Вирус синдрома приобретенного иммунного дефицита.

1. Введение

Еще каких-нибудь два десятка лет назад человечество пребывало в уверенности, что инфекционные болезни не больше не представляют опасности для цивилизованного мира. Однако с появлением в начале 80-х годов синдрома приобретенного иммунного дефицита (СПИДа) эта уверенность существенно поколебалась. СПИД не является редким заболеванием, от которого могут случайно могут пострадать немногие люди. Ведущие специалисты определяют в настоящее время СПИД как “глобальный кризис здоровья”, как первую действительно всеземную и беспрецедентную эпидемию инфекционного заболевания, которое до сих пор по прошествии первой декады эпидемии не контролируется медициной и от него умирает каждый заразившейся человек.

СПИД к 1991 году был зарегистрирован во всех странах мира, кроме Албании. В самой развитой стране мира - Соединенных Штатах уже в то время один их каждых 100-200 человек инфицирован, каждые 13 секунд заражается еще один житель США и к концу 1991 года СПИД в этой стране вышел на треть место по смертности, обогнав раковые заболевания. Пока что СПИД вынуждает признать себя болезнью со смертельным исходом в 100% случаев.

Первые заболевшие СПИДом люди выявлены в 1981 году. В течении прошедшей первой декады распространение вирус-возбудителя шло преимущественно среди определенных групп населения, которые называли группами риска. Это наркоманы, проститутки, гомосексуалисты, больные врожденной гемофилии (так как жизнь последних зависит от систематического введения препаратов из донорской крови).

Однако к концу первой декады эпидемии в ВОЗ накопился материал, свидетельствующий о том, что СПИД вышел за пределы названных групп риска. Он вышел в основную популяцию населения.

С 1992 года началась вторая декада пандемии. Ожидают, что она будет существенно тяжелее, чем первая. В Африке, например, в ближайшие 7-10 лет 25% сельскохозяйственных ферм останутся без рабочей силы по причине вымирания от одного только СПИДа.

СПИД - разрушительная болезнь, вызываемая инфекционным агентом, относящимся к группе ретровирусов. Пугающе загадочная эпидемия только начиналась, но наука мгновенно отозвалась на нее. За два года, с 1982 по 1984 г., была выяснена общая картина болезни. Выделен возбудитель - вирус иммудефицита человека (HIV - от англ. Human Immunodeficiency Virus), разработан метод анализа крови, выявляющий наличие инфекции, установлены специфические мишени вируса в организме.

Хотя уже ясна общая картина синдрома приобретенного иммунодефицита и связанных с ним заболеваний, а также выявлен и исследован вирус иммунодефицита человека, его происхождение остается загадкой. Есть убедительные серологические данные в пользу того, что на западном и восточном побережьях Соединенных Штатов инфекция появилась в середине 70-х годов. При этом случаи ассоциированных со СПИДом заболеваний, известных в центральной Африке, указывают на то, что там инфекция, возможно появилась еще раньше (50-70 лет). Как бы то ни было, пока не удается удовлетворительно объяснить, откуда взялась эта инфекция. С помощью современных методов культивирования клеток было обнаружено несколько ретровирусов человека и обезьян. Как и другие РНК-содержащие вирусы, они потенциально изменчивы; поэтому у них вполне у них вполне вероятны такие перемены в спектре хозяев и вирулентности, которые могли бы объяснить появление нового патогена. Существует несколько гипотез:

1) воздействие на ранее существующий вирус неблагоприятных факторов экологических факторов;

2) бактериологическое оружие;

3) мутация вируса в следствии радиационного воздействия урановых залежей на предполагаемой родине инфекционного патогена - Замбии и Заире.

После первого всплеска исследования, хотя и несколько медленнее, но устойчиво продвигались вперед. Тем не менее в некоторых отношениях вирус перегонял науку. До сих пор по сути нет средств лечения или предупреждения СПИДа, а эпидемия тем временем продолжает распространяться. На многие вопросы, связанные с этой болезнью, ответа пока нет, но так же некоторые вопросы поддались успешному разрешению.

2. Строение и жизненный цикл вируса СПИДа

Инфекция вирусом иммунодефицита человека, вызывающим СПИД, многолика. Вначале этот вирус обычно интенсивно размножается, и свободные вирионы (вирусные частицы) появляются в жидкости. Заполняющей полости головного и спинного мозга, а так же в кровотоке. Первая волна репликации HIV может сопровождаться жаром, сыпью, явлениями, подобным симптомам гриппа, и иногда неврологическими расстройствами. Затем на несколько недель количество вируса, циркулирующего в крови и цереброспинальной жидкости, значительно уменьшается. Тем не менее вирус по-прежнему присутствует в организме. Его можно обнаружить не только в Т-4 лимфоцитах, которые в начале считались его единственной мишенью, но и в других клетках иммунной системы, в клетках нервной системы и кишечника, а так же, по всей вероятности, в некоторых клетках спинного мозга.

Здесь имеет смысл дать краткое описание той системы организма, которую он выводит из строя, то есть системы иммунитета. Она обеспечивает в нашем теле постоянство состава белков и осуществляет борьбу с инфекцией и злокачественно перерождающимися клетками организма.

