

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Удмуртский государственный университет»

На правах рукописи

Храмова Татьяна Владимировна

**МЕХАНИЗМ РАЗВИТИЯ CD4⁺-ЛИМФОЦИТОПЕНИИ У КРЫС,
ВЫЗВАННОЙ ИММУНИЗАЦИЕЙ GP120 ГЛИКОПРОТЕИНОМ ВИЧ**

14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
доцент,
Бедулева Любовь Викторовна

Ижевск – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1. Вирус иммунодефицита человека и вызываемая им инфекция.....	13
1.2. Гипотезы, объясняющие истощение CD4 ⁺ -лимфоцитов при ВИЧ-инфекции.....	18
1.3. Аутоиммунная гипотеза ВИЧ-индуцированного иммунодефицита	24
1.3.1. Факты в пользу аутоиммунной гипотезы ВИЧ- и ВИО-индуцированного иммунодефицита.....	24
1.3.2. Аутоантитела к CD4 ⁺ Т-лимфоцитам при ВИЧ-инфекции. Механизмы их индукции и действия.....	28
1.4. Антиидиотипические антитела в регуляции аутоиммунных реакций	33
1.4.1. Регуляторный ревматоидный фактор как фактор регуляции аутореактивности.....	33
1.4.2. Антитела против МНС-II как антиидиотипические антитела против аутоантител к CD4.....	36
Глава 2. ОРГАНИЗАЦИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	39
2.1. Организация и материалы исследования.....	39
2.2. Методы исследования.....	41
2.2.1. Иммунизация крыс gp120 гликопротеином ВИЧ-1 и забор крови.....	41
2.2.2. Определение антител к рекомбинантному gp120 гликопротеину ВИЧ-1 методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа.....	42
2.2.3. Определение антител к рекомбинантному CD4 белку крысы методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа.....	43
2.2.4. Определение антител к альфа-цепи HLA-DR методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа.....	44
2.2.5. Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови	

крыс методом проточной цитофлуориметрии.....	45
2.2.6. Определение регуляторного ревматоидного фактора в крови крыс методом пассивной агглютинации танализированных эритроцитов, нагруженных гомологичным IgG.....	46
2.2.7. Влияние плазмы крови крыс, иммунизированных gp120 ВИЧ, на жизнеспособность мононуклеаров <i>in vitro</i>	48
2.3. Статистический анализ результатов.....	49
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	50
3.1. Продукция аутоантител к CD4 и CD4 ⁺ -лимфоцитопения у крыс Wistar, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1.....	50
3.2. Роль регуляторного ревматоидного фактора и антител к альфа-цепи HLA-DR в развитии аутоиммунной реакции, индуцированной gp120 гликопротеином ВИЧ-1.....	60
3.2.1. Роль регуляторного ревматоидного фактора в развитии аутоиммунной реакции, индуцированной gp120 гликопротеином ВИЧ-1.....	60
3.2.2. Антитела к альфа-цепи HLA-DR у крыс в ходе развития аутоиммунной реакции к CD4, индуцированной посредством иммунизации gp120 гликопротеином ВИЧ-1.....	62
3.3. Роль аутоантител к CD4, индуцированных иммунизацией gp120 гликопротеином ВИЧ-1, в гибели CD4 ⁺ -лимфоцитов.....	67
3.4. Механизм гибели CD4 ⁺ -лимфоцитов в крови крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1.....	69
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	79
ВЫВОДЫ.....	82
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	83
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	84
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	85
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	86

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Прогрессивная потеря CD4⁺ Т-лимфоцитов в ходе ВИЧ-инфекции, ведущая к развитию иммунодефицита, не может быть полностью предотвращена существующей антиретровирусной терапией [23]. Причиной невозможности полного восстановления CD4⁺ Т-клеток при ВИЧ-инфекции, особенно в долгосрочной перспективе, является механизм их гибели, необычный для вирусной инфекции. Если еще недавно считалось, что истощение пула CD4⁺ Т-лимфоцитов происходит в результате их инфицирования или действия апоптогенных белков вируса [13, 61, 68], то сегодня ясно, что основную массу гибнущих CD⁺ Т-лимфоцитов составляют неинфицированные клетки [61, 102].

Еще в 90-е годы 20-го века была предложена аутоиммунная гипотеза СПИДа, согласно которой причиной гибели неинфицированных CD4⁺ Т-лимфоцитов и развития иммунодефицита является запускаемая вирусом аутоиммунная реакция против CD4⁺-лимфоцитов [76, 77, 95]. Индукция аутореактивных лимфоцитов, специфичных к CD4⁺ Т-лимфоцитам, происходит через идиотип-антиидиотипические взаимодействия с лимфоцитами против gp120 гликопротеина ВИЧ, активируемыми при инфицировании. Наличие идиотип-антиидиотипических взаимодействий между аутореактивными лимфоцитами против CD4 и лимфоцитами против gp120 ВИЧ является следствием комплементарности между CD4 связывающим доменом gp120 гликопротеина ВИЧ и CD4 молекулой [40, 91, 94]. В пользу аутоиммунной гипотезы получено большое количество фактов. У ВИЧ-инфицированных людей обнаружены аутоантитела и аутореактивные лимфоциты, специфичные к CD4⁺-лимфоцитам, показана их связь с гибелью CD4⁺-лимфоцитов, стадией ВИЧ-инфекции и нечувствительностью ВИЧ-инфицированных больных к антиретровирусной терапии [10, 49, 70, 114]. На моделях ВИО-инфицированных обезьян показано, что прогрессирующее истощение CD4⁺ Т-клеток ассоциировано с наличием сывороточных аутореактивных антител против CD4⁺ Т-клеток, а также с

повышенным количеством CD4⁺ Т-клеток, связавших на своей поверхности IgG [102]. Однако гипотеза не является общепринятой. Среди причин можно назвать противоречивость данных об уровне аутоантител у ВИЧ-инфицированных больных, что возможно связано с отсутствием стандартизированного метода их измерения; отсутствие прямой корреляция между уровнем аутоантител к CD4 и снижением количества клеток; отсутствие описанного в литературе механизма, посредством которого аутореактивные антитела и лимфоциты вызывают гибель CD4⁺-лимфоцитов; а также отсутствие эффективной стратегии предотвращения развития иммунодефицита при ВИЧ-инфекции, основанной на блокировании индукции или подавлении аутоиммунной реакции против CD4⁺ Т-лимфоцитов.

Для получения доказательств аутоиммунной гипотезы СПИДа одним из подходов может быть изучение роли аутоантител против CD4, индуцированных ВИЧ, в условиях, исключающих вклад вируса или его апоптогенных белков в истощение CD4⁺ Т-лимфоцитов. Таким условиям могут удовлетворять экспериментальные модели аутоиммунной реакции против CD4⁺-лимфоцитов, запускаемой не ВИЧ, а gp120 гликопротеином его оболочки.

Аутореактивные лимфоциты в норме находятся под негативным контролем [14, 101], который предотвращает развитие агрессивных аутоиммунных реакций, сопровождающихся клиническими проявлениями. Специфический контроль над лимфоцитами в организме осуществляют Т-регуляторные клетки [131, 196], В-регуляторные клетки [121, 154], а также антиидиотипические антитела [31, 39, 42, 51, 85], в частности, регуляторный ревматоидный фактор (регРФ) – естественные антиидиотипические антитела, характеризующиеся наличием общего паратопа, специфичного к конформерам Fc фрагментов IgG, функцией которых является сдерживание экспансии активированных CD4⁺ Т-лимфоцитов [24, 123, 163, 172, 173]. Если рассматривать ВИЧ-индуцированный иммунодефицит как результат развития аутоиммунной реакции против CD4⁺ Т-лимфоцитов, то необходимо проверить, находится ли данная аутоиммунная реакция под контролем регуляторного ревматоидного фактора. Другие антиидиотипические антитела к

аутореактивным лимфоцитам против CD4, например, антитела к МНС-II [19, 76], тоже могут быть факторами регуляции аутоиммунной реакции против CD4.

Таким образом, выяснение причины и механизма гибели незараженных CD4⁺ Т-лимфоцитов при ВИЧ-инфекции остается актуальным вопросом, решение которого может позволить найти более эффективные средства профилактики и терапии ВИЧ-инфекции/СПИДа.

Цель исследования

Изучение роли аутоантител к CD4, индуцируемых gp120 гликопротеином ВИЧ-1, в гибели CD4⁺ Т-лимфоцитов у крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1, а также механизма регуляции продукции аутоантител к CD4, вызываемой gp120 гликопротеином ВИЧ-1.

Задачи исследования

1. Изучить возможность индукции аутоиммунной реакции против CD4 и развития CD4⁺-лимфоцитопении у крыс Wistar посредством их иммунизации gp120 гликопротеином ВИЧ-1.

2. Выяснить, участвуют ли регуляторный ревматоидный фактор и антитела к HLA-II в регуляции иммунного ответа, вызываемого gp120 гликопротеином ВИЧ-1 у крыс Wistar.

3. Исследовать роль аутоантител к CD4 в гибели неинфицированных CD4⁺-лимфоцитов у крыс Wistar, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1.

4. Выяснить механизм гибели неинфицированных CD4⁺-лимфоцитов у крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1.

Методология и методы исследования

Методология исследования спланирована с учетом современных принципов научного познания и организована адекватно поставленной цели. Проверка аутоиммунной гипотезы СПИДа, согласно которой истощение CD4⁺-лимфоцитов вызывает не вирус, а запускаемые им аутоантитела к CD4, на ВИЧ-

инфицированных людях или ВИО-инфицированных обезьянах затруднена, так как не позволяет дифференцировать вклад вируса и его белков от вклада аутоантител к CD4 в гибель CD4⁺-лимфоцитов. Для решения этой проблемы была исследована возможность создания крысиной неинфекционной экспериментальной модели аутоиммунной реакции против CD4, запускаемой gp120 гликопротеином ВИЧ-1. Для индукции аутоиммунной реакции против CD4⁺-лимфоцитов, использовали иммунизацию крыс gp120 гликопротеином ВИЧ-1, который, как известно, индуцирует аутоиммунную реакцию к CD4 у ВИЧ-инфицированных людей. В работе были использованы различные иммунологические, иммунохимические методы, методы выделения и культивирования клеток, а также статистические методы. Аутоантитела к CD4 определяли методом иммуноферментного анализа, количество CD4⁺-лимфоцитов в крови методом проточной цитофлуориметрии. Влияние аутоантител к CD4 на CD4⁺-лимфоциты было изучено *in vivo* и *in vitro*. Была также исследована кинетика регуляторного ревматоидного фактора и антител к МНС-II у крыс, иммунизированных gp120 ВИЧ-1, так как специфичность регуляторного ревматоидного фактора и антител к МНС-II позволяет ожидать наличие у данных антител регуляторных свойств в отношении аутореактивных лимфоцитов, специфичных к CD4.

Степень достоверности, апробация результатов

Результаты получены с помощью стандартизованных методов, на выборках достаточного объема, воспроизведены в нескольких сериях экспериментов. Для оценки достоверности выявленных различий использованы адекватные статистические критерии. Результаты экспериментов анализировались и сопоставлялись с известными экспериментальными данными других исследователей. Сформулированные в диссертации научные положения и выводы согласуются с известными фактами, обоснованы теоретическими решениями и экспериментальными данными, полученными в работе, и не противоречат известным положениям иммунологии.

