

«СВОБОДНЫЕ» И «СВЯЗАННЫЕ» АНТИТЕЛА К СТРУКТУРНЫМ БЕЛКАМ ВИЧ-1 В РАННИЙ ПЕРИОД ЗАБОЛЕВАНИЯ

Рязанова Г.А., Коксин В.П., Хамзина Р.В.

Республиканский центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями МЗ РТ, Казань, Россия

Резюме. Методами ИФА и иммуноблота был проведен длительный мониторинг активности «свободных» антител к структурным белкам вируса в сыворотках крови больного ВИЧ-инфекцией в период формирования гуморального иммунного ответа. Кроме того, осуществлено сравнительное изучение частоты встречаемости «свободных» антител и «связанных» с белками вируса в сыворотках крови ВИЧ-инфицированных в ранний период заболевания. С помощью метода преципитации в полиэтиленгликоле были получены две фракции циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК1 и ЦИК2). Установлено, что в условиях диссоциации иммунных комплексов при температуре +60°C освобождались антитела, которые взаимодействовали с белками вируса, кодируемыми генами *gag*, *pol* и *env*. Непараметрическим критерием знаков *z* были показаны достоверные различия между частотой встречаемости антител к структурным белкам вируса в сыворотках крови и присутствием этих антител в иммунных комплексах.

Ключевые слова: ВИЧ-1, антитела, иммунные комплексы.

Rjazanova G.A., Kocksin V.P., Khamzina R.V.

«FREE» AND «BOUND» ANTIBODIES AGAINST HIV-1 STRUCTURE PROTEINS AT EARLY STAGE OF THE DISEASE

Abstract. Using ELISA and immunoblotting we have monitored the activity of “free” antibodies against virus structure proteins in the sera of HIV-infected patients at the stage of the developing humoral immune response. Further, a comparative assessment of “free” and “bound” antibodies frequencies in the sera of HIV-infection patients at early stage of the disease has been made. We have obtained two fractions of circulating immune complex (CIC1 and CIC2) using precipitation in polyethylenglycol.

We have determined, that antibodies against virus proteins coded by *gag*, *pol* and *env* genes formed immune complex dissociating under +60°C.

Using non-parametric criterion for *z*-signs. We have shown significant differences between the frequency on antibodies against virus structure proteins in sera and the presence of these antibodies in immune complexes. (*Med. Immunol.*, 2005, vol.7, № 1, pp 73-76)

Введение

Длительный латентный период между инфицированием ВИЧ-1 и развитием СПИДа указывает на то, что гуморальный иммунный ответ на внедрение вируса должен играть важную роль в контролировании инфекции. Однако динамика образования антител к структурным белкам вируса в сыворотках крови ВИЧ-инфицированных в ранний период заболевания до сих пор недостаточно изучена.

В циркулирующих иммунных комплексах, выделенных из сывороток крови больных ВИЧ-инфекцией, обнаруживаются «скрытые» антитела, способные взаимодействовать с любыми вирусными антигенами, но сдерживание инфекции обеспечивают только те антитела, которые специфичны к поверхностным гликопротеинам, экспрессированным на оболочке вирусов – gp120 и gp41 [1, 5]. Однако, в опытах с лабораторными штаммами ВИЧ-1 (ПВ и MN) было показано, что вирусы в составе иммунных комплексов «антиген-антитело» адсорбируются на сети фолликулярных дендритных клеток и в фиксированном состоянии могут не только длительно существовать, но и инфицировать Т-лимфоциты, несущие маркер CD4⁺ [1, 7]. Тем не менее, несмотря на эффект усиления инфекции *in vitro*, противовирус-

Адрес для переписки:

Рязанова Г.А.
420097, Татарстан, г. Казань, ул. Вишневского, 2а.
Тел. (8432) 381906, факс 364576.
E-mail: rga2003@rambler.ru

ные антитела являются основным элементом иммунной системы, предотвращающим диссеминацию вируса в организме инфицированного.

Кроме того, исследование состава циркулирующих иммунных комплексов имеет большое значение для ранней диагностики заболевания.

Были поставлены следующие задачи:

1. Проведение мониторинга относительной серологической активности антител в сыворотках крови больного ВИЧ-инфекцией на стадии первичного гуморального ответа.

2. Обнаружение и сравнительное изучение частоты встречаемости «свободных» антител и «связанных» с белками вируса в циркулирующие иммунные комплексы в сыворотках крови больных ВИЧ-инфекцией в ранний период заболевания.