Как и всякая другая система, иммунная система имеет свои органы и клетки. Ее органы - это тимус (вилочковая железа), костный мозг, селезенка, лимфатические узлы (их иногда неправильно называют лимфатическими железами), скопление клеток в глотке, тонком кишечнике, прямой кишке. Клетками иммунной системы являются тканевые макрофаги, моноциты и лимфоциты. Последние в свою очередь, подразделяются на Т-лимфоциты (созревание их происходит в тимусе, откуда и их название) и В-лимфоциты (клетки, созревающие в костном мозге).

Макрофаги имеют многообразные функции, они, например, поглощают бактерии, вирусы и разрушенные клетки. В-лимфоциты вырабатывают иммуноглобулины - специфические антитела против бактериальных, вирусных и любых других антигенов - чужеродных высокомолекулярных соединениях. Макрофаги и В-лимфоциты обеспечивают гуморальный (от лат. humor - жидкость) иммунитет.

Так называемые клеточный иммунитет обеспечивают Т-лимфоциты. Их разновидность - Т-киллеры (от англ. killer - убийца) способны разрушать клетки, против которых вырабатывались антитела, либо убивать чужеродные клетки.

Сложные и многообразные реакции иммунитета регулируются за счет еще двух разновидностей Т-лимфоцитов: Т-хелперов (помощников), обозначаемых также Т4, и Т-супрессоров (угнетателей), иначе обозначаемых как Т8. Первые стимулируют реакции клеточного иммунитета, вторые угнетают их. В итоге обеспечивается нейтрализация и удаление чужеродных белков антителами, разрушение проникших в организм бактерий и вирусов, а также злокачественных переродившихся клеток организма, иначе говоря, происходит гармоническое развитие иммунитета.

В общих чертах жизненный цикл HIV, такой же, как у других вирусов этой группы. Ретровирусы получили свое название в связи с тем, что в их развитии имеется этап, на котором перенос информации происходит в направлении обратном тому, которое считается обычным, нормальным. Генетическим материалом клеток является ДНК. В ходе экспрессии генов сначала происходит транскрипция ДНК: образуется копирующая ее мРНК, которая затем служит матрицей для синтеза белков. Генетическим материалом ретровирусов служит РНК, и, чтобы произошла экспрессия генов, должна появиться ДНК-копия вирусной РНК. Эта ДНК обычным путем обеспечивает синтез вирусных белков.

Жизненный цикл HIV начинается с того, что вирусная частица присоединяется снаружи к клетке и вводит внутрь нее свою сердцевину. Сердцевина вириона содержит две идентичные цепи РНК, а так же структурные белки и ферменты, нужные на последующих стадиях жизненного цикла. Фермент обратная транскриптаза, имеющая несколько ферментативных активностей, осуществляет этапы переноса генетической информации вируса - синтез ДНК. На первом этапе она синтезирует одноцепочечную ДНК по РНК, затем расщепляя последнюю. Затем синтезируется вторая цепь, используя первую в качестве матрицы.

Генетическая информация вируса, теперь уже в форме двухцепочечной ДНК, проникает в клеточное ядро. С помощью интегразной активности того же фермента эта ДНК встраивается в хромосомную ДНК. В таком виде вирусная ДНК, называемая провирусом, будет воспроизводиться вместе с собственными генами при делении клетки и передаваться следующим поколениям.

Вторая часть жизненного цикла HIV - производство новых вирионов - совершается спорадически и только в некоторых зараженных клетках. Она начинается, когда т.н. длинные концевые повторы (LTR, от англ. long terminal repeat; это особые нуклеотидные последовательности на концах вирусного генома) инициируют транскрипцию вирусных генов; при этом ферменты, принадлежащие клетке-хозяину синтезируют РНК - копии провируса.

Каждая вирусная частица собирается из множества копий двух различных белковых молекул, соотношение которых составляет примерно 20:1. Структура вириона довольно проста и состоит из двух оболочек: внешней - сферической, и внутренней - пулевидной. Последняя содержит в себе две цепи РНК и ферменты: обратную транскриптазу, протеиназу и интегразу. На внешней оболочке содержатся белки, молекулы которого выступают из мембраны наподобие шипов. Каждый шип образован двумя или тремя идентичными субъединицами, которые в свою очередь состоят из двух связанных компонентов, представляющих собой гликопротеины. Один компонент, обозначаемый gp120 (гликопротеин с молекулярной массой 120000), выступает над поверхностью клетки, а другой - gp41 - наподобие стержня погружен в мембрану. Эти гликопротеинные комплексы определяют способность HIV заражать новые клетки.

Хитроумно организованные генетические регуляторы определяют, начнется ли цикл репликации вируса, и какова будет интенсивность размножения. Помимо трех генов для белков сердцевины и оболочки в геноме HIV имеется по меньшей мере шесть генов. Некоторые из них, а возможно и все, регулируют производство вирусных белков: один ген обеспечивает ускорение синтеза белков в целом, другой - только определенных белков, а третий - подавление синтеза белков. Поскольку регуляторные гены сами кодируют белки, каждый из них влияет не только на структурные гены, но и на регуляторные гены, в том числе и на самого себя.

