иммунодефицита человека первого типа носит дифференциальный характер, в зависимости от локализации антигена. По мере прогрессирования заболевания увеличивается доля антител к поверхностным гликопротеинам гена *env* и уменьшается процентное содержание к белкам гена *gag*.

Ключевые слова: антигены ВИЧ-1, антитела, Т-лимфоциты.

Ryasanova G.A., Fazulzyanova I.M.

ACTIVITY MONITORING OF ANTIBODIES TO HIV-1 STRUCTURAL PROTEINS IN ABSENCE OF ANTIRETROVIRAL TREATMENT AND IN THE COURSE OF THERAPY

Abstract. In HIV-infected patients, the process of antibody production to certain HIV-1 structural proteins proceeds in differential manner, depending on the antigen localization. Upon progression of the disease, an increased ratio of antibodies to *env* surface glycoproteins is found, along with decreased percentage of antibodies to *gag* gene proteins. (*Med. Immunol.*, 2007, vol. 9, N 4-5, pp 531-534)

При болезнях с длительным инкубационным периодом и разнообразной клинической симптоматикой, одной из которой является ВИЧ-инфекция, исключительно велика роль лабораторных методов диагностики. Для выявления антител к ВИЧ чаще всего используют метод иммуноферментного анализа. Антитела к вирусным белкам в иммуноферментном анализе можно выявить у 99% инфицированных ВИЧ людей. Сложности ранней диагностики связаны с тем, что специфические антитела отсутствуют в первый месяц после заражения, а в терминальной стадии заболевания их количество заметно уменьшается. В связи с этим исследование динамики образования антител к структурным белкам вируса в сыворотках крови ВИЧ-инфицированных в период формирования гуморального иммунного ответа

на внедрение ВИЧ-1 важно не только для изучения иммунопатогенеза ВИЧ-инфекции, но и для ранней диагностики заболевания.

Целью исследования было определение динамики образования «свободных» антител к вирусным белкам генов *gag*, *env*, *pol* у больных ВИЧ-инфекцией.

В работе были использованы образцы сывороток крови ВИЧ-инфицированных, проходивших плановые медицинские осмотры в Республиканском центре по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями МЗ РТ.

Методами ИФА («ВИЧ-1, ВИЧ-2-ИФА-Авиценна» фирмы «Авиценна») и иммунного блоттинга фирмы «Bio-Rad» (Франция) был проведен длительный мониторинг относительной серологической активности антител к структурным белкам вируса первого типа в сыворотках крови двух больных ВИЧ-инфекцией. Молекулярные массы вирусных белков ВИЧ-1 даны в соответствии с инструкцией прилагаемой к набору для проведения иммуноблоттинга «NEW LAV BLOT 1».

Адрес для переписки:

420097, г. Казань, ул. Вишневского, 2а.

Тел.: (843) 238-79-04.

Факс: (843) 238-70-70.

E-mail: ospz@yandex.ru

Денситометрию результатов постановки иммунного блоттинга проводили в отраженном свете на сканере «SHARP JX-330». В анализе денситограмм (количественный анализ сероактивных фракций) была использована программа «Image Master 1D Prime» фирмы «Pharmacia Biotech».

Количество Т-лимфоцитов, несущих маркеры CD4⁺ и CD8⁺, определяли методом прямой иммунофлюоресценции на проточном лазерном цитофлюориметре фирмы «Becton Dickinson» в программе «Multi TEST».

У больного в отсутствие лечения антиретровирусными препаратами на стадии персистирующей генерализованной лимфоаденопатии (ПВ) и до возникновения вторичных клинических проявлений ВИЧ-инфекции на стадии ПВ – токсоплазмоз, кандидоз языка и пневмоцистная пневмония (по классификации Покровского В.И., 1989 г.), наблюдалось выраженное снижение количества Т-лимфоцитов, несущих маркеры CD4⁺, CD8⁺. При этом отмечались изменения в процентном соотношении активности анти-ВИЧ антител к структурным белкам вируса в иммуноблоттинге. Из данных таблицы 1 следует, что в начале мониторинга (стадия ПВ) при концентрации Т-лимфоцитов с фенотипами CD4⁺, CD8⁺, равной 499 кл/мкл и 615 кл/мкл, преобладали антитела к белкам гена *gag* (53,9%), а относительная серологическая активность антител к белкам генов *env*, *pol* составляла 32,8% и 13,3%. По мере нарастания инфекционного процесса и перехода больного ВИЧ-инфекцией в стадию ПИА количество Т-лимфоцитов, несущих маркеры CD4⁺, CD8⁺, изменилось и составило 260 кл/мкл и 1137 кл/мкл соответственно. В это время мы наблюдали увеличение относительной доли присутствия антител к белкам гена *env* за счет повышения относительной серологической активности антител к вирусным гликопротеинам gp160 и gp41 в иммуноблоттинге. Процентное содержание антител к белкам гена *pol* тоже несколько повысилось (до 15,5%), а интенсивность реакции антител к белкам гена *gag* незначительно снизилась и составила 44,3% в иммуноблоттинге. Далее на фоне снижения абсолютного количества Т-лимфоцитов, несущих маркеры CD4⁺, CD8⁺ до 73 кл/мкл и 346 кл/мкл, мы наблюдали уменьшение относительной доли присутствия антител к белкам генов *gag* и *pol* и дальнейшее увеличение относительной серологической активности антител к белкам гена *env*. Из данных таблицы 1 следует, что активно протекающее снижение концентрации популяции Т-лимфоцитов, несущих маркеры CD4⁺ и CD8⁺, сопровождалось относительным увеличением интенсивности реакции анти-ВИЧ антител к поверхностным гликопротеинам и белкам-предшественникам гликопротеинов гена *env* до 73,7%