Диссертационная работа апробирована на заседании кафедры иммунологии и клеточной биологии института естественных наук ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет» (протокол №8 от 23.06.2020).

Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на XLIII и XLVII итоговых студенческих научных конференциях (Ижевск, 2015, 2019), XV и XVI Всероссийских научных форумах с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2015, 2017), XII конференции иммунологов Урала (Пермь, 2015), Первой междисциплинарной конференции «Аутоиммунные и иммунодефицитные заболевания» (Москва, 2016), VIII Ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням с международным участием (Москва, 2016).

Личный вклад автора

Формулировка основной идеи, планирование научной работы, включая формулировку рабочей гипотезы, определение методологии диссертационного исследования, а также интерпретация и анализ полученных результатов, представление результатов в научных публикациях проводились диссертантом совместно с научным руководителем. Цель, задачи и дизайн исследования сформулированы и разработаны автором самостоятельно. Анализ, систематизация, обобщение литературы по изучаемой проблеме проведены диссертантом самостоятельно. Экспериментальные исследования проводились соискателем самостоятельно. Статистическая обработка данных, оформление рукописи диссертации, представление результатов в виде докладов на конференциях осуществлялись соискателем лично.

Положения, выносимые на защиту

1. Продукция аутоантител к CD4, сопровождающаяся CD4⁺-лимфоцитопенией у крыс Wistar, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1, является неинфекционной экспериментальной моделью аутоиммунной CD4⁺-лимфоцитопении, возникающей при ВИЧ-инфекции.

2. Гибель неинфицированных CD4⁺-лимфоцитов у крыс Wistar, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1, является результатом совместного действия аутоантител против CD4 и регуляторного ревматоидного фактора.

Научная новизна исследования

Впервые показано, что иммунизация gp120 гликопротеином ВИЧ-1 вызывает у крыс Wistar продукцию аутоантител к CD4, сопровождающуюся развитием CD4⁺-лимфоцитопении. Развивающаяся аутоиммунная CD4⁺-лимфоцитопения у крыс Wistar, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1, является новой экспериментальной моделью аутоиммунной CD4⁺-лимфоцитопении, запускаемой ВИЧ у человека. Аутоиммунная CD4⁺-лимфоцитопения крыс Wistar возникает в ответ на иммунизацию антигеном ВИЧ, без инфицирования животных, поэтому, в отличие от существующих инфекционных экспериментальных моделей CD4⁺ Т-лимфоцитопении, впервые однозначно демонстрирует ключевую роль аутоантител против CD4, индуцируемых ВИЧ, в гибели CD4⁺-лимфоцитов при ВИЧ-инфекции.

Впервые показана роль антител против МНС-II в регуляции продукции аутоантител против CD4, индуцируемых иммунизацией gp120 гликопротеином ВИЧ-1. Изучена роль регуляторного ревматоидного фактора – аутоантител, сдерживающих агрессивные аутоиммунные реакции в норме - в развитии иммунного ответа против gp120 гликопротеина ВИЧ-1. Показано, что регуляторный ревматоидный фактор не участвует в регуляции иммунного ответа против gp120 гликопротеина ВИЧ-1 и не контролирует развитие аутоиммунной реакции против CD4 у крыс.

Представлена новая гипотеза о механизме гибели неинфицированных CD4⁺-лимфоцитов при ВИЧ-инфекции. Согласно данной гипотезе гибель CD4⁺-лимфоцитов является результатом совместного действия аутоантител к CD4, индуцируемых gp120 гликопротеином ВИЧ-1, и регуляторного ревматоидного фактора, естественно присутствующего в крови.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Теоретическая значимость настоящего исследования заключается в получении новых данных, проясняющих иммунопатогенез ВИЧ-инфекции у человека. Факт развития CD4⁺-лимфоцитопении у крыс Wistar на фоне продукции аутоантител к CD4, индуцированных иммунизацией gp120 гликопротеином ВИЧ-1, в отсутствие ВИЧ-инфекции, подтверждает аутоиммунную гипотезу истощения CD4⁺ Т-лимфоцитов при ВИЧ-инфекции у людей и поднимает вопрос о профилактике и лечении ВИЧ-инфекции как аутоиммунного заболевания, вызываемого вирусной инфекцией.

Представленная гипотеза о механизме гибели неинфицированных CD4⁺-лимфоцитов при ВИЧ-инфекции, согласно которой регуляторный ревматоидный фактор является кофактором цитопатического действия аутоантител к CD4, объясняет молекулярно-клеточный механизм цитопатического действия аутоантител к CD4 на CD4⁺ Т-лимфоциты при ВИЧ-инфекции, а также конкретизирует современную гипотезу активационно-индуцированной гибели CD4⁺ Т-лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных людей.

Полученная экспериментальная модель аутоиммунной CD4⁺-лимфоцитопении крыс, запускаемая иммунизацией gp120 гликопротеином ВИЧ-1, расширяет знания о патогенезе ВИЧ-инфекции, а именно, о механизме индукции аутоантител к CD4, механизмах истощения неинфицированных CD4⁺-лимфоцитов при ВИЧ-инфекции. Практическая значимость настоящего исследования заключается в возможности использования новой неинфекционной экспериментальной модели аутоиммунной CD4⁺-лимфоцитопении крыс для испытания эффективности новых анти-ВИЧ вакцин и средств лечения ВИЧ-инфекции, основанных на принципиально новом подходе – предотвращении или подавлении развития аутоиммунной реакции к CD4⁺-лимфоцитам, запускаемой gp120 гликопротеином ВИЧ-1.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены в учебный процесс, в курсы «Иммунология», «Клиническая иммунология», «Экспериментальные модели

иммунопатологий», в темы магистерских диссертаций, дипломных, курсовых работ, в тематику НИОКР кафедры иммунологии и клеточной биологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», в НИР научной лаборатории молекулярной и клеточной иммунологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет».

Конкурсная поддержка исследования.

Часть исследования выполнена в рамках научного проекта, выполняемого коллективами научных лабораторий образовательных организаций высшего образования, подведомственных Минобрнауки России, по государственному заданию в сфере науки (проект № 0827-2020-0012, государственное задание № 075-00232-20-01, тема «Разработка терапевтической вакцины, на основе конформеров Fc фрагментов IgG человека для лечения аутоиммунных заболеваний», 02.09.19-01.09.23).

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 11 научных работ общим объемом 3 печатных листа, в том числе 3 статьи в зарубежных научных изданиях, индексируемых в базах данных научного цитирования Web of Science, Scopus, 5 публикаций (тезисы) в научных журналах и изданиях, которые включены в перечень российских рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертаций, 1 статья в сборнике статей всероссийской конференции, а также 2 публикации (тезисы) опубликованы в материалах вузовских конференций.

Объем и структура диссертации

Работа изложена на 107 страницах, состоит из введения, обзора литературы, описания организации, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов. Список литературы включает

202 источника, среди которых 9 отечественных и 193 иностранных. Работа иллюстрирована 17 рисунками, 1 таблицей.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Вирус иммунодефицита человека и вызываемая им инфекция

Первые случаи СПИДа были описаны в начале 1980х годов [66]. В 1983 году был выделен возбудитель заболевания, названный в 1986 году вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) [22, 64, 104, 105]. ВИЧ относится к семейству ретровирусов (Retroviridae), роду лентивирусов (Lentivirus). Геном ВИЧ состоит из двух идентичных копий одноцепочечных молекул РНК и характеризуется наличием структурных (*gag*, *pol*, *env*) и регуляторных (*tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr*, *vpu*) генов. Ген *gag* кодирует структурные белки капсида (p24, p7, p6, p17), ген *env* кодирует гликопротеины вирусной оболочки - gp120 и gp41 - которые распознают рецепторы на поверхности клетки-хозяина, ген *pol* кодирует ферменты, необходимые для репликации вируса: обратную транскриптазу, интегразу и протеазу (рисунок 1.1) [5, 7].

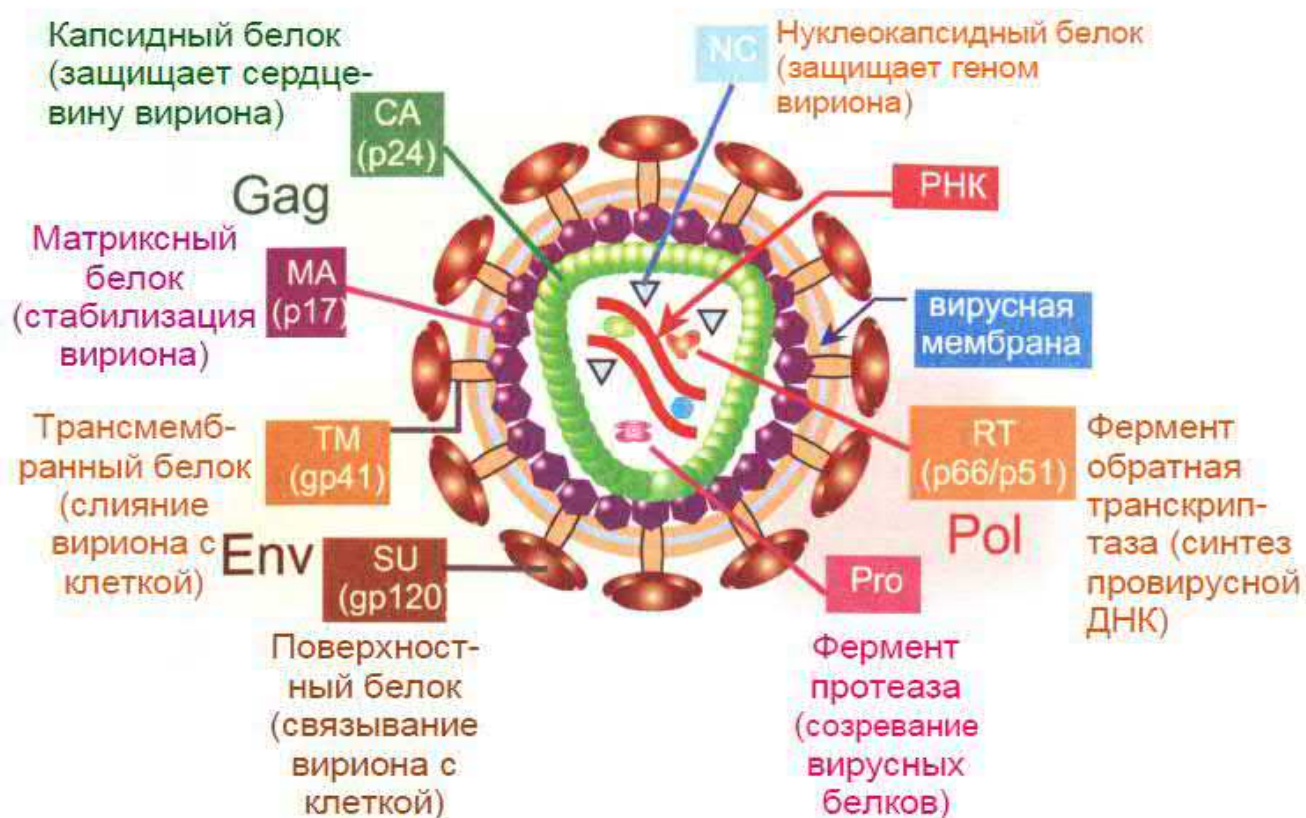


Рисунок 1.1. - Строение ВИЧ [4].