Материалы и методы

В работе были использованы образцы сывороток крови больных ВИЧ-инфекцией, которые состояли на диспансерном учете с сомнительными результатами в иммуноблоте и в дальнейшем были взяты на учет с диагнозом «ВИЧ-инфекция». Общее количество проб – 46 сывороток крови. Серологическую активность анти-ВИЧ антител в сыворотках крови и ЦИК исследовали методом ИФА на тест-системах: «ВИЧ-1, ВИЧ-2-ИФА – Авиценна» фирмы «Авиценна» (Россия) и «КомбиБест анти-ВИЧ-1+2» фирмы «Вектор-Бест» (Россия), с последующим определением спектра антител к белкам ВИЧ-1 в иммуноблоте «NEW LAV BLOT 1» фирмы «Bio Rad» (США).

Денситометрию стрипов иммуноблота проводили в отраженном свете на сканере SHARP JX-330 «Pharmacia Biotech» (Швеция) с оценкой относительной серологической активности анти-ВИЧ антител в программе Image Master 1D Prime фирмы «Pharmacia Biotech» (Швеция).

За основу получения циркулирующих иммунных комплексов из сывороток крови больных ВИЧ-инфекцией был взят метод преципитации 7%-ным раствором полиэтиленгликоля (ПЭГ) в 0,1М боратном буфере с рН 8,8 [2, 6]. Результаты диск-электрофореза в полиакриламидном геле показали, что 7%-ный раствор ПЭГ обеспечивал выделение двух фракций: «быстро» (18 ч) - и «медленно» (72 ч) - преципитирующих ЦИК (ЦИК1 и ЦИК2), которые были представлены на электрофореграммах иммуноглобулиновой зоной и не содержали примесей белков плазмы крови. Далее препараты ЦИК диссоциировали температурным воздействием при +60°C в течение 3-х часов, предварительно поместив их в отрицательные по ВИЧ, HBsAg и гепатиту С сыворотки крови производства фирмы «Bio Rad» (США).

Для оценки различий между отдельными выборками использовали непараметрический критерий знаков z [3].

Результаты и обсуждение

В таблице 1 представлены результаты мониторинга относительной серологической активности антител к структурным белкам вируса в сыворотках крови больного ВИЧ-инфекцией в период формирования гуморального иммунного ответа. Наблюдение вели от момента выявления анти-ВИЧ антител методом ИФА в титре 1:64 до постановки диагноза ВИЧ-инфекция и появления антител ко всем структурным белкам вируса. Молекулярные массы вирусных белков даны в соответствии с инструкцией, прилагаемой к набору «NEW LAV BLOT 1» фирмы «Bio Rad».

В начале наблюдения общий пул был представлен антителами к ядерному белку р25 и в следовых количествах - к предшественнику ядерных белков р55. Известно, что на ранних этапах заболевания антитела к р25 составляют значительную фракцию [4], но по мере нарастания титра анти-ВИЧ антител отмечалось постепенное снижение относительной доли присутствия антител к ядерному белку. Через 21 день наблюдалось появление антител к предшественнику гликопротеинов ВИЧ-1 – gp160. На 73-й день мониторинга при снижении титра анти-ВИЧ антител в ИФА до 1:512 было отмечено появление в иммуноблоте антител к gp120 и другим вирусным белкам, что позволило поставить диагноз «ВИЧ-инфекция». К моменту выявления полного спектра антител к структурным белкам вируса основными серодоминантными фракциями общего пула анти-ВИЧ антител в иммуноблоте являлись антитела к gp160 и р25.

Таким образом, начальная стадия развития иммунного ответа на ВИЧ-1 характеризовалась умеренным повышением относительной серологической активности «свободных» анти-ВИЧ антител к белкам гена env, в частности к gp160 и gp120. Причем, антитела к gp41 и р18 отмечались в иммуноблоте только на 312 день наблюдения. К тому же, из данных таблицы 1 следует, что активность антител к белкам гена pol также увеличилась за счет появления антител к протеазе, обратной транскриптазе и эндонуклеазе ВИЧ-1.

На следующем этапе работы мы провели сравнительный анализ частоты встречаемости «свободных» антител и «связанных» с белками вируса в циркулирующие иммунные комплексы в сыворотках крови больных ВИЧ-инфекцией в ранний период заболевания. Согласно рекомендациям Всемирной Организации Здравоохранения по интерпретации результатов иммуноблота были выделены две группы сывороток крови: в первую вошли 20 проб с сомнительными результатами иммуноблота, а во вторую - 26 проб с положительными результатами иммуноблота.