и уменьшением уровня реакции антител как с белками гена *gag*, так и с вирусными ферментами гена *pol*, так как продукция этих антител возможна после виролиза и/или цитолиза инфицированных ВИЧ-1 клеток [1, 3, 4].

Кроме того, у больного ВИЧ-инфекцией в отсутствие лечения антиретровирусными препаратами динамика заболевания сопровождалась снижением в иммуноферментном анализе суммарного титра анти-ВИЧ антител к вирусным белкам, кодируемым генами *env*, *gag* и *pol* от 1:32 000 до 1:16 000.

В таблице 2 представлены результаты исследования спектра антител к структурным белкам вируса иммунодефицита человека первого типа в иммунном блоттинге у больного ВИЧ-инфекцией, которому в 1995 году была назначена монотерапия тимазидом, а позднее, с 1998 года, – комбинированная антиретровирусная терапия нуклеозидными ингибиторами обратной транскриптазы и ингибиторами протеазы ВИЧ. Длительное диспансерное наблюдение велось на протяжении восьми лет, от момента постановки стадии ПИА, в период вторичных заболеваний, до стадии ПИВ [2]. В это время на фоне выраженного иммунодефицита – снижение количества Т-лимфоцитов, несущих маркеры CD4⁺, до критического уровня – отмечались рецидивирующие вирусные инфекции, грибковые заболевания, активный хронический гепатит смешанной этиологии, а с 2001 у больного ВИЧ-инфекцией был выявлен инфильтративный туберкулез левого легкого.

По результатам наших исследований был выявлен следующий алгоритм динамики анти-ВИЧ антител. В течение всего периода исследования относительной серологической активности анти-ВИЧ антител в иммунном блоттинге мы наблюдали присутствие антител к gp160, gp120, gp41, p25 и p34, а активность к p55, p18, p40, p68, p52 была транзиторной. Динамика инфекционного процесса сопровождалась изменением титра анти-ВИЧ антител в ИФА, если в начале наблюдения титры антител в ИФА составляли 1:20 000, в 2001 году – 1:73 718, то к концу исследования, в 2003 году, суммарная активность антител в ИФА снизилась до 1:32 768.

В период проведения монотерапии тимазидом абсолютное количество Т-лимфоцитов с фенотипом CD4⁺ изменялось в диапазоне от 105 кл/мкл до 218 кл/мкл, а абсолютные значения Т-лимфоцитов CD8⁺ колебались в пределах от 745 кл/мкл до 1786 кл/мкл. В это время основной серодоминантной фракцией общего пула антител к белкам гена *env* являлись антитела к белку-предшественнику гликопротеинов – gp160 (от 36,2 до 42,6%), по сравнению с относительной серо-

ТАБЛИЦА 1. ОТНОСИТЕЛЬНАЯ СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ АНТИ-ВИЧ АНТИТЕЛ В СЫВОРОТКАХ КРОВИ БОЛЬНОГО ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ, НЕ ПРИНИМАВШЕГО АНТИРЕТОВИРУСНЫЕ ПРЕПАРАТЫ