ВИЧ имеет сферическую форму с конусообразной сердцевиной (капсидом). Вирусные частицы окружены мембраной, содержащей гетеродимерные комплексы, состоящие из тримеров gp120 гликопротеина и мономера gp41 гликопротеина, которые отвечают за связывание вируса на поверхности клетки хозяина и проникновение генетического материала вируса в клетку [53, 145]. Именно эти гликопротеины в первую очередь являются мишенью иммунного ответа организма хозяина.

Жизненный цикл ВИЧ начинается со связывания gp120 гликопротеина с D1-доменом молекулы CD4 (рисунок 1.2) [17, 45, 84]. CD4 гликопротеин (58 кДа) экспрессируется на поверхности около 60% циркулирующих Т-лимфоцитов, предшественников Т-клеток в костном мозге и тимусе, моноцитов/макрофагов, эозинофилов, дендритных клеток и клеток микроглии [7, 56]. После взаимодействия с CD4 молекула gp120 претерпевает необратимые конформационные изменения, в результате которых приобретает способность связываться с хемокиновыми рецепторами – CXCR4 или CCR5 [37, 53, 109, 151], после чего происходит слияние оболочки вируса с клеточной мембраной и проникновение в клетку вирусного капсида. Чаще всего ВИЧ-инфекция вызывается вирусными вариантами, использующими CCR5 рецептор, CXCR4-тропные вирусы обычно появляются на поздних этапах инфекции и ассоциированы с повышенной патогенностью и прогрессированием заболевания [167].

В клетке на матрице РНК с помощью собственного фермента вируса - обратной транскриптазы - синтезируется двухцепочечная ДНК вируса. В ходе этого процесса могут быть созданы родственные, но различные вирусные варианты, поскольку обратная транскриптаза подвержена ошибкам и не имеет функции исправления ошибок [145, 167]. Синтезированная ДНК вируса затем с помощью интегразы встраивается в геном клетки хозяина. В результате транскрипции генов вируса и трансляции мРНК вируса синтезируются вирусные белки, которые вместе с геномной РНК перемещаются к внутренней стороне клеточной мембраны, где происходит сборка нуклеокапсида ВИЧ [145, 167].

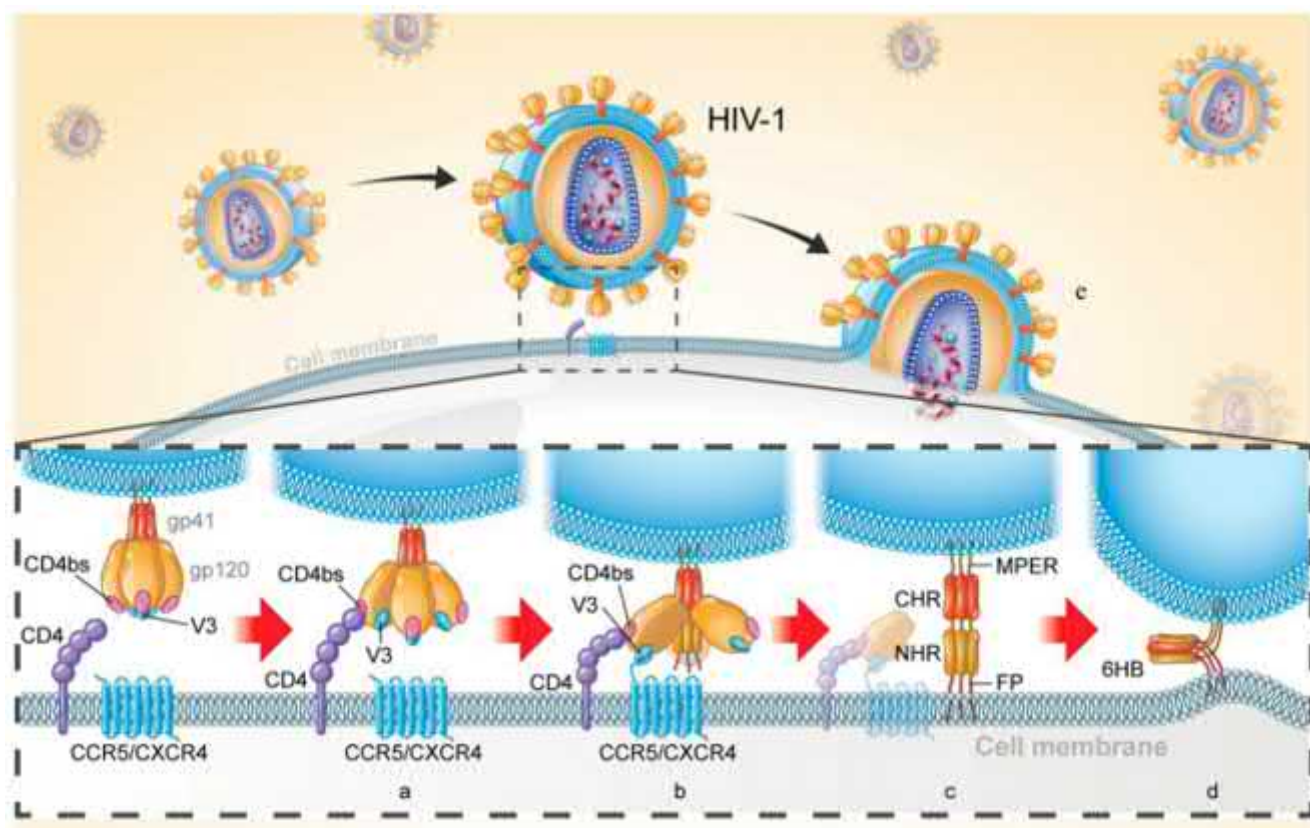


Рисунок 1.2 - Схема проникновения ВИЧ-1 в CD4⁺-клетку. (a) – связывание gp120 гликопротеина и рецептором CD4; (b) – связывание gp120 гликопротеина с корецептором CCR5/CXCR4; (c) – конформационные изменения комплекса gp120-gp41, приводящие к связыванию вируса с клеточной мембраной; (d) – образование шестиспирального пучка (6HB), формирующего пору для слияния; (e) – проникновение генома ВИЧ внутрь клетки [145].

В процессе размножения вирус может также включить в свою мембрану различные белки мембраны клетки-хозяина, такие как HLA I и II класса, и белки адгезии, такие как ICAM-1 [30]. Вирус размножается только в активированных клетках, покоящиеся клетки могут содержать в себе интегрированную ДНК вируса и являться резервуарами вируса [69].

После проникновения ВИЧ в организм развивается острая лихорадочная фаза, которая может длиться до 3 месяцев и даже года, характеризуется высокой вирусемией, повышением уровня специфических ВИЧ цитотоксических лимфоцитов, значительным снижением количества CD4⁺ Т-лимфоцитов в крови, острым

ретровирусным синдромом (гриппоподобное состояние) [7, 13]. После острой стадии развивается длительная латентная (бессимптомная фаза), характеризующаяся медленным прогрессирующим снижением количества CD4⁺ Т-клеток, медленным увеличением вирусемии, продукцией антител против белков вируса, системной иммунной активацией и отсутствием клинических симптомов (может длиться от 2-3 до 10 лет) [7, 104]. При снижении количества CD4⁺ Т-лимфоцитов в крови меньше 500 кл/мкл начинают развиваться первые признаки иммунодефицита, дальнейшее прогрессирование приводит к развитию СПИДа – терминальной стадии ВИЧ-инфекции – характеризующейся снижением количества CD4⁺ Т-лимфоцитов менее 200 кл/мкл крови, развитием тяжелых оппортунистических инфекций и злокачественных опухолей, приводящих к смерти [13, 167].

На основе полученных данных об этапах размножении ВИЧ в клетке созданы и активно применяются в клинике антиретровирусные препараты, блокирующие тот или иной этап жизненного цикла вируса (ингибиторы проникновения вируса в клетку, нуклеозидные, нуклеотидные и ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы, ингибиторы интегразы, ингибиторы протеазы) [8]. Антиретровирусная терапия сегодня базируется на пожизненном применении трех видов препаратов, что приводит к значительному снижению вирусемии и увеличению продолжительности жизни пациента [187]. Однако, существуют ограничения АРВТ: не удается полностью избавиться от вируса (ВИЧ остается в латентных резервуарах), развиваются серьезные токсические эффекты после длительного применения препаратов, может возникать резистентность вируса к препарату [50, 112, 122]. Кроме того, остаются люди, нечувствительные к терапии: несмотря на эффективное подавление вирусемии с помощью АРВТ, примерно у трети ВИЧ-инфицированных людей продолжает снижаться количество CD4⁺-лимфоцитов в крови [23].

Основной целью борьбы с ВИЧ является создание вакцины, которая бы индуцировала гуморальный и/или клеточный иммунный ответ против всех типов ВИЧ и полностью бы защищала человека от инфицирования. Поиск вакцины

против ВИЧ начался вскоре после открытия вируса, однако, только в одном из шести уже проведенных испытаний эффективности кандидатных вакцин против ВИЧ удалось добиться небольшой эффективности [3, 79]. Испытанная в Тайланде вакцина RV144, состоящая из вектора ALVAC-HIV (vCP1521) и рекомбинантной субъединичной вакцины на основе гликопротеина 120 (AIDSVAX B/E), направленная на индукцию гуморального и клеточного иммунного ответа против ВИЧ, привела к снижению риска инфицирования лишь на 31,2%, однако защитный ответ оказался неустойчивым и начал снижаться уже через 6 месяцев после вакцинации [148].

Сейчас большинство исследований по разработке вакцины против ВИЧ сфокусированы на поиске антигена, который бы индуцировал продукцию нейтрализующих антител широкого спектра действия [2, 3, 79, 155] и ненейтрализующих антител, основным механизмом действия которых может является индукция антитело-зависимой клеточной цитотоксичности [60]. В качестве наиболее предпочтительной мишени для нейтрализующих антител широкого спектра действия рассматривают CD4-связывающий сайт на gp120, область V1/V2 петель gp120, гликаны на gp120 и MREP-кластер (мембрано-проксимальная область) на gp41 (наиболее консервативный участок оболочки ВИЧ) [4, 141, 168]. Однако, разработка такой вакцины имеет свои трудности, и не известно, приведет ли к успеху.

В качестве основных причин, сдерживающих разработку эффективных средств лечения и профилактики ВИЧ-инфекции, рассматривают: высокую частоту мутаций вируса, способность ВИЧ уклоняться от иммунного ответа хозяина, наличие латентных вирусных резервуаров – пула клеток, содержащих транскрипционно неактивные, но способные к репликации провирусы ВИЧ, а также неясность механизмов глубокого истощения неинфицированных ВИЧ CD4⁺-лимфоцитов [5, 7, 58, 71, 167].