Несмотря на то, что сыворотки крови были получены в разные сроки диспансерного наблюдения

больных ВИЧ-инфекцией, тем не менее, в первой группе пул в основном был представлен антителами к gp160, p55, p25, а во второй группе еще и к gp120, p68 и p52. Причем, в группе с положительными результатами иммуноблота частота встречаемости антител к gp160, gp120 и p25 в сыворотках крови составляла 100%. Титры «свободных» анти-ВИЧ антител в ИФА колебались в первой группе в диапазоне от 1:4 до 1:128, а во второй группе от 1:256 до 1:4096, соответственно. Следовательно, динамика инфекционного процесса сопровождалась нарастанием титра «свободных» анти-ВИЧ антител на ранних этапах заболевания.

В ЦИК1, выделенных из сывороток крови с сомнительными результатами иммуноблота, наблюдалось присутствие антител к p25, gp160 и p55, а также обнаруживались антитела к gp120 при полном их отсутствии в спектре «свободных» антител.

Данные сравнительного анализа частоты встречаемости «связанных» анти-ВИЧ антител в ЦИК1 и ЦИК2, которые были выделены из сывороток крови с положительными результатами иммуноблота, представлены в таблице 3. Согласно нашим наблюдениям, в ЦИК1 наиболее часто встречались антитела к gp160, p25, gp120 и p55 и в двух случаях присутствовали антитела к gp41. На заключительных этапах формирования гуморального иммунного ответа на ВИЧ в ЦИК2 выявлялись антитела к p25, gp160, p18, p55 и p34. Методом ИФА была исследована серологическая активность анти-ВИЧ антител в ЦИК1 и ЦИК2. В первой группе титры антител к ВИЧ-1 изменялись в диапазоне от 0 до 1:16, а во второй группе от 1:4 до 1:128 соответственно.

Используя непараметрический критерий знаков z, было показано, что в сыворотках крови с сомнительными результатами иммуноблота частота встречаемости анти-ВИЧ антител к gp160 и p25 на 95%-ом уровне значимости была достоверно выше, чем в

ЦИК2. Нами были обнаружены достоверные различия между частотой встречаемости «свободных» антител к gp160, gp120, p55, p25 и присутствием этих антител в ЦИК2 для сывороток крови с положительными результатами иммуноблота, кроме того, частота встречаемости «свободных» антител к gp120 была достоверно выше, чем в ЦИК1.

Таким образом, во-первых, было установлено, что в сыворотках крови с сомнительными результатами иммуноблота отсутствовали антитела к gp120 и gp41 при максимальной частоте встречаемости антител к p25, причем антитела к gp120 регистрировались в ЦИК1 в двух случаях. Во-вторых, анти-ВИЧ антитела к gp41 и gp120 отмечались в ЦИК1 и сыворотках крови в группе с положительными результатами иммуноблота. В-третьих, согласно нашим наблюдениям, антитела к p25 обнаруживались как в сыворотках крови, так и в ЦИК1, ЦИК2 на самых ранних этапах формирования гуморального иммунного ответа и вплоть до постановки диагноза «ВИЧ-инфекция».

По мнению Zinkernagel R.M. (2001), специфичность антител ограничена теми эпитопами, которые доступны в составе полноценной вирусной частицы. Следовательно, как было отмечено ранее, только антитела, направленные против гликопротеинов наружной оболочки вируса, обладают защитными свойствами, иные антитела, направленные против скрытых детерминант вируса, обычно работают «вхолостую». По-видимому, антитела к p25, которые появляются на ранних этапах заболевания, не могут быть нейтрализующими, хотя и обнаруживаются в иммунных комплексах, так как капсид вириона скрыт наружной оболочкой, необходимой для проникновения вируса в клетку [1, 8]. Остаётся загадкой, почему именно эти антитела появляются первыми и обнаруживаются в циркулирующих иммунных комплексах на ранних этапах заболевания.