Регуляторный ген tat (от англ. **t**rans-**a**ctivator of **t**ranscription) ответственен за вспышку репликации, которая наблюдается, к примеру, в Т-4 клетках, когда они активируются при встрече с антигеном (чужеродной молекулой, вызывающей иммунный ответ). Ген tat необычен как по структуре, так и по своему действию. Он состоит из двух нуклеотидных последовательностей, расположенных довольно далеко друг от друга. В результате его транскрипции образуется РНК (первичный транскрипт), которая должна подвергнуться сплайсингу (промежуточный сегмент вырезается и кодирующие последовательности соединяются), чтобы она превратилась в мРНК и по ней синтезировался белок. влияние белка - продукта гена tat очень велико: он может повысить уровень экспрессии вирусных генов в 1000 раз по сравнению с тем, что наблюдается у мутантов HIV без этого гена. Стимулирующий эффект распространяется на все вирусные белки - как на структурные компоненту вирионов, так и на регуляторные белки, включая белок кодируемый самим геном tat. Благодаря такой положительной обратной связи, как только механизм с участием гена tat активировался, очень быстро образуется огромное количество вирусных частиц.

В то время как ген tat усиливает синтез всех вирусных белков без разбора, второй регуляторный ген, rev (от англ. regulator of virion-protein expression - регулятор экспрессии белков вириона) обладает избирательным действием, благодаря которому производятся либо регуляторные белки, либо компоненты вириона. Белок - продукт гена rev, как и в случае гена tat, кодируется разобщенными нуклеотидными последовательностями, которые соединяются в результате сплайсинга РНК. В регуляции этим белком участвуют еще две последовательности. Одна из них действует как репрессор: препятствует трансляции транскриптов, которые ее содержат. Другая последовательность взаимодействует с белком rev и снимает эффект первой последовательности.

Последовательность - репрессор, называемая CRS (от англ. cis-acting repression sequence), имеется в мРНК, по которым синтезируются белки, формирующие вирионы - сердцевинные белки, ферменты репликации и белок оболочки; мРНК регуляторных белков - продуктов генов tat и самого rev - не содержат CRS. В отсутствие белка - продукта гена rev - последовательность CRS не дает накапливаться длинным мРНК, по которым синтезируются белки для вирионов. Напротив, короткие мРНК, кодирующие регуляторные белки не имеющие CRS, стабильны и транслируются.

В присутствии белка - продукта гена rev происходит “переключение”. Этот белок действует на последовательность CAR (от англ. cis-acting rev-responsive sequence), которая тоже содержится в длинных мРНК. При этом нейтрализуется CRS и начинают накапливаться полноразмерные мРНК, и вместо регуляторных белков синтезируются белки, из которых собираются новые вирионы. Таким образом , механизм с участием гена rev может определять переход от скрытой инфекции к активному размножению вируса.

Однако в ходе репликации взаимодействие между механизмами rev и tat может сдерживать размножение вируса, нейтрализуя друг друга. Продукт гена tat усиливает синтез самого себя и белка гена rev, тогда как продукт гена rev замедляет собственный синтез и синтез белка кодируемого геном tat. В результате устанавливается своего рода гомеостаз, характеризующийся постоянными уровнями белков, кодируемых генами tat и rev, и умеренным производством вирусных частиц. Ограниченная репликация позволяет вирусу воспроизводиться годами, не убивая зараженные клетки, поэтому такой тип генетической регуляции может быть адаптивным признаком ретровирусов, хозяевами которых являются виды с долгим временем жизни, такие как человек.

Помимо активатора (tat) и избирательного регулятора (rev) у HIV есть негативный регулятор. Который замедляет транскрипцию вирусного генома. Ген негативного регуляторного фактора, обозначаемый nef (от англ. negative-regulatory factor), возможно, определяет способность HIV прекращать размножение и переходить в состояние покоя.

Последовательность, являющаяся мишенью белка - продукта гена nef, расположена в начале вирусного генома в длинном концевом повторе. Она называется негативным регуляторным элементом (NRE, от англ. negative- regulatory element). NRE подавляет транскрипцию даже сама по себе; если вирусный LTR, лишенный этой последовательности, ввести в незараженную клетку, он обеспечивает повышенный уровень транскрипции клеточных генов. Продукт гена nef усиливает эффект NRE. но каким образом он достигает этого - загадка.

Сложные механизмы регуляции размножения HIV действуют не в изоляции: они тесно связаны с метаболизмом клетки-хозяина. Начать с того, что вирус использует клеточный аппарат для транскрипции своих генов и синтеза белков. В частности, клеточные факторы явно играют роль во вспышке репликации HIV, происходящей при участии гена tat, когда зараженная Т-клетка стимулируется антигеном. Особенности молекулярного “климата” клетки-хозяина также, вероятно, как-то влияют на скорость размножения вируса, которая различна в различных типах клетки.