Таким образом, ВИЧ-инфекция является медленно прогрессирующим заболеванием с продолжительным инкубационным периодом и неизбежным летальным исходом, вызванным оппортунистическими инфекциями и

онкологическими заболеваниями, развивающимися в результате иммунодефицита, являющегося следствием постепенного глубокого истощения CD4⁺ Т-лимфоцитов. Много не ясного остается в вопросах патогенеза ВИЧ-инфекции. Существующая сегодня таргетная антиретровирусная терапия не позволяет предотвратить прогресс ВИЧ-инфекции и развитие СПИДа, а многочисленные попытки создать вакцину в течение нескольких десятков лет не увенчались пока успехом. Эти факты указывают на то, что необходимо дальнейшее изучение механизмов патогенеза ВИЧ-инфекции, а также наводят на мысль, что наряду со стандартными методами, направленными на борьбу против вируса (антиретровирусные препараты, нейтрализующие антитела), необходимо применение новых подходов к разработке вакцины и терапии от ВИЧ.

1.2. Гипотезы, объясняющие истощение CD4⁺-лимфоцитов при ВИЧ-инфекции

Основные клетки, поражаемые ВИЧ – это CD4⁺ Т-лимфоциты [45, 56]. В связи с регуляторной ролью CD4⁺ Т-лимфоцитов (Т-хэлперов) в развитии иммунного ответа, снижение их количества и нарушение функциональной активности приводит к развитию дефицита как гуморального, так и клеточного звена иммунной системы [13, 65]. Поэтому без понимания причины постепенного и глубокого истощения CD4⁺ Т-лимфоцитов при ВИЧ-инфекции невозможна разработка эффективных стратегий лечения и профилактики ВИЧ-инфекции.

В первые годы после открытия ВИЧ думали, что истощение CD4⁺-лимфоцитов вызвано прямым цитопатическим действием вируса на продуктивно инфицированные CD4⁺ Т-клетки [13, 45]. Тем не менее, количество инфицированных CD4⁺ Т-клеток оказалось недостаточным, чтобы объяснить массовую гибель CD4⁺ Т-клеток в ходе ВИЧ-инфекции. Количество апоптотических клеток в крови ВИЧ-инфицированных людей значительно превышает количество ВИЧ-инфицированных клеток [61]. На модели SHIV-инфицированных обезьян (SHIV - химерный вирус иммунодефицита обезьян и человека) показано, что основной вклад в истощение CD4⁺-лимфоцитов вносит

гибель неинфицированных CD4⁺ Т-клеток [120]. На моделях трансгенных мышей, экспрессирующих CD4 человека и/или HLA, показано, что иммунизация gp120 гликопротеином приводит к истощению CD4⁺-лимфоцитов как в крови, так и в лимфоидных органах, в отсутствие вируса [88, 188]. В пользу того, что прямой киллинг CD4⁺ Т-лимфоцитов не является главным механизмом истощения CD4⁺ Т лимфоцитов при ВИЧ-инфекции служит также факт, что иммунодефицит не развивается у ВИЧ-инфицированных шимпанзе, несмотря на высокую цитопатогенность вируса *in vitro* [191], а также у ВИО-инфицированных мангобеев, несмотря на хронически высокий уровень вiremии [164]. Кроме того, показано, что ВИЧ защищает инфицированные клетки от апоптоза, и повышает чувствительность к апоптозу неинфицированных лимфоцитов [68], т.е. в независимости от цитопатического действия ВИЧ апоптоз затрагивает в основном неинфицированные клетки [62].

В качестве основного молекулярного механизма гибели CD4⁺-лимфоцитов при ВИЧ-инфекции рассматривают апоптоз [13, 20, 61, 67]. Апоптоз – это форма запрограммированной клеточной гибели. Один из путей инициации - связывание лигандов FasL, TNF и TRAIL/Apo-2 с соответствующими им рецепторами смерти Fas/CD95, TNFR1, DR4 и DR5 [61]. У ВИЧ-инфицированных пациентов обнаруживается повышенный уровень растворимых или мембраносвязанных молекул Fas, FasL, TRAIL, DR5 в крови и в лимфоидных тканях по сравнению с неинфицированными донорами [74, 75, 130]. Многочисленные исследования сообщают о связи между повышенным уровнем апоптоза лимфоцитов крови ВИЧ-инфицированных больных и истощением CD4⁺-лимфоцитов [67, 72, 125, 140, 171]. Также на животных моделях показано, что патогенная ВИО-инфекция у макак характеризуется повышенным апоптозом, который отсутствует при непатогенной ВИО-инфекции [43, 126, 164], и при заражении обезьян химерным ВИЧ/ВИО вирусом наблюдается корреляция между уровнем апоптоза и снижением числа CD4⁺-лимфоцитов [81, 147].

Причины повышенного уровня апоптоза CD4⁺-лимфоцитов при ВИЧ-инфекции активно обсуждаются. Рассматривают следующие механизмы

апоптотической гибели неинфицированных CD4⁺-клеток: 1) гибель клеток под действием проапоптотических вирусных белков, высвобождаемых инфицированными клетками [20, 80, 83, 107]; 2) измененная экспрессия молекул, отвечающих за регуляцию апоптоза, на лимфоцитах и антиген-презентирующих клетках, как следствие ВИЧ-опосредованной иммунной активации (активационно-индуцированная гибель) [61, 68, 150].

Показано, что продукты генов *env*, *nef* и *tat* могут индуцировать апоптоз незараженных ВИЧ клеток [61]. Белки ВИЧ могут запускать различные механизмы клеточной гибели. Перекрестное сшивание CD4⁺ Т-клеток под действием gp120 гликопротеина приводит к активации CD95/CD95L пути [21]. Индуцированное *env* белками образование синцития приводит к апоптозу через сложную сигнальную цепь [136]. *Nef*-экспрессирующие Т-клетки экспрессируют также CD95L, что делает их потенциальными «убийцами» неинфицированных CD95-экспрессирующих клеток [200]. *Tat* повышает экспрессию CD95/CD95L на неинфицированных клетках и повышает чувствительность к CD95-индуцированному апоптозу [107, 192]. Внеклеточные продукты гена *Nef* приводят к апоптозу CD4⁺ Т-клеток в результате взаимодействия с CXCR4 рецептором [80, 83]. Все вышеперечисленные факты получены в экспериментах *in vitro*, какой вклад в истощение неинфицированных CD4⁺-лимфоцитов вносит проапоптотическая активность белков ВИЧ в условиях *in vivo*, не ясно.

В качестве причины повышенного уровня апоптоза при ВИЧ-инфекции рассматривают системную иммунную активацию, которая наряду с истощением CD4⁺ Т-лимфоцитов является характерным признаком ВИЧ-инфекции [6, 128, 169]. Уровень иммунной активации является лучшим прогностическим показателем развития СПИДа и зависит от вирусной нагрузки [52, 65, 73, 198]. При ВИЧ-инфекции в отсутствие лечения наблюдаются повышенные уровни провоспалительных цитокинов, сывороточных маркеров воспаления, высокий оборот Т-клеток, повышенный уровень активации и пролиферации Т-клеток (как CD4⁺, так и CD8⁺), активация NK-клеток, причем, уровень их активации возрастает с прогрессированием болезни [9, 61]. В качестве причин системной

иммунной активации рассматривают: одноцепочечную РНК ВИЧ и его промежуточные ДНК продукты, коинфицирующие агенты, гомеостатические механизмы, связанные с развитием лимфопении, микробную транслокацию из кишечника [6, 9, 128].

Интересно, что ВИЧ-2 инфекция характеризуется более медленным прогрессированием, более низкой вирусной нагрузкой, и более высоким уровнем $CD4^+$ Т-клеток, по сравнению с ВИЧ-1 инфекцией [118]. Тем не менее, цитопатогенные свойства ВИЧ-2 для $CD4^+$ -лимфоидных клеток человека не ниже, чем цитопатогенные свойства ВИЧ-1 [159]. Ярким отличием между двумя вирусными подтипами является то, что уровень иммунной активации ниже в случае ВИЧ-2 инфекции, по сравнению с ВИЧ-1 инфекцией [71, 170].

Инфицирование макак-резус вирусом иммунодефицита обезьян приводит к прогрессирующему истощению $CD4^+$ Т-клеток, при этом у ВИО-инфицированных макак наблюдается повышенный уровень иммунной активации, измеренный по количеству $Ki-67^+CD4^+$ Т-клеток, уровню ЛПС и CD14 (один из основных маркеров активации моноцитов) в плазме [102]. Непатогенность ВИЧ-1 у шимпанзе ассоциирована с отсутствием иммунной активации и очень низким уровнем спонтанного Т-клеточного апоптоза [67].

Хроническая иммунная активация приводит к повышенному уровню циркуляции Т-клеток, в результате чего повышается пролиферация Т-клеток, которая физиологически контролируется повышением уровня апоптоза [20, 71, 128]. В то время как активация зрелых покоящихся периферических Т-лимфоцитов приводит к их пролиферации, ранее активированные Т-клетки после повторного активационного сигнала будут подвергаться апоптозу – механизм, известный как активационно-индуцированная гибель. [57]. Ряд авторов считают, что активационно-индуцированная клеточная гибель, представляющая собой апоптотический процесс элиминации активированных Т-клеток во время терминальной стадии иммунного ответа, является основным механизмом истощения неинфицированных $CD4^+$ Т-лимфоцитов [13, 61]. Молекулярные

механизмы этого процесса зависят от экспрессии лигандов суперсемейства TNF и их рецепторов, таких как Fas/FasL и TRAIL-DR5 [13, 61].

Помимо апоптоза относительно недавно начали рассматривать другую форму запрограммированной гибели клеток в качестве возможной причины истощения CD4⁺-лимфоцитов при ВИЧ-инфекции, названную пироптозом. Пироптоз, в отличие от апоптоза, представляет собой воспалительную форму запрограммированной гибели клеток, при которой гибнущие клетки высвобождают их цитоплазматическое содержимое, в том числе воспалительные цитокины, во внеклеточное пространство [58, 135]. G. Doitsh и соавторы изучали механизм гибели CD4⁺ Т-клеток во время ВИЧ-инфекции *ex vivo* в культуре лимфоидных агрегатов человека, образованной свежими тканями миндалин или селезенки человека. Исследователи обнаружили, что инфицирование этой культуры ВИЧ-1 приводит к огромной потере CD4⁺ Т-клеток, но лишь 5% из них представляют собой продуктивно инфицированные ВИЧ клетки, более 95% гибнущих клеток – это рядом расположенные клетки, которые находятся в состоянии покоя [58]. Предполагается, что такие клетки abortивно инфицированы ВИЧ, т.е. ВИЧ связывается и проникает в эти клетки, но, в следствие того, что они находятся в состоянии покоя, жизненный цикл вируса ослабляется на стадии элонгации обратной транскрипции, что приводит к увеличению количества неполных вирусных транскриптов ДНК в цитоплазме. Накопленные в клетке неполные транскрипты ДНК ВИЧ распознаются факторами врожденной иммунной системы, что приводит к сборке инфламасом, активации каспазы-1, и в конечном итоге гибели клетки [58, 135]. Интересно, что полученные из крови CD4⁺ Т-лимфоциты оказались высоко устойчивыми к индуцируемой ВИЧ пироптотической гибели [135]. Факты в пользу пироптотической гибели CD4⁺-лимфоцитов при ВИЧ-инфекции обнаружены с помощью культуры лимфоидных тканей человека, какой вклад данный вид клеточной гибели вносит в истощение CD4⁺-лимфоцитов в условиях *in vivo*, не ясно.