Табл. 1. МОНИТОРИНГ ОТНОСИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ АНТИ-ВИЧ АНТИТЕЛ К СТРУКТУРНЫМ БЕЛКАМ ВИРУСА В СЫВОРОТКАХ КРОВИ БОЛЬНОГО ВП-4994

Сроки исследования (дни)	титры анти-ВИЧ АТ в ИФА	Относительная активность анти-ВИЧ антител в иммуноблоте к белкам генов (%)**												
		env				gag					pol			
		gp160	gp120	gp41	Σ	p55	p18	p25	p40	Σ	p68	p52	p34	Σ
начало	1:64	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	99,8	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
21	1:1600	2,2	0,0	0,0	2,2	1,6	0,0	96,2	0,0	97,8	0,0	0,0	0,0	0,0
73	1:512	13,1	2,2	0,0	15,3	6,1	0,0	78,2	0,0	84,3	0,4	0,0	0,0	0,4
98	1:512	11,1	2,9	0,0	14,0	6,7	0,0	76,1	0,0	82,8	0,8	0,0	2,4	3,2
172	1:128	27,5	11,1	0,0	38,6	7,7	0,0	44,7	0,7	53,1	2,7	1,3	4,3	8,3
312	1:256	19,6	12,6	10,9	43,1	11,1	0,2	24,6	4,4	40,3	5,9	4,5	6,2	16,6

Примечания: * - первый положительный результат ; ** - в % к общему количеству антител в иммуноблоте

Табл.2. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ АНТИ-ВИЧ АНТИТЕЛ В ЦИК И СЫВОРОТКАХ КРОВИ С СОМНИТЕЛЬНЫМИ РЕЗУЛЬТАТАМИ ИММУНОБЛОТА

Количество проб	Объект исследования	Частота встречаемости антител к белкам генов*									
		env			gag				pol		
		gp160	gp120	gp41	p55	p18	p25	p40	p68	p52	p34
20	сыв-ка крови	80,0	0,0	0,0	55,0	25,0	90,0	15,0	10,0	10,0	10,0
	ЦИК1	40,0	10,0	0,0	40,0	10,0	50,0	5,0	5,0	5,0	5,0
	ЦИК2	0,0	0,0	0,0	0,0	40,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Примечание:* - в % к общему числу сывороток крови исследованных в этой группе.

Табл.3. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ АНТИ-ВИЧ АНТИТЕЛ В ЦИК И СЫВОРОТКАХ КРОВИ С ПОЛОЖИТЕЛЬНЫМИ РЕЗУЛЬТАТАМИ ИММУНОБЛОТА

Количество проб	Объект исследования	Частота встречаемости антител к белкам генов*									
		env			gag				pol		
		gp160	gp120	gp41	p55	p18	p25	p40	p68	p52	p34
26	сыв-ка крови	100,0	100,0	15,4	84,6	26,9	100,0	26,9	50,0	50,0	34,6
	ЦИК1	46,2	15,4	7,7	15,4	7,7	34,6	3,8	7,7	3,8	7,7
	ЦИК2	19,3	0,0	0,0	3,8	11,5	23,1	0,0	0,0	0,0	3,8

Примечание:* - в % к общему числу сывороток крови исследованных в этой группе.

Список литературы

1. Абэлян А.В. Иммунологическая нейтрализация вируса иммунодефицита человека первого типа // Успехи современной биологии.-1997.-№5.-С.549-567.
2. Лабораторные методы исследования в клинике / Под ред. Меньшикова В.В., Делекторской Л.Н., Золотницкой Р.П.-М.:Медицина,1987.-386 с.
3. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. вузов. - М.:Выш. школа,1990.-352 с.
4. Покровский В.В., Ермак Т.Н., Беляева В.В., Юрин О.Г. ВИЧ-инфекция: клиника, диагностика и лечение. - М.:ГЕОТАР МЕДИЦИНА, 2000.-496с.

5. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. Пер. с англ. – М.: МИР, 2000.- 592с.

6. Digeon M., Bach JF. Detection of circulating immune complexes by three techniques using polyethylene glycol // Nouv. Press. Med.-1977.-Vol.6.-P.4031-4037.

7. Smith – Franklin B.A., Keele B.F., Tew J.G., Gartner S., Szakal A.K., Ester J.D., Thacker T.C., Burton G.F. Follicular dendritic cells and the persistence of HIV infectivity: the role of antibodies and Fc receptors // The Journal of immunology.-2002.-Vol.168.-P.2408-2414.

8. Zinkernagel R.M. Что недостает иммунологии для понимания иммунитета? // Аллергология и иммунология.-2001.-№1-С.7-15.

поступила в редакцию 10.07.2004
отправлена на доработку 07.12.2004
принята к печати 13.01.2005