Возможно, для связи клеточных и вирусных процессов имеет значение связь клеточных белков с LTR в начале вирусного генома. Последовательности в LTR определяют сайт инициации транскрипции вирусных генов - стартовую точку, в которой начинается синтез мРНК. По крайней мере восемь белков, которые в норме участвуют в клеточной транскрипции, связываются с клеточной ДНК в сайте инициации транскрипции или рядом с ним. Они играют определенную роль в процессе транскрипции. Один из белков, который узнает инициаторные последовательности, играет специфическую роль в Т-клетках и других лимфоцитах. Этот белок активируется, когда лимфоцит стимулируется антигенами и начинает размножаться. Считается, что он способствует размножению клетки, усиливая транскрипцию. Как выяснилось, при стимуляции зараженных Т-клеток усиливается связывание этого белка с геномом провируса. Таким образом активация этого белка может быть одним из путей ускорения размножения HIV при стимуляции Т-клетки.

Вероятно, набор клеточных факторов, действующий на вирусный геном, варьирует в зависимости как от условий, так и от типа клетки-хозяина. Некоторые клетки, находясь в состоянии покоя. Могут просто не иметь белков, необходимых для инициализации транскрипции, так что инфекция остается скрытой. В других клетках скорость размножения вируса может быть ограничена из-за низкой концентрации инициаторных факторов или из-за избытка белков, ингибирующих синтез мРНК. Таким образом, клетка-хозяин при помощи собственных факторов транскрипции создает молекулярное окружение, влияющее на регуляторные механизмы HIV.

После того как в результате действия описанных выше механизмов началось производство вирусных частиц, в игру вступает последний ген. Этот ген, названный vif (от англ. virion infectivity factor - фактор инфекционности вириона), кодирует небольшой белок, который обнаруживается в цитоплазме зараженных клеток и вокруг них в межклеточной среде, а так же в свободных вирусных частицах. Белок - продукт гена vif каким-то образом усиливает способность отпочковавшегося вириона заражать другие клетки. У штаммов HIV с мутациями, инактивирующими vif, вирионы имеют нормальный вид, содержат полный набор РНК и ферментов, но заражают клетки намного менее эффективно.

3. Этапы заражения клетки вирусом СПИДа

Первый шаг любой вирусной инфекции - связывание вирусной частицы с компонентом мембраны заражаемой клетки. Для HIV роль такого рецепторного компонента играет белок, называемый антигеном CD4.(Антиген - это молекулярная структура, которая узнается антителом.) из этого следует, что распределение CD4 в организме должно соответствовать тропизму HIV, т.е. спектру клеток и тканей, поражаемых вирусом. Антиген CD4 встречается главным образом на лимфоцитах, называемых Т-4 хелперами, которые являются важным элементом иммунной системы, а так же на некоторых других клетках.

Как было установлено, связывание происходит, если CD4 взаимодействует с белком оболочки вируса gp120, который распределен на внешней поверхности мембраны. Удалось определить специфические фрагменты молекул CD4 и gp120, участвующие в связывании. Эти результаты открывают возможность двойной борьбы с HIV: препятствовать взаимодействию вируса с клеточным рецептором CD4 можно блокируя сам рецептор или экранируя вирусный белок gp120.

Вследствие поражения клеток крови, несущих антиген CD4, особенно Т-4 лимфоцитов, по его концентрации можно судить о зараженности СПИДом. В клеточных культурах можно так же наблюдать еще один весьма удобный для исследования признак заражения - образование многоядерных синцитиев. Синцитий представляет собой гигантскую клетку, содержащую множество ядер внутри одной мембраны. Он формируется в результате слияния клеток, зараженных HIV, со здоровыми клетками, несущими молекулы рецептора.

Наиболее строгое доказательство такого механизма взаимодействия вируса с клеткой стал эксперимент, проведенный в 1984 г. в Колумбийском университете США. Удалось перенести ген, кодирующий CD4, в клетки HeLa - линию клеток раковой опухоли шейки матки. Эти клетки не содержат CD4 и в норме не заражаются HIV. Тогда как измененные клетки HeLa, несущие CD4, могут быть заражены HIV, после чего они быстро сливаются в гигантские синцитии.

Этот эксперимент дал, кроме того, один неожиданный результат, который до сих пор полностью не объяснен. Человеческий ген CD4 был введен в мышиные Т-клетки, которые тем самым приобрели способность производить соответствующий белок. Частицы HIV связывались с этими измененными клетками, однако признаков инфекции не было: не образовывался ни синцитий, ни инфекционные вирусные частицы. Это было удивительно, так как мышиные клетки вообще-то способны поддерживать размножение HIV при некоторых условиях. По всей видимости, мышиные клетки не могут быть заражены частицами HIV даже в присутствии рецепторов HIV. К заражению мышиных клеток оказались также неспособны некоторые родственные вирусы. Эти факты позволяют предполагать, что необходим еще какой-то компонент клеточной поверхности для того, чтобы вирус, прикрепившийся к клеточной мембране смог проникнуть внутрь клетки. Природа такого дополнительного фактора пока не ясна.