Вклад в гибель неинфицированных CD4⁺-лимфоцитов может также вносить антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ). АЗКЦ обусловлена

взаимодействием между Fc-областью иммуноглобулинов и Fc-рецепторами (FcR), присутствующими на клетках различного типа. АЗКЦ происходит, когда антитело образует мостик между клеткой-мишенью, несущей на своей поверхности чужеродные антигены, и эффекторной клеткой, обычно NK-клеткой, экспрессирующей FcR [183]. Сшивание FcR инициирует каскад сигналов, приводящих к высвобождению литических соединений из эффекторной клетки, что в конечном итоге приводит к лизису клетки-мишени [183].

Показано, что присутствующие в крови ВИЧ-инфицированных людей антитела к gp120 могут индуцировать АЗКЦ неинфицированных CD4 T-клеток, связавших gp120, секретируемый рядом расположенными ВИЧ-инфицированными лимфоцитами [116, 149]. Lisco A. и соавторы обнаружили, что аутоантитела против CD4⁺-лимфоцитов вызывают антитело-зависимую клеточную цитотоксичность у ВИЧ-инфицированных людей, у которых наблюдается прогрессирующее снижение количества CD4⁺-лимфоцитов на антиретровирусную терапию [110]. Также Z. Luo и соавторы показали, что аутоантитела против CD4, выделенные из крови ВИЧ-инфицированных людей, нечувствительных к АРВТ, индуцируют активацию и цитотоксичность NK-клеток *in vitro* и могут опосредовать гибель CD4⁺ T-клеток через АЗКЦ [114]. Однако, относительный вклад данного механизма гибели клеток в прогрессирующее истощение CD4⁺-лимфоцитов при ВИЧ-инфекции, остается неясным. Кроме того, обнаруживают и положительную роль АЗКЦ в защите от вируса [106, 129].

Таким образом, существуют различные гипотезы, объясняющие механизм гибели CD4⁺ T-лимфоцитов при ВИЧ-инфекции. Однако, наиболее обоснованной теоретическими и экспериментальными данными является гипотеза активационно-индуцированной клеточной гибели, согласно которой основной причиной истощения CD4⁺-лимфоцитов и развития иммунодефицита при ВИЧ-инфекции является повышенный уровень иммунной активации, который приводит к апоптозу. Тем не менее, до конца не ясно, какой фактор приводит к избыточной активации лимфоцитов и по какому механизму затем гибнет такая активированная клетка.

1.3. Аутоиммунная гипотеза ВИЧ-инфицированного иммунодефицита

1.3.1. Факты в пользу аутоиммунной гипотезы ВИЧ- и ВИО-индуцированного иммунодефицита

Еще до открытия возбудителя СПИД рассматривали как аутоиммунное заболевание [144]. У ВИЧ-инфицированных больных часто наблюдают аутоиммунные патологии такие, как системная красная волчанка, антифосфолипидный синдром, аутоиммунная тромбоцитопения, васкулит, полимиозит, болезнь Грейвса и другие, причем до возникновения иммунодефицита: во время острой стадии ВИЧ-инфекции, во время хронической стадии, но когда CD4⁺-клеток больше 200 в мкл крови, а также во время антиретровирусной терапии [197].

В крови ВИЧ-инфицированных людей обнаруживается повышенный уровень аутоантител против различных аутоантигенов - CD4, TCR, МНС кардиолипина, денатурированной ДНК и др. [92, 98, 117, 133, 165, 197] - ассоциированный с низким количеством CD4⁺ Т-лимфоцитов и повышенной смертностью [119]. Помимо аутоантител, обнаруживается повышенный уровень цитотоксических лимфоцитов, способных убивать собственные CD4⁺-клетки [10, 33, 70, 199], их наличие также ассоциировано с истощением CD4⁺-лимфоцитов и прогрессированием заболевания [33, 70].

Рассматриваются различные гипотезы механизмов индукции патологических аутоиммунных реакций при ВИЧ-инфекции:

1. Продукция аутоантител может быть обусловлена гомологией между белками ВИЧ и аутоантигенами [165, 179]. ВИЧ инфекция через механизм молекулярной мимикрии может индуцировать нарушение регуляции иммунной системы, приводящее к развитию аутоиммунных реакций. F. Silvestris и соавторы обнаружили мимикрию между env-белками ВИЧ и молекулами HLA, Fas, TCR, IgG, IgA [165]. С. J. Carter показал, что поверхностные белки ВИЧ гомологичны 22 аутоантигенам, ассоциированным со СПИДом: Т-клеточному рецептору, CD4, CD95, IgG и др. [34]. R. Root-Bernstein обнаруживает высокую степень гомологии между ВИЧ и Т-клеточным рецептором человека, и предполагает, эта гомология

создает высокую вероятность индукции антилимфоцитарного аутоиммунитета при развитии иммунного ответа на ВИЧ [152].

2. Известно, что в ходе созревания ВИЧ включает в свою оболочку белки клетки хозяина, такие как CD4, МНС, молекулы адгезии и другие [30]. Этот процесс может сопровождаться изменением их нативной структуры, что приведет к распознаванию собственных белков иммунной системой как чужеродных и, соответственно к генерации аутоантител или аутореактивных цитотоксических лимфоцитов против таких аутоантигенов [16].

3. Некоторые авторы предполагают, что развитие аутоиммунных реакций при ВИЧ-инфекции может быть следствием нарушения гомеостаза Т-клеток. Истощение CD4⁺ Т-лимфоцитов может приводить к гомеостатической экспансии Т-клеток с повышением их пролиферации, что приводит к нарушению естественной толерантности и генерации аутоантител и/или аутореактивных цитотоксических лимфоцитов [16, 29, 80].

4. Аутоиммунитет может быть следствием нарушения регуляции иммунной сети, вызванной иммунным ответом на ВИЧ [44, 76, 85, 95, 177]. Теория регуляторной сети в иммунной системе, основанной на идиотип-антиидиотипических взаимодействиях, была постулирована N.K. Jerne [85]. В модели иммунной сети N.K. Jerne антигены (эпитопы) распознаются рецепторами лимфоцитов (идиотопами), эти идиотопы, являясь сами антигенами, распознаются другими лимфоцитами (анти-идиотопами) [85]. Теория идиотип-антиидиотипических сетевых взаимодействий объясняет, каким образом происходит внутренняя регуляция иммунного ответа, поддержание естественной толерантности, а также формирование долгосрочной иммунной памяти [42, 161]. Центральная роль идиотипических сетевых взаимодействий в развитии СПИДа была впервые предложена J.M. Andrieu и соавторами и J.L. Ziegler и соавторами [15, 201]. В разные годы были предложены аутоиммунные модели развития СПИДа, основанные на предположении о том, что иммунный ответ на ВИЧ приводит к дестабилизации идиотипических взаимодействий в иммунной

системе, что является основной причиной развития СПИДа. [19, 76, 77, 95, 124, 177].

Факты в пользу аутоиммунной гипотезы СПИДа получены в ходе исследований на моделях ВИО-инфицированных обезьян. Так, ВИО-инфекция макак-резус приводит к потере CD4⁺ Т-клеток, развитию аутоиммунных реакций, повышению чувствительности к оппортунистическим инфекциям и к смерти, однако, инфицированные тем же вирусом воротничковые мангабеи не развивают симптомов иммунодефицита, несмотря на хроническую инфекцию [164]. Интересно, что у всех макак-резус в сыворотке крови обнаружены аутоантитела против лейкоцитов, в то время как у мангобеев этих антител не выявлено [16].

СПИД-подобные симптомы могут наблюдаться в отсутствие ВИЧ-инфекции. Идиопатическая лимфоцитопения - синдром иммунодефицита, характеризующийся низким количеством CD4⁺-лимфоцитов и оппортунистическим инфекциями в отсутствие ВИЧ-инфекции [202]. Этиология заболевания не известна, однако, R.B. Salit и соавторы изучая в течение 4 месяцев больного идиопатической CD4⁺-лимфоцитопенией, обнаружили повышенные уровни аутоантител к CD4⁺-лимфоцитам, связанные на поверхности клеток [156].

Группа израильских ученых обнаружила повышенный уровень пролиферации Т-лимфоцитов ВИЧ-инфицированных больных в ответ на стимуляцию их рекомбинантным CD4 человека *in vitro* [10, 12]. Роль таких клеточных аутоиммунных реакций против CD4 показана как у ВИЧ-инфицированных людей, так и на животной модели: снижение пролиферативной активности аутореактивных анти-CD4 Т-лимфоцитов, достигаемое с помощью Т-клеточной вакцинации, приводит к увеличению количества CD4⁺-лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных людей [12]; иммунизация пептидами CD4 человека трансгенных мышей, экспрессирующих CD4 человека и HLA-DR, приводит к развитию аутоиммунного Т-клеточного ответа на CD4, сопровождающегося снижением CD4⁺-лимфоцитов в периферической крови и в селезенке иммунизированных мышей [11].

Интересные факты в пользу аутоиммунной гипотезы СПИДа были получены Т. Kuwata и соавторами при изучении механизма прогрессирующего истощения CD4⁺ Т-лимфоцитов и развития иммунодефицита на модели ВИО-инфекции макак-резус [102]. Авторы обнаружили, что после заражения ВИО наблюдалось 2 типа течения инфекции. Животные были поделены на 2 группы в соответствии с моделью истощения CD4⁺ Т-лимфоцитов: группа ND макак (ND - naive depleted) с преимущественным истощением наивных CD4⁺ Т-клеток (12 из 20 макак) и группа MD макак (MD – memory depleted) с преимущественным истощением CD4⁺ Т-клеток памяти (8 из 20 макак). CD4⁺ Т-клетки памяти в группе MD макак гибли в основном в результате прямого действия вируса на CCR5⁺CD4⁺ клетки. Однако, гибель наивных CD4⁺ Т-клеток в группе ND макак нельзя было объяснить прямым действием вируса, т.к. эти клетки экспрессируют CXCR4 хемокиновый рецептор, а ВИО в основном использует для входа CCR5 рецептор. Для того, чтобы выяснить причину истощения CD4⁺ наивных Т-клеток был проведен сравнительный анализ течения инфекции и особенностей иммунного ответа в группах ND и MD макак. Обнаружено, что у ND макак по сравнению с MD макаками наблюдается снижение общего количества CD4⁺ Т-лимфоцитов во время хронической стадии инфекции, более низкая вирусная нагрузка, более сильный иммунный ответ на вирус, лучшая выживаемость (70 недель против 29,5 недель у MD макак), более высокий уровень иммунной активации, сильно выраженная тромбоцитопения, приведшая к внезапной смерти из-за тромбоза 7 из 12 животных. Кроме того, у ND макак обнаружен повышенный уровень аутоантител к гликопротеинам тромбоцитов, аутоантител к фосфолипидам, к dsДНК, а также повышенный уровень сывороточных и мембраносвязанных IgG аутоантител к Т-клеткам. Уровень сывороточных и мембраносвязанных аутоантител к CD4⁺ Т-лимфоцитам обратно коррелировал с количеством наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов. Таким образом, авторами было показано, что истощение CD4⁺ Т-лимфоцитов у ND макак было ассоциировано с повышенным уровнем аутоантител к CD4⁺ Т-лимфоцитам [102].