Сроки исследования	Стадии заболевания	CD4* в мкл	CD8* в мкл	Активность анти-ВИЧ антител к белкам генов env, gag, pol ВИЧ-1 в иммуноблоттинге (%)*												
				env			gag			pol						
				gp160	gp120	gp41	Σ	p55	p18	p25	p40	Σ	p68	p52	p34	Σ
а) ноябрь 1993	IIВ	499	615	14,7	13,5	4,6	32,8	8,1	13,2	24,8	7,8	53,9	4,6	3,0	5,7	13,3
б) июнь 1995	IIIА	260	1 137	24,0	11,3	4,9	40,2	4,4	1,9	30,5	7,5	44,3	3,7	3,7	8,1	15,5
в) март 1996	IIIА	160	656	30,1	16,3	6,2	52,6	4,4	1,7	17,2	2,3	25,6	6,2	6,5	9,1	21,8
г) октябрь 1996	IIIБ	100	579	20,4	21,1	8,6	50,1	9,2	2,7	14,3	5,8	32,0	5,4	4,9	7,6	17,9
е) июнь 1997	IIIВ	73	346	40,5	26,6	6,6	73,7	6,4	0,0	11,8	2,5	20,7	2,1	0,0	3,5	5,6

Примечание: * – в % к общему числу сероактивных фракций антител в иммуноблоттинге.

ТАБЛИЦА 2. МОНИТОРИНГ ОТНОСИТЕЛЬНОЙ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АНТИ-ВИЧ АНТИТЕЛ В СЫВОРОТКАХ КРОВИ БОЛЬНОГО ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ, ПРИНИМАВШЕГО АНТИРЕТОВИРУСНЫЕ ПРЕПАРАТЫ

Сроки исследования	Стадии заболевания	CD4* в мкл	CD8* в мкл	Активность анти-ВИЧ антител к белкам генов env, gag, pol ВИЧ-1 в иммуноблоттинге (%)*												
				env			gag			pol						
				gp160	gp120	gp41	Σ	p55	p18	p25	p40	Σ	p68	p52	p34	Σ
а) апрель 1996	IIIА	109	1 738	41,7	18,4	5,2	65,3	1,6	0,0	20,4	0,0	22,0	1,9	1,5	9,4	12,7
б) сентябрь 1997	IIIА	218	1 786	36,2	32,8	5,7	74,7	2,1	0,0	11,3	1,8	15,2	0,0	0,0	10,1	10,1
в) ноябрь 1997	IIIБ	105	745	42,6	25,9	12,7	81,2	2,9	0,0	8,8	0,0	11,7	3,3	0,0	3,8	7,1
г) июль 1998	IIIБ	128	1 246	26,0	13,9	24,6	64,5	4,9	0,0	13,9	0,0	18,8	6,2	0,0	10,5	16,7
д) ноябрь 1998	IIIБ	43	791	48,9	13,7	16,6	79,2	0,0	0,0	16,3	0,0	16,3	0,0	0,0	4,5	4,5
е) март 1999	IIIБ	110	1 197	31,2	15,1	12,1	58,4	0,0	0,0	18,3	0,0	18,3	7,2	7,9	8,2	23,3
ж) июнь 1999	IIIБ	60	396	28,0	8,8	10,7	47,5	8,6	0,0	17,7	3,5	29,8	6,0	6,4	10,3	22,7
з) март 2000	IIIБ	127	853	17,5	8,3	8,0	33,8	10,5	1,9	17,8	5,8	36,0	10,3	6,4	13,5	30,2
и) октябрь 2001	IIIБ	87	590	29,9	30,2	6,6	66,7	2,8	0,2	11,8	0,5	15,3	6,7	3,6	7,8	18,1
к) июнь 2002	IIIВ	112	970	40,4	30,9	3,4	74,7	2,2	0,0	6,5	0,1	8,8	7,2	2,2	7,1	16,5
л) ноябрь 2002	IIIВ	158	1 093	48,5	28,3	0,7	77,5	0,6	0,0	9,5	0,0	10,1	6,7	1,4	4,3	12,4
м) июль 2003	IIIВ	228	1 687	27,9	11,8	21,3	61,0	5,6	8,6	9,4	0,0	23,6	5,8	2,6	7,0	15,4
н) декабрь 2003	IIIВ	106	815	41,3	8,6	18,7	68,6	2,1	5,9	11,2	0,0	19,2	5,9	1,7	4,6	12,2

Примечание: * – в % к общему числу сероактивных фракций антител в иммуноблоттинге.