Связывание вирусного gp120 с клеточным CD4 - это только первый этап проникновения вируса в клетку. Последующие этапы пока менее понятны. Например, как попадает в клетку вирусный генетический материал? Простейшая и наиболее вероятная возможность состоит в том, что оболочка вириона сливается с клеточной мембраной и содержимое вирусной частицы (включая генетический материал) оказывается внутри клетки. Другой возможный путь - эндоцитоз, т.е. образование небольшого впячивания клеточной мембраны, которое затем отпочковывается внутрь, превращаясь в замкнутый мембранный пузырек. Пузырек полностью окружает вирусную частицу и переносит ее внутрь клетки. Там мембрана, образующая пузырек (теперь он называется эндосомой), закисляется. Это приводит к конформационным изменениям, слиянию ее с вирусной мембраной и освобождению содержимого вирусной частицы во внутриклеточное пространство.

Независимо от того, что на самом деле происходит - прямое слияние или эндоцитоз - вирусная мембрана должна претерпеть слияние с клеточной. Как же это осуществляется? Согласно одной из гипотез, представляющейся вполне правдоподобной, связывание gp120 с CD4 вызывает изменение конформации белка gp120, вследствие чего обнажается часть другого белка оболочки, gp41, в норме скрытого под молекулой gp120. Эта область gp41 гидрофобна и потому должна внедряться в мембрану, а не оставаться снаружи, в водной среде, окружающей клетку. Оказавшись открытой, гидрофобная область gp41 взаимодействует с близлежащей частью клеточной мембраны и индуцирует ее слияние с вирусной мембраной. Пока не ясно, нужен ли для связывания с gp41 еще какой-то рецептор клеточной поверхности, помимо CD4, или же gp41 сам внедряется прямо в клеточную мембрану.

После того, как HIV проник в клеточную среду и его генетический материал интегрировался в клеточный геном, он может оставаться неактивным и никак себя не обнаруживать, а может и проявиться одним из трех способов.

Во-первых, вирусный геном может вызвать персистирующую инфекцию; при этом образуется некоторое количество вирусных частиц, но клеток погибает немного. Во-вторых, инфекция может привести к образованию синцития, который вскоре гибнет. Появление синцитиев - главный результат воздействия HIV на культуру клеток. В организме зараженного человека синцитии иногда можно наблюдать на поздних стадиях инфекции \*особенно в мозге). Неясно, однако, играют ли они какую-то роль в раннем патогенезе СПИДа.

Третий вероятный результат заражения HIV - быстрая гибель клеток без образования синцитиев. Каким образом HIV убивает клетки пока не ясно. Возможно, какие-то из продуктов, кодируемых генами HIV, обладают прямым токсическим действием. Возможно, также разрушение клеточной мембранной системы из-за того, что внедрившийся в нее gp120, синтезированный в результате инфекции, взаимодействует с имеющимся в мембране CD4. Судьба зараженной клетки зависит и от иммунного ответа, поскольку иммунная система способна узнавать вирусные белки на поверхности зараженных клеток и убивать эти клетки.

Распределение зараженных HIV клеток в организме обусловлено главным образом тем, как распределены клетки, несущие CD4. Изначально этот антиген был идентифицирован по его присутствию на определенных Т-лимфоцитах. И действительно, его нормальные функции, по-видимому, в основном связаны со сложной сетью взаимодействий между клетками иммунной системы.

Т-лимфоциты, несущие CD4, способны взаимодействовать с клетками, представляющими антигены. Эти последние находят чужеродные антигены и экспонируют их на своей клеточной мембране вместе со специфическими белками - гликопротеинами MHC класса II (от англ. Major Histocompatibility Complex - главный комплекс гистосовместимости). Когда Т4-хелперы узнают комбинацию антигена и гликопротеина MHC класса II, они инициируют иммунный ответ против чужеродных или зараженных клеток, несущих этот антиген. Считается, что взаимодействие между антигенами CD4 на Т-клетках и гликопротеинами MHC класса II на клетках, представляющих антиген, важный элемент контакта этих клеток.

Как сейчас известно, Т-лимфоциты не единственные клетки со встроенным в мембрану антигеном CD4. Не менее 40% моноцитов периферической крови (эти клетки являются предшественниками макрофагов - клеток-“мусорщиков”) и некоторые клетки, представляющие антиген в лимфатических узлах, коже и других органах, а также примерно 5% всех В-клеток организма (эти клетки производят антитела) несут CD4 и могут быть заражены HIV.

Но некоторые виды клеток заражаются HIV в культуре, а прямо выделить в них CD4 не удается. К ним относятся глиальные клетки головного мозга, клетки ряда злокачественных опухолей мозга, а также определенные линии клеток из раковых опухолей кишечника. Однако, хотя эти клетки и не производят CD4 в экспериментально определимых количествах, они содержат немного информационной РНК, кодирующей белок CD4, а значит, способны синтезировать и сам CD4. По-видимому, для заражения HIV достаточно даже очень малого количества CD4.