Таким образом, многочисленные факты, указывают на то, что ВИЧ-инфекция/СПИД представляет собой аутоиммунное заболевание, где основной мишенью для аутоиммунных реакций являются $CD4^+$ -лимфоциты.

1.3.2. Аутоантитела к $CD4^+$ Т-лимфоцитам при ВИЧ-инфекции. Механизмы их индукции и действия

В 1990 году J.R. Kennedy высказал предположение, что СПИД представляет собой аутоиммунное заболевание, при котором мишенью аутоиммунного ответа являются $CD4^+$ Т-лимфоциты [95]. Автор предполагает, что вследствие комплементарности между gp120 гликопротеином ВИЧ и $CD4$ молекулой $CD4^+$ -лимфоцитов иммунный ответ на $CD4$ -связывающую область gp120 гликопротеина ВИЧ приведет к аутоиммунной реакции против $CD4^+$ -лимфоцитов [94, 95]. Основываясь на идиотип-антиидиотипической сетевой теории N.K. Jerne, описывающей систему иммунного контроля собственных антигенов [85], J.R. Kennedy предлагает теоретическую систему иммунного контроля, которая реагирует на $CD4$ – поверхностный маркер $CD4^+$ Т-лимфоцитов [94, 95]. Система состоит из пары идиотипических $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток, которые распознают аутоантиген ($CD4$), и пары антиидиотипических $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток, которые распознают эти идиотипические рецепторы [94, 95]. В норме защитные и деструктивные элементы системы находятся в равновесии, обеспечивая распознавание аутоантигенов и толерантность. При ВИЧ-инфекции вследствие комплементарности между gp120 гликопротеином ВИЧ и $CD4$ молекулой происходит сдвиг равновесия, приводящий к срыву толерантности и, как следствие, хроническому разрушению $CD4$ клеток под действием аутоантител или цитотоксических лимфоцитов, специфичных $CD4$ (или и тех, и других), и, в конечном итоге, к развитию СПИДа [94, 95, 96].

В пользу данной гипотезы получено немало фактов. Многочисленные исследования сообщают о повышенных уровнях аллоантител и аутоантител против $CD4^+$ Т-лимфоцитов, обнаруживаемых как в плазме, так и на поверхности $CD4^+$ -клеток [26, 49, 59, 99, 114, 115, 134, 190]. Так, С. Muller и соавторы выявили антитела, реагирующие с $CD4^+$ -лимфоцитами здоровых доноров, в плазме у 72%

ВИЧ-инфицированных людей [134]. D.D. Kirov и др. обнаружили антитела против Т-хэлперов также у 70% больных СПИДом. В. Szabo и соавторы обнаружили у ВИЧ-инфицированных больных лимфотоксические аутоантитела, специфичные активированным CD4⁺-лимфоцитам [181].

Уровень плазменных аутоантител против CD4⁺ Т-лимфоцитов, а также уровень связанных на поверхности CD4⁺ Т-лимфоцитов аутоантител коррелирует с количеством CD4⁺ Т-лимфоцитов в крови у ВИЧ-инфицированных людей [46, 115, 133, 195]. Кроме того, среди CD4⁺ Т-лимфоцитов, связавших IgG антитела, наблюдается повышенный уровень апоптоза по сравнению с CD4⁺ Т-лимфоцитами, не имеющими на своей поверхности данных антител [48, 115]. Происходящее, несмотря на АРВТ-опосредованное подавление вирусной нагрузки, снижение количества CD4⁺ Т-клеток у ВИЧ-инфицированных больных также ассоциировано с наличием антилимфоцитарных аутоантител, способных индуцировать гибель лимфоцитов через АЗКЦ [110].

Антитела к CD4 молекуле обнаруживаются в плазме ВИЧ-инфицированных людей еще до появления антител к белкам вируса: S. Keay и соавторы обнаружили аутоантитела к CD4 в 26% (8/31) исследованных сывороток, полученных 6-24 месяцами ранее сероконверсии [91], P. Keiser и соавторы - в 30% (6 из 14 человек) образцов сывороток крови ВИЧ-инфицированных больных, полученных за 90-540 дней до того, как были обнаружены антитела к ВИЧ-1 [92].

Большинство исследователей выявляют антитела к CD4 молекуле у небольшого количества ВИЧ-инфицированных людей при исследовании образцов плазмы крови ВИЧ-положительных больных на разных стадиях заболевания: 7,5% (7 из 93 пациентов) [41], 9% [36], 10% [100], 12,6% [184], 20% [160]. Однако, если измерять уровень аутоантител к CD4 на ранних этапах инфекции, близких к сероконверсии, то процент людей, продуцирующих данные аутоантитела достигает 85% [91, 92].

При ВИЧ-инфекции обнаруживаются антитела к различным эпитопам CD4 [28]. Ряд авторов обнаруживают антитела к D3/D4 доменам молекулы CD4 [32, 36, 54, 108], другие сообщают об аутоантителах к скрытым эпитопам на CD4,

становящимся доступными после взаимодействия CD4 с gp120 [63, 160]. Редко обнаруживают аутоантитела к первому домену CD4, вовлеченному в связывание с gp120 [28, 35]. Некоторые антитела специфичны исключительно растворимой форме CD4 [32, 36, 160, 194], некоторые взаимодействуют и с растворимой и с мембраносвязанной формой молекулы CD4 [40, 114].

Аутоантитела к разным эпитопам CD4 могут оказывать различные эффекты на CD4⁺-лимфоциты. Известно, что моноклональные антитела против CD4 могут обладать иммуносупрессивными или толерогенными эффектами в зависимости от эпитопной специфичности антител [29]. К примеру, развитие адьювантного артрита у крыс существенно различалось после предъявления 3 видов антител против CD4: два вида антител (OX35 и W3/25) предотвращали развитие артрита, один вид антител (RIB5/2) ускорял развитие артрита [143]. Моноклональные антитела ОКТ4А, специфичные D1 домену CD4, обладают сильным иммуносупрессивным действием, тогда как ибализумаб – моноклональные IgG4 антитела к D2 домену CD4 - иммуносупрессивного действия не имеют [29].

Существует мнение, что антитела к CD4 не имеют патологических функций и даже могут защищать от инфицирования ВИЧ [29, 113]. Данное предположение основано на том, что антитела к CD4 обнаруживаются у 44% новорожденных от ВИЧ-положительных матерей [111] и у 33-34% людей, подвергшихся заражению ВИЧ, но остающихся при этом длительное время серонегативными [111, 112, 113]. Большая часть этих антител имеет специфичность к скрытым эпитопам на CD4, которые становятся доступными после взаимодействия с gp120 [28]. Кроме того, они не влияют на связывание CD4 с gp120 и ингибируют ВИЧ-индуцированное образование синцития *in vitro*, в то время как анти-CD4 антитела ВИЧ-положительных людей могут ингибировать связывание CD4 с gp120 и не обладают способностью блокировать образование синцития [28].

В тоже время немало данных свидетельствует в пользу патологической роли антител к CD4 при ВИЧ-инфекции. Так, обнаружено, что уровень аутоантител к CD4 обратно коррелирует с количеством CD4⁺ Т клеток у ВИЧ-инфицированных больных [114, 91]. Кроме того, показано, что повышенный уровень анти-CD4 IgG

антител в плазме ассоциирован с нечувствительностью к антиретровирусной терапии при ВИЧ-инфекции [86, 114, 194]. Обнаруживаемые у ВИЧ-инфицированных больных аутоантитела к CD4 активируют CD4⁺ Т-клетки и могут индуцировать гибель CD4⁺-лимфоцитов *in vitro* по механизму антитело-зависимой клеточной цитотоксичности [114]. Моноклональные антитела к CD4 человека, используемые в клинических испытаниях для лечения аутоиммунных заболеваний, могут вызывать истощение или функциональную инактивацию Т-клеток или активировать их [29]. На мышинной модели показано, что внутривенное введение антител против CD4 приводит к гибели CD4⁺-лимфоцитов по механизму апоптоза, причем признаки апоптоза появляются уже через семь-восемь часов после инъекции [188].

Аутоантитела к разным эпитопам CD4 могут быть индуцированы в результате различных механизмов. J.P.Corre и соавторы предположили, что аутоантитела к CD4 могут быть индуцированы в результате антиидиотипического ответа на gp120 на основе фактов, что 1) обнаруженные у ВИЧ-инфицированных больных антитела против CD4 конкурентно ингибировали связывание анти-gp160 антител с gp160 и 2) антиидиотипические антитела, продуцируемые кроликами в ответ на иммунизацию аффинно-очищенными человеческими антителами против gp120, распознают рекомбинантный и мембраносвязанный CD4, и это взаимодействие конкурентно ингибируется растворимым CD4 [40]. Также S. Keay и соавторы показали, что вакцинация волонтеров gp160 гликопротеином ВИЧ индуцирует у 3 из 5 людей образование аутоантител к CD4, которые взаимодействовали с анти-gp160 антителами и поэтому определялись авторами как антиидиотипические по отношению к gp160 [90]. Возможность индуцирования продукции аутоантител против CD4 иммунизацией gp160 гликопротеином ВИЧ-1 показана и на шимпанзе [93].

Если аутоантитела к CD4 возникают как антиидиотипические в ответ на gp120 ВИЧ, то они могут связываться с антителами, специфичными к gp120 гликопротеину ВИЧ, вследствие чего они могут не обнаруживаться в плазме крови. Также антитела к CD4 могут быть связаны на поверхности CD4⁺-

лимфоцитов, о чем свидетельствуют данные об обнаружении повышенного количества CD4⁺-лимфоцитов, покрытых иммуноглобулинами, у ВИЧ-инфицированных больных [48, 133] и ВИО-инфицированных обезьян [102].

Возникающие при ВИЧ-инфицировании в результате идиотип-антиидиотипических взаимодействий аутоантитела к CD4 будут направлены к первому домену CD4, т.к. идиотип-антиидиотипические взаимодействия основаны на принципе комплементарности, и именно в первом домене CD4 находится область связывания gp120 гликопротеина [40, 96,]. Антитела, направленные ко второму, третьему или четвертому домену CD4 и не связывающиеся с нативной (мембраносвязанной) формой CD4, не могут быть индуцированы в результате антиидиотипического ответа на gp120 гликопротеин ВИЧ [192]. Некоторые авторы предполагают, что такие анти-CD4 антитела вызваны индуцированной gp120 гликопротеином ВИЧ презентацией ранее скрытых эпитопов на CD4 молекуле аутореактивным CD4-специфичным клоном Т-клеток после процесинга эндоцитированного мембранного CD4 в активированных Т-клетках [33, 114, 160].