логической активностью антител к белкам gp120 (от 18,4 до 32,8%) и gp41 (от 5,2 до 12,7%). Среди антител к белкам гена *gag* преобладали антитела к основному ядерному белку – p25 (от 8,8 до 20,4%), а в общем пуле анти-ВИЧ антител к белкам гена *pol* доминировали антитела к вирусной эндонуклеазе – p34 (от 3,8 до 10,1%). Отмеченная тенденция перераспределения относительной серологической активности анти-ВИЧ в иммуноблоттинге сохранялась на всем протяжении монотерапии тимазидом. С 1998 года по 2000 год больному была назначена комбинированная антиретровирусная терапия нуклеозидными ингибиторами обратной транскриптазы и ингибиторами протеазы ВИЧ. Абсолютное количество Т-лимфоцитов, несущих рецепторы CD4⁺, CD8⁺, не превышало значений 128 кл/мкл и 1246 кл/мкл соответственно. В этот период процентное соотношение антител к gp160, gp120, gp41 в иммуноблоттинге изменилось. Антитела к белку-предшественнику гликопротеинов продолжали оставаться доминирующими в общем пуле антител гена *env*, но серологическая активность антител к gp41 увеличилась и в большинстве случаев превысила относительный уровень содержания антител к gp120. В период с 1998 года по 2000 год антитела к основному ядерному белку продолжали оставаться доминирующими в общем пуле антител к белкам гена *gag*, а среди антител к белкам гена *pol* преобладали антитела к p34. С 2001 по 2002 год схема антиретровирусной терапии изменилась, были назначены комбивир, состоящий из нуклеозидных аналогов ингибиторов обратной транскриптазы, и ингибиторы вирусной протеазы. В этот период при достаточно низком уровне Т-лимфоцитов с фенотипом CD4⁺ (менее 200 кл/мкл) относительная серологическая активность антител к трансмембранному гликопротеину – gp41 вновь снизилась и к концу наблюдения составила 0,7%, в то время как активность антител к gp120 увеличилась до 28,3%. Относительная серологическая активность антител к p25 оставалась доминирующей среди антител к белкам гена *gag* и изменялась в диапазоне от 6,5 до 11,2%, тогда как среди антител к белкам гена *pol* преобладали антитела к p68, p34. В 2003 году, когда помимо комбивира больному был назначен зиаген (ингибитор обратной транскриптазы, нуклеозидный аналог тимидина), уровень Т-лимфоцитов CD4⁺ несколько повысился и в июле 2003 года составил 228 кл/мкл. В общем пуле анти-ВИЧ антител к белкам гена *env* доминировали антитела к gp160, а активность антител к трансмембранному гликопротеину вновь увеличилась с 0,7 до 21,3% и к концу исследования составила 18,7%. Среди

антител к белкам гена *gag* продолжали доминировать антитела к ядерному белку – p25 (от 9,4 до 11,2%). В общем пуле анти-ВИЧ антител к белкам гена *pol* преобладали антитела к вирусной эндонуклеазе и обратной транскриптазе.

Таким образом, на основании результатов, полученных во время длительного исследования относительной серологической активности «свободных» антител к белкам генов *env*, *gag* и *pol* у больных ВИЧ-инфекцией, мы сделали заключение о дифференциальной регуляции гуморального иммунного ответа к отдельным структурным антигенам вируса иммунодефицита человека первого типа. Поскольку, согласно литературным данным, поверхностные гликопротеины вируса могут активировать В-лимфоциты без участия Т-лимфоцитов, так называемые Т-независимые антигены, и, следовательно, вирус самостоятельно способен поддерживать продукцию антител к белкам гена *env*. Тогда как для вирусных белков, которые имеют внутреннюю локализацию, необходим полноценный процессинг и презентация антигена в составе молекул МНС I и II класса антигенпрезентирующими клетками Т-хелперам, а те в свою очередь активируют В-лимфоциты, которые делятся и дифференцируются в антителообразующие клетки, продуцирующие высокоаффинные антитела класса IgG. Следовательно, снижение активности антител к белкам генов *gag* и *pol* ВИЧ-1 на поздних стадиях заболевания может являться индикатором прогрессирования заболевания от бессимптомного вирусоносительства в СПИД-ассоциированный комплекс и СПИД.

Список литературы

1. Орлова В.М. Иммунологическая и серологическая характеристика динамики ВИЧ-инфекции у детей: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Краснодар., 1996. – 24 с.
2. Покровский В.В., Ермак Т.Н., Беляева В.В., Юрин О.Г. ВИЧ-инфекция: клиника, диагностика, лечение / Под общ. ред. В.В. Покровского. – М.: ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 2000. – 496 с.
3. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология: Пер. с англ. – М.: Мир, 2000. – 592 с.
4. Binley J.M., Klasse P.J., Cao Y., Jones I., Markowitz M., Ho D.D., Moore J.P. Differential regulation of antibody responses to gag and env proteins of human immunodeficiency virus type // J. Virol. – 1997. – Vol. 71, N 4. – P. 2799-2809.

поступила в редакцию 23.03.2007

принята к печати 27.04.2007