4. Препараты, противостоящие СПИДу

Всякое терапевтическое средство против инфекции независимо от природы патогена - будь то вирус, бактерия, грибок или простейшее - должно либо вызывать гибель патогена, либо прекращать его размножение. При этом препарат не должен причинять существенного вреда зараженному организму. Как правило, такие лекарства выполняют свою задачу, действуя на биохимические процессы, характерные только для патогена. В случае бактерий это достигается сравнительно просто, так как по структуре и метаболизму клетки бактерий и клетки организма млекопитающего сильно различаются. Например, пенициллин нарушает синтез клеточной стенки бактерий, а на клетки млекопитающих, у которых нет такой стенки, он не действует.

С вирусами ситуация гораздо сложнее. Вирусы представляют собой просто генетический материал, одетый в оболочку из гликопротеинов и липидов. Они не способны размножаться самостоятельно и вместо этого заражают клетки другого организма и узурпируют их аппарат биосинтеза, который и обеспечивает воспроизведение вируса. Когда происходит активная репликация вируса, часто бывает трудно различить вирусные белки, взаимодействующие с клеткой и белки самой клетки. Тесная связь многих этапов жизненного цикла вируса с метаболизмом клетки-хозяина затрудняет создание препаратов, которые избирательно подавляют репликацию вируса и в тоже время минимально воздействуют на клетку.

Существенно также, что практически любой препарат (в том числе и пенициллин) обладает в той или иной степени побочным действием и токсичностью. Поэтому всегда необходимо учитывать не только эффект воздействия на патоген, но и вред, причиняемый организму человека. Важнейшей характеристикой потенциального терапевтического препарата является его “терапевтический индекс”: отношение токсичной дозы к эффективной дозе. Однако в случае болезней , представляющих угрозу для жизни, таких как СПИД, допустимо использовать и препараты со сравнительно низкими значениями терапевтического индекса по меньшей мере, пока не созданы более совершенные.

Сложный жизненный цикл позволяет HIV заражать клетки иммунной системы и ускользать от их действия. Но для борьбы с инфекцией такая сложность может быть не только бедствием, но и благом, поскольку она предоставляет много возможностей для воздействия противовирусных средств.

Первая стадия - связывание вируса с клеткой (см. выше). Существует несколько возможностей подавлять этот процесс. Можно получить антитела, которые взаимодействуют с соответствующей частью оболочки вируса и тем самым нейтрализуют способность gp120 связываться с CD4. Можно соединить такие антитела с молекулами какого-либо токсина, тогда они, связываясь с зараженными клетками, например с макрофагами, содержащими вирус и производящими его белки, будут убивать их. Можно получить и антитела к CD4, но этот подход потенциально опасен, потому что такие антитела будут атаковать и здоровые клетки иммунной системы организма. Поэтому исследования направлены главным образом на получение антител к gp120.

Получить эффективные антитела, нейтрализующие gp120, по ряду причин трудно. Не все антитела против gp120 будут блокировать ключевой участок связывания с CD4. У больных, в организме которых в процессе нормальной реакции на инфекцию HIV образуются нейтрализующие антитела (обычно лишь в малом количестве), СПИД тем не менее развивается. Определенного разрешения этой проблемы пока нет. Возможно одна из причин - высокая скорость мутирования HIV. У некоторых возникающих в организме вариантов вируса может быть изменен гликопротеин оболочки, и он не будет нейтрализовываться имеющимися антителами. Вторая возможная причина заключается в том, что молекулы сахаров. Входящие в состав гликопротеина оболочки HIV, сходны с аналогичными структурами на поверхности клеток человека, поэтому на оболочке вируса недостаточно уникальных участков, которые будут распознаваться иммунной системой как “чужие” и с которыми могли бы связываться антитела. В-третьих, в молекулах gp120 участок связывания CD4 расположен в углублении и потому мало доступен. Наконец, не исключено, что важные для связывания участки gp120 открыты только в момент связывания, а большую часть времени недоступны для иммунной системы.

Чтобы преодолеть эти трудности применяется несколько подходов. Один состоит в получении моноклональных антител. Для этого нужно идентифицировать антитела, которые действительно связываются с ключевым участком вирусного белка, клонировать производящие их лимфоциты и выращивать эти клетки in vitro.

Второй подход использует антиидиотипические антитела, т.е. “антитела против идиотипа”; в данном случае это антитела против антител к CD4. Идея заключается в том, что молекула моноклонального тела против CD4 по структуре может имитировать участок связывания CD4 в молекуле gp120, и поэтому антитело (антиидиотип) к этому участку должно связываться с gp120.

Третий подход заключается в создании растворимой, т.е. не связанной с клетками формы CD4, которая способна взаимодействовать с HIV, занимая его участки связывания и тем самым препятствуя его связыванию с CD4 на поверхности Т4-хелперов. В настоящее время растворимый CD4 был получен методами генной инженерии. Этот препарат действительно блокирует участки связывания CD4 на оболочке HIV и подавляет заражение Т-клеток. Вероятно, вирусу трудно будет измениться таким образом, чтобы потерять сродство к CD4, сохраняя при этом способность заражать другие клетки.