V. Daniel и соавторы предполагают, что обнаруженные ими аутоантитела к CD4 у 22% ВИЧ-инфицированных людей выполняют функцию «мусорщиков», удаляя мертвые или умирающие CD4⁺-клетки, на основании того, что обнаруженные антитела не связываются с молекулой CD4 на мембране лимфоцитов, не коррелируют с уровнем антилимфоцитарных аутоантител и не ассоциированы со снижением CD4⁺-лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных пациентов [47].

Таким образом, полученные на сегодняшний день разными исследователями данные об уровне и роли аутоантител к CD4 при ВИЧ-инфекции не позволяют сделать однозначных выводов, являются ли аутоантитела к CD4 причиной истощения CD4⁺-лимфоцитов или имеют нейтральную или даже защитную роль в развитии ВИЧ-инфекции. Вероятно, это связано с тем, что в различных исследованиях определяют разные по эпитопной специфичности аутоантитела к CD4, имеющие, соответственно, разные функции. Кроме того,

возможно, что аутоантитела к CD4 находятся в связанном с лимфоцитами виде и поэтому не доопределяются с помощью иммуноферментного анализа, чаще всего используемого для их измерения.

1.4. Антиидиотипические антитела в регуляции аутоиммунных реакций

1.4.1. Регуляторный ревматоидный фактор как фактор регуляции аутореактивности

Ряд авторов, придерживающихся мнения, что СПИД представляет собой аутоиммунное заболевание, рассматривают идиотипические сетевые взаимодействия в качестве движущих механизмов в развитии иммунодефицита при ВИЧ-инфекции [19, 76, 96, 177].

Генерализованным фактором идиотипической регуляции иммунного ответа – фактором, предотвращающим развитие аутоиммунных заболеваний – может выступать ревматоидный фактор [24, 163], представляющий собой антитела к Fc-области IgG [139]. В 1948 году эти антитела были описаны у пациентов с ревматоидным артритом (РА) [153] и в связи с ассоциацией с РА в 1952 году были названы ревматоидным фактором (РФ) [142]. Однако сейчас обсуждается не пора ли переименовать РФ (например, в анти-Fc фактор или антииммуноглобулиновый фактор), т.к. высокий титр РФ определяется не только при РА, но и при других аутоиммунных и неаутоиммунных заболеваниях, кроме того его роль в диагностике и патогенезе РА остается до конца не понятой [176]. РФ часто выявляются у пациентов с системными аутоиммунными заболеваниями, такими как системная красная волчанка, смешанное заболевание соединительной ткани, полимиозит и дерматомиозит [138, 162]. Пациенты с синдромом Шегрена [55] и пациенты со смешанной криоглобулинемией II и III типа [156, 157] имеют самые высокие титры РФ. РФ обнаруживают и у здоровых людей [166, 182].

РФ представляет собой гетерогенную популяцию антител. W.J.E. Van Esch и соавторы описывают 2 популяции РФ – патологический и физиологический. Патологический РФ ассоциирован с заболеваниями, физиологический является

нормальным компонентом иммунного ответа [186]. М.М. Newkirk делает вывод, что РФ с низкой аффинностью играет важную роль в иммунном ответе организма на различные инфекционные агенты, а РФ, обладающий высокой аффинностью, или РФ, способный формировать криоглобулины, имеет патологическую роль в патогенезе заболевания [138].

РФ, обнаруживаемый при инфекционных и хронических заболеваниях, в отличие РФ при РА, является «временным» и «невредным» [82]. Учитывая способность РФ повышать клиренс иммунных комплексов и тот факт, что РФ-продуцирующие В-клетки могут вести себя как антиген-презентирующие клетки и способствовать иммунному ответу против инфекционных антигенов, вполне вероятно, что эффект РФ, продуцируемого во время инфекций, является защитным для хозяина [138, 193]. F. Ignegnoli и соавторы считают, что продукция РФ, вероятно, является результатом иммунного ответа на воспаление и может иметь регуляторное влияние на продукцию иммуноглобулинов, контролируя активацию В-клеток, при этом низкоаффинные РФ, являются, вероятно, ключевыми игроками в иммунных реакциях на многие инфекционные организмы, а высокоаффинные РФ указывают на более тяжелые и стойкие заболевания у пациентов с ревматоидным артритом [82].

P. Coulie. и J.V. Snick, показывают, что продукция РФ может быть нормальным компонентом вторичного иммунного ответа – значительный транзиторный подъем уровня РФ наблюдался после повторной иммунизации мышей человеческим трансферрином, человеческим сывороточным альбумином, овальбумином, гемоцианином моллюска или эритроцитами барана [41].

Показано, что РФ-антитела обладают перекрестной реактивностью, т.е. реагируют не только с Fc-фрагментом человеческого IgG, но и с денатурированной ДНК, нуклеосомами, ДНК нуклеопротеиновыми комплексами, гистонами, негистоновыми нуклеопротеинами и антигенами Ro/SS-A и др. [132]. F.A. Nardella и соавторы предположили, что РФ может возникать как антиидиотипические антитела на микробные Fc-связывающие белки, основываясь на фактах, что антигенные детерминанты для РФ и антигенные детерминанты для

микробных Fc-связывающих белков расположены в одной области C γ 2- C γ 3 на молекуле IgG [137]. R. Holmdahl и соавторы получили в ответ на иммунизацию мышей иммунными комплексами, состоящими из нативного коллагена II типа, две популяции IgG РФ, обладающих высокой аффинностью к Fc-области мышинового IgG. Одна из этих популяций обладала двойной специфичностью – к Fc-области IgG и к Fab-фрагменту анти-коллагеновых антител и представляла собой, таким образом, анти-идиотипические антитела к антителам против коллагена [78]. Показано, что РФ возникают как антиидиотипические антитела в ответ на иммунизацию крыс бычьим коллагеном [25], основным белком миелина или липопротеинами высокой плотности [24]. У больных хроническим тиреоидитом обнаружен РФ, являющийся антиидиотипическими антителами к антителам против тиреоглобулина [99]. На мышинной модели показано, что РФ возникают как антиидиотипические антитела в ответ на иммунизацию комплексом пептидогликанов и полисахаридов клеточной стенки стрептококков [87].

Через идиотип-антиидиотипические взаимодействия РФ может участвовать в регуляции активности лимфоцитов против антигенов-индукторов аутоиммунных заболеваний. На крысиных моделях коллаген-индуцированного артрита, энцефаломиелита, вызванного иммунизацией основным белком миелина морской свинки, и атеросклероза, индуцированного иммунизацией липопротеинами высокой плотности, показано, что устойчивость крыс к развитию аутоиммунных заболеваний была ассоциирована с повышением уровня РФ в начальный период развития иммунного ответа (7-14 дней после иммунизации) [24]. У крыс, устойчивых к развитию аутоиммунного заболевания, повышение уровня РФ предшествует иммунному ответу на антиген-индуктор данного аутоиммунного заболевания [24]. Кроме того, терминация иммунного ответа на антиген и ремиссия экспериментально индуцированного аутоиммунного заболевания были связаны с повышением уровня РФ [24].

Ревматоидный фактор, продукция которого была ассоциирована с устойчивостью к развитию аутоиммунных заболеваний и с ремиссией, был назван

регуляторный ревматоидный фактор [163]. Регуляторный РФ – антиидиотипические антитела, несущие 2 паратопа: индивидуальный и общий паратоп. Индивидуальный РФ-паратоп специфичен антигенсвязывающей области антител к антигенам, индуцирующим аутоиммунную реакцию. Общий паратоп РФ распознает идиотопы, которые похожи среди антител различной специфичности и расположены вне антигенсвязывающей области [24].

Роль РФ при ВИЧ-инфекции/СПИДе остается не изученной. С. Susal соавторы обнаружили повышенный уровень IgG анти-Fab у больных СПИДом по сравнению с ВИЧ-инфицированными больными, не имеющими СПИД-ассоциированного комплекса заболеваний, и по сравнению со здоровыми донорами. Выявлена обратная корреляция между уровнем этих антител и количеством CD4⁺-клеток [180]. В 1993 году С. Susal и соавторы представили модель сетевых взаимодействий при СПИДе, основанную на связях между анти-Fab антителами, антителами против МНС и антителами, несущими внутренний образ МНС. Защитную роль в этой модели имеют анти-МНС антитела [179], а ключевую патологическую роль играют IgG анти-Fab антитела [178].

1.4.2. Антитела против МНС-II как антиидиотипические антитела против аутоантител к CD4

Так как gp120 гликопротеин комплементарен CD4 гликопротеину, а CD4 комплементарен МНС-II, gp120 может «напоминать» МНС-II и иммунный ответ на gp120 гликопротеин будет иметь перекрестные реакции с МНС-II [76]. Эта концепция поддерживается фактом, что сайты связывания gp120 и МНС-II находятся в первом домене (D1) молекулы CD4 и перекрываются между собой [56]. В пользу существования идиотипических сетевых взаимодействий между МНС II и gp120 гликопротеином служит факт, что иммунизация мышей аутологичными и аллогенными клетками вызвала продукцию анти-анти-МНС-II антител, а также антител против gp120 гликопротеина, хотя этим мышам никогда не вводили ни gp120, ни другие компоненты ВИЧ [97].

Аутоиммунную сетевую модель развития СПИДа, основанную на сходстве gp120 гликопротеина и МНС-II молекулы, представили G.W Hoffmann и соавторы

в 1991 году [76]. Авторы считают, что СПИД представляет собой аутоиммунное заболевание, развивающееся вследствие дестабилизации контролирующей системы, компонентами которой являются МНС-II, лимфоциты, распознающие МНС-II, CD4, лимфоциты, рецепторы которых несут внутренний образ МНС-II, анти-gp120 лимфоциты и лимфоциты, распознающие внутренний образ МНС-II. В 1994 году Н. Atlan и соавторы предположили, что с помощью вакцинации аутологичными Т-клетками можно изменить состояние иммунной сети от активации к супрессии [19], и таким образом снизить аутоиммунные реакции против CD4⁺-лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных людей.

Сегодня ряд авторов рассматривают аллоиммунизацию как один из возможных подходов предотвращения и лечения ВИЧ-инфекции [103, 189]. Показано, что лимфоцитарные вакцины приводят к снижению вiremии, повышению количества CD4⁺-лимфоцитов, снижению частоты возникновения оппортунистических инфекций, улучшению общего состояния и к другим положительным эффектам у ВИЧ-инфицированных больных [27].

На моделях ВИО-инфицированных обезьян обнаружено, что иммунизация обезьян аллогенными или ксеногенными лимфоцитами [174, 175] предотвращает заражение их вирусом иммунодефицита обезьян. Так, в 1991 году E.J. Stott и соавторы впервые продемонстрировали, что макаки, иммунизированные Т-клеточными линиями защищены от внутривенного инфицирования ВИО, выращенного в тех же Т-клеточных линиях. Интересным оказалось то, что и контрольные животные, получившие инъекции тех же, но неинфицированных клеток, тоже были устойчивы к ВИО. Кроме того, авторы обнаружили, что устойчивость макак к инфицированию была ассоциирована с повышенным уровнем антител против введенных им Т-клеток [174]. Чтобы определить, какие антигены потенциально могут быть вовлечены в защиту от заражения ВИО с помощью предъявления неинфицированных лимфоцитов человека макакам, L.O. Arthur и соавторы иммунизировали макак культуральной жидкостью, в которой инкубировали данные лимфоциты, бета-2-микроглобулином, HLA-I и HLA-II белками [18]. В результате обнаружено, что к устойчивости макак против

внутривенного инфицирования ВИО, выращенного в клетках человека, привела иммунизация молекулами HLA-II [18].