В будущем, возможно, удастся создать “химерные” молекулы, в которых объединятся участок молекулы CD4, взаимодействующий с HIV, и константная часть молекулы иммуноглобулина человека. Такие антитела “на заказ” должны обладать рядом преимуществ. Определенные участки тяжелых цепей иммуноглобулина способны активировать другие компоненты иммунной системы, приводя к разрушению вируса. Химерная молекула действовала бы подобно полицейскому с ищейкой: часть CD4 будет выслеживать вирус, а часть иммуноглобулина - вызывать подмогу для нападения. Кроме того, химерные молекулы могут дольше находиться в кровяном русле, чем просто растворимый CD4, потому что определенные иммуноглобулины обладают большим временем жизни в кровотоке.

В основе рассмотренных подходов лежит использование сложных биологических молекул, которые связываются с поверхностным гликопротеином вируса. Однако сходным образом могут действовать и другие молекулы. Было показано, что некоторые крупные отрицательно заряженные соединения, содержащие сульфатные группы, подавляют репликацию HIV. Прототипом может послужить декстрансульфат, молекулы которого с молекулярной массой в пределах 7000 - 8000 дальтон подавляют репликацию HIV in vitro. Один из механизмов действия декстрансульфата, вероятно, является подавление связывания вируса. Установлено также, что это соединение in vitro мешает образованию синцитиев, чего вполне можно ожидать для агента, блокирующего связывание вируса. Однако, токсичные и эффективные дозы этого препарата пока недостаточно изучены.

Когда HIV связался с клеткой, вирусная мембрана сливается с клеточной мембраной, и содержимое вириона попадает в цитоплазму. Здесь его сердцевинные белки частично удаляются, обнажая РНК. Антитела к gp41 могли бы предотвращать проникновение вируса в клетку. Возможны также реагента, препятствующие процессу “раздевания” РНК.

Однако в качестве мишени для воздействия на вирус наибольшее внимание привлек к себе следующий этап жизненного цикла вируса - синтез вирусной ДНК обратной транскриптазой. Здесь видятся особые преимущества, поскольку этот этап характерен только для ретро вирусов и не имеет отношения к клетке-хозяину. В поисках средств против ретровирусов с самого начала уделялось первостепенное внимание этой задаче. В частности исследовались соединения, называемые дидезоксинуклеозидами, которые являются ингибиторами обратной транскриптазы. Это аналоги нуклеозидов, т.е. по структуре они очень близки к нуклеотидам, служащим мономерами ДНК и РНК.

Одно из таких соединений - 3`-азидо-2`,3`- дидезокситимидин, или азидотимидин. Он был синтезирован в 1964 г. и первоначально предназначался в качестве противоракового препарата. В 1985 г. было обнаружено, что он является мощным ингибитором размножения HIV в культуре Т-лимфоцитов в концентрациях 1 - 5 мкМ (0,25 - 1,25 мкг/мл). При этом не наблюдалось заметной токсичности азидотимидина при концентрациях 20 - 50 мкМ или менее. Вскоре было показано, что азидотимидин эффективно действует у больных СПИДом при концентрации в организме 1 - 5 мкМ, как и предсказывалось на основании исследования в культуре Т-клеток.

Каким образом это соединение защищает клетки от HIV? Суть состоит в том, что оно близко по структуре к нуклеозиду тимидину, входящему в состав ДНК. В клетке азидотимидин подвергается ферментативному фосфорилированию: к нему присоединяется цепочка из трех фосфатных групп. Азидотимидин трифосфат и есть активная форма препарата. (Вводить в организм непосредственно азидотимидинтрифосфат нельзя, так как клетки не способны его поглощать.) Азидотимидинтрифосфат является аналогом тимидинтрифосфата - одного из мономеров ДНК. По-видимому, механизм подавления синтеза вирусной ДНК двоякий: конкурентное ингибирование и терминация синтеза цепи ДНК.

Конкурентное ингибирование состоит в том, что азидотимидинтрифосфат связывается с обратной транскриптазой в том участке, который в норме связывает обычные нуклеозидтрифосфаты. При терминации синтеза цепи ДНК обратная транскриптаза ошибочно включает азидотимидинтрифосфат в растущую цепь вирусной ДНК вместо тимидинтрифосфата, но присоединение следующего нуклеотида невозможно, потому что в молекуле азидотимидинтрифосфата нет гидроксильной группы, которая необходима для образования связи со следующим нуклеотидом. Вирус не в состоянии исправить эту ошибку и синтез дек прекращается.

Другие дидезоксинуклеозиды, обладающие активностью против HIV, действуют, по-видимому, таким же образом. Все эти соединения оказались эффективными против ряда ретровирусов (собственно всех, которые изучались на этот предмет), но только в форме трифосфатов. Поэтому их эффективность как терапевтических средств определяется тем, насколько легко они проникают в клетки и фосфорилируются клеточными ферментами, называемыми киназами. Например, фосфорилирование одних дидезоксинуклеозидов происходит лучше, чем других. Так 2`,3` - дидезокситимидин, который отличается от азидотимидина тем, что вместо азидогруппы (N3) имеется атом водорода, в клетках человека плохо фосфорилируется и поэтому менее эффективен против HIV, чем азидотимидин. Кроме того, процесс фосфорилирования этих соединений различается у разных видов, так что модели на животных могут быть неадекватными для предсказания эффективности конкретного дидезоксинуклеотида в организме человека.

Очень важно, может ли обратная транскриптаза вируса измениться в результате мутаций таким образом, что больше не будет ингибироваться азидотимидином. Это вопрос вовсе не праздный. Азидотимидин эффективен постольку, поскольку обратная транскриптаза HIV предпочитает азидотимидинтрифосфат тимидинтрифосфату, связывает его и включает в ДНК, в то время как ДНК-полимеразы клеток млекопитающих не обладают таким сродством к азидотимидинтрифосфату, синтез клеточной ДНК не нарушается и клетка продолжает успешно функционировать. Не исключено, что обратная транскриптаза могла бы утратить предпочтение к азидотимидинтрифосфату.

После того как на вирусной РНК синтезировалась цепь ДНК, начинается вторая стадия процесса обратной транскрипции - синтез второй нити ДНК, комплементарной первой. На этом этапе также возможно действие лекарственных препаратов. Например, можно попытаться нарушить работу вирусного фермента РНКазы Н, являющегося частью обратной транскриптазы; РНКаза Н, после того как синтезирована первая нить ДНК, расщепляет вирусную РНК, освобождая тем самым место для образования второй нити. Возможно, удастся блокировать и другую часть фермента - интегразу, которая, как полагают, разрезает ДНК клетки-хозяина и вставляет в разрыв ДНК вируса.

Следующее потенциально уязвимое место в цикле HIV появляется несколько позже, когда активируется клетка-хозяин. Клетка может начать синтезировать новые белки а также делиться. Тот же процесс, который активирует клетку, может инициировать транскрипцию провируса и трансляцию с образованием вирусных белков. Существует возможность нарушить этот процесс, используя “антисмысловые олигонуклеотиды”. Суть этой идеи заключается в следующем. Нужно получить олигонуклеотиды (короткие последовательности нуклеотидов), комплементарные части вирусной мРНК; мРНК - это смысловая последовательность, поскольку она непосредственно кодирует белок, а олигонуклеотиды называются антисмысловыми, потому что они комплементарны мРНК. Эти нуклеотиды способны связываться с вирусной мРНК; происходят, как говорят, молекулярная гибридизация: образуется дуплекс, т.е. двухцепочечный участок молекулы, который, вероятно, препятствует движению рибосом клетки вдоль вирусных мРНК и тем самым блокирует синтез вирусных белков. Такой механизм называется гибридизационным блоком трансляции.

В качестве лекарства олигонуклеотиды плохи тем, что многие из них могут расщепляться в клетках под действием ферментов. Правда их можно сделать устойчивыми к ферментативному расщеплению, если модифицировать определенные фосфодиэфирные связи между нуклеотидами.

В принципе возможно предотвращать образование вирусных частиц, блокируя гены или белки, которые осуществляют регуляцию репликации HIV.

Кроме того, на репликацию HIV могут влиять белки самой клетки и даже вирусы, которые случайно заразили ту же клетку. Например, было показано, что клеточный белок NF-kB, который играет роль внутриклеточного сигнала активации в некоторых лимфоцитах, способен инициировать репликацию HIV. При заражении рядом герпесвирусов в клетке образуется белок, известный под названием ICPO, который также может быть инициатором репликации HIV. Поэтому у больных, зараженных одновременно и HIV и герпесвирусом, возможно, удастся задерживать развитие СПИДа, контролируя герпесную инфекцию, например, с помощью препарата ацикловира.

В настоящее время исследователям не стоит связывать свои надежды с каким-либо одним методом лечения или лекарственным препаратом - напротив, необходимо приложить все усилия, чтобы разработать множество различных агентов, способных атаковать HIV на различных этапах его жизненного цикла. Опыт изучения азидотимидина сослужит хорошую службу при “доведении” препаратов до стадии, когда их можно будет использовать для лечения больных. С того момента, как была обнаружена активность азидотимидина против HIV до утверждения препарата для применения в медицинской практике прошло около двух лет. Несомненно, столь быстрый прогресс объясняется тщательными, научно обоснованными клиническими испытаниями.. Трудно переоценить значение метода испытаний с контрольной группой - как для успеха будущих средств лечения СПИДа, так и для изучения этого заболевания в целом, без чего немыслима победа над ним.

Литература

Уильям А. Хэзелтайн, Флосси Вонг-Стааль; Молекулярная биология вируса СПИДа.:// В мире науки , №12, 1988.

Джонатан Н. Вебер, Робин А. Вейсс; Взаимодействие вируса СПИДа с клеткой.:// В мире науки , №12, 1988.

Роберт Яркоан, Хироаки Мицуя, Самьэл Бродер; Средства лечения СПИДа.:// В мире науки , №12, 1988.

Роберт К. Галло; Вирус синдрома приобретенного иммунного дефицита.:// В мире науки , №3, 1987.