Защитный механизм аллоиммунизации не ясен, чаще всего защиту от инфицирования связывают тем, что антитела против МНС могут оказывать нейтрализующее действие на ВИЧ [103, 189], т.к. оболочка ВИЧ помимо гликопротеинов вируса имеет также мембранные белки клетки-хозяина, в т.ч. МНС [30]. Однако, роль антител к МНС в нейтрализации ВИЧ *in vivo* показана не была, а также не изучено, как влияют антитела против МНС на иммунный ответ против белков вируса.

Таким образом, с точки зрения теории идиотип-антиидиотипической регуляции иммунного ответа, регуляторный ревматоидный фактор и естественные аутоантитела к HLA, могут иметь важную роль в патогенезе ВИЧ-инфекции, однако экспериментальных доказательств этому предположению пока нет.

Глава 2. ОРГАНИЗАЦИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Организация и материалы исследования

Работа выполнялась с 2013 по 2019 год в лаборатории экспериментальной иммунологии кафедры иммунологии и клеточной биологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет». Исследования с использованием метода проточной цитофлуориметрии выполнялись на базе БУЗ УР «Первая республиканская клиническая больница МЗ УР» (г. Ижевск) и БУЗ УР «Удмуртский республиканский центр по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями» (г. Ижевск).

Исследование выполнено на крысах Wistar обоего пола, полученных из питомника Столбовая. Животные содержались в стандартных условиях с постоянным доступом специализированного корма и воды при температуре $20\pm 5^{\circ}\text{C}$, относительной влажности 45-65%, с поддержанием 12-часового фотопериода. Эксперименты на животных проводились в соответствии с директивой Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых для научных целей.

Материалами исследования служили цельная кровь, плазма крови крыс, а также фракции мононуклеаров, полученных из периферической крови крыс.

Дизайн исследования составлен исходя из цели и задач. На первом этапе исследования с целью индукции аутоиммунной реакции против CD4 и CD4⁺-лимфоцитопении крысы были иммунизированы gp120 гликопротеином ВИЧ-1 (ACROBiosystems, США) внутрикожно (n=14) и подкожно (n=5) в составе неполного адьюванта Фрейнда (НАФ, Sigma-Aldrich, США). Контрольная группа животных получила инъекцию НАФ внутрикожно (n=10). В крови крыс определяли уровень антител к рекомбинантному gp120 гликопротеину ВИЧ-1 и уровень аутоантител к рекомбинантному CD4 гликопротеину (R&DSystems, США) с помощью сконструированной нами тест-системы на основе принципов непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Об уровне антител судили по значению оптической плотности плазмы, разведенной в 100

(для антител к CD4) или 200 раз (для антител к gp120 ВИЧ-1). В качестве контроля вместо исследуемой плазмы использовали забуференный физиологический раствор, а также плазму от интактных крыс, разведенную в 100/200 раз. Оптическую плотность измеряли на планшетном фотометре Statfax 3200 Awareness Technology. У крыс, развивших аутоиммунную реакцию против CD4, измеряли количество CD4⁺-лимфоцитов крови методом иммунофенотипирования с использованием моноклональных антител мыши против CD4 крысы, меченых ФИТЦ (Thermo Fisher Scientific, США), с последующей детекцией на цитофлуориметрах BD FACS Canto II Flow Cytometer и Beckman Coulter Epics XL4.

На втором этапе исследовали роль антиидиотипических антител – регуляторного ревматоидного фактора и антител к HLA-II - в регуляции иммунного ответа на gp120 ВИЧ-1. Так как в ходе первого этапа исследования было выяснено, что продукция аутоантител у крыс индуцируется иммунизацией gp120 гликопротеином ВИЧ-1 внутрикожно, но не подкожно, в дальнейшем использовали только внутрикожный способ иммунизации. Регуляторный ревматоидный фактор определяли в плазме крови с помощью реакции пассивной агглютинации танализованных эритроцитов, нагруженных гомологичным IgG. Титр регуляторного ревматоидного фактора исследовали у 14 животных, иммунизированных gp120 ВИЧ-1, и 10 крыс, получивших НАФ.

Уровень антител к HLA-II определяли в другом эксперименте, где были вновь иммунизированы gp120 гликопротеином ВИЧ-1 16 крыс, с помощью ИФА-системы, аналогичной тест-системе, сконструированной для измерения антител к gp120 ВИЧ-1 и аутоантител к CD4. В качестве антигена сорбировали альфа-цепь HLA-DR (Abcam, Великобритания), т.к. альфа-цепь HLA-DR обладает низким полиморфизмом, в отличие от бета-цепи [89].

На третьем этапе исследования для выяснения роли аутоантител к CD4 в гибели CD4⁺-лимфоцитов определяли наличие корреляции между уровнем аутоантител к rCD4 и количеством CD4⁺-лимфоцитов в крови крыс,

иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1 и развивших аутоиммунную реакцию против CD4, в программе Statistica 10.

На четвертом этапе исследования проводили сравнительный анализ уровня регуляторного ревматоидного фактора и количества CD4⁺-лимфоцитов в крови крыс, иммунизированных gp120 ВИЧ-1, и крыс, получивших НАФ. Для того, чтобы провести корреляционный анализ, определяющий наличие или отсутствие достоверной связи между снижением числа CD4⁺-лимфоцитов и повышением уровня регуляторного ревматоидного фактора в крови иммунизированных животных, был проведен отдельный эксперимент. Три крысы были иммунизированы gp120 гликопротеином ВИЧ-1 внутрикожно, четверым ввели НАФ. У всех животных измеряли количество CD4⁺-лимфоцитов в течение 4 недель, начиная с 3 недели после иммунизации. Ежеженедельно у исследуемых крыс отбирали и замораживали плазму крови, в которой затем измеряли уровень регуляторного ревматоидного фактора одновременно за весь период наблюдения.

После выявления ассоциации повышенного уровня регуляторного ревматоидного фактора со снижением количества CD4⁺-лимфоцитов у крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1, был проведен дополнительный эксперимент *in vitro*, где мононуклеары, выделенные из периферической крови интактных крыс, обрабатывали плазмой, содержащей аутоантитела к CD4, полученной от gp120 иммунизированных крыс, в течение суток при 37⁰С в 5% CO₂, затем клетки инкубировали с плазмой, содержащей регуляторных ревматоидный фактор, полученной от интактных крыс. Определяли выживаемость лимфоцитов.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Иммунизация крыс gp120 гликопротеином ВИЧ-1 и забор крови

8-10 недельных крыс иммунизировали рекомбинантным gp120 гликопротеином ВИЧ-1 в составе неполного адъюванта Фрейнда внутрикожно (n=33) или подкожно (n=5) в заднюю часть спины однократно в дозе 20 мкг gp120

гликопротеина ВИЧ-1 на животное. Контрольной группе животных вводили НАФ внутривенно (n=14). Ежедневно забирали кровь из хвостовой вены под эфирным наркозом. В качестве антикоагулянта использовали цитрат натрия.

2.2.2. Определение антител к рекомбинантному gp120 гликопротеину ВИЧ-1 методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа

Принцип метода.

Метод основан на образовании комплекса антиген-антитело с последующей его регистрацией при помощи антивидовых антител, меченных ферментом, вступающим в реакции с соответствующим хромогенным субстратом, в результате которых образуются окрашенный продукт, количество которого можно определить спектрофотометрически.

Методика.

- 1) Рекомбинантный gp120 гликопротеин ВИЧ-1 в ЗФР в концентрации 10 мкг/мл сорбировали в лунки планшета по 50 мкл в течение 1 суток при 4⁰С. Планшет промывали ЗФР с твином-20 (0,5 мл твина на 1 л ЗФР) 3 раза.
- 2) Для блокировки неспецифического связывания вторых антител добавляли 150 мкл на лунку 5% раствора сухого молока в ЗФР с твином-20, инкубировали 1 час при комнатной температуре (23-25⁰С). Промывали 3 раза ЗФР с твином-20.
- 3) В лунки вносили исследуемую плазму крови крыс по 100 мкл на лунку, предварительно разбавленную ЗФР в 200 раз. В качестве отрицательного контроля использовали плазму интактных крыс. В качестве контроля проведения самого анализа - ЗФР. Инкубировали 1 час при комнатной температуре (23-25⁰С). Далее промывали лунки планшета 3 раза ЗФР с твином-20.
- 4) Добавляли антивидовые антитела, меченные пероксидазой хрена (антитела овцы против иммуноглобулинов крысы (ИМТЕК, РФ)), разведенные в 8000 раз в ЗФР с твином-20, по 100 мкл на лунку. Инкубировали 1 час при комнатной температуре (23-25⁰С). Промывали 3 раза ЗФР с твином-20.
- 5) Добавляли субстратную смесь (на 5 мл цитратного буферного раствора (рН 5,0) 3 мг ОФД, 15 мкл 3% перекиси водорода) по 100 мкл на лунку. Все

компоненты субстратной смеси смешивали непосредственно перед добавлением в лунки. Инкубировали 15 минут в темноте. Реакцию останавливали 2М серной кислотой по 50 мкл на лунку.

б) Фотометрировали при 492 нм. Уровень антител оценивали по значению оптической плотности. Положительным считали результат, превышающий максимальное значение оптической плотности лунок, в которые вместо исследуемой плазмы добавляли разведенную в 200 раз плазму от интактных крыс, на более чем 0,1 единицу оптической плотности.

2.2.3. Определение антител к рекомбинантному CD4 белку крысы методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа

Принцип метода.

Метод основан на образовании комплекса антиген-антитело с последующей его регистрацией при помощи антивидовых антител, меченных ферментом, вступающим в реакции с соответствующим хромогенным субстратом, в результате которых образуются окрашенный продукт, количество которого можно определить спектрофотометрически.

1) Рекомбинантный CD4 гликопротеин крысы в ЗФР в концентрации 10 мкг/мл сорбировали в лунки планшета по 50 мкл в течение 1 суток при 4⁰С. Планшет промывали ЗФР с твином-20 (0,5 мл твина на 1 л ЗФР) 3 раза.

2) Для блокировки неспецифического связывания вторых антител добавляли 150 мкл на лунку 5% раствора сухого молока в ЗФР с твином-20, инкубировали 1 час при комнатной температуре (23-25⁰С). Промывали 3 раза ЗФР с твином-20.

3) В лунки вносили исследуемую плазму по 100 мкл на лунку в разведении 1:100. В качестве отрицательного контроля использовали плазму интактных крыс. В качестве контроля проведения самого анализа - ЗФР. Инкубировали 1 час при комнатной температуре (23-25⁰С). Промывали 3 раза ЗФР с твином-20.

4) Добавляли антивидовые антитела, меченные пероксидазой хрена (антитела овцы против иммуноглобулинов крысы (ИМТЕК)), разведенные в 8000 раз в ЗФР

с твином-20, по 100 мкл на лунку. Инкубировали 1 час при комнатной температуре (23-25⁰С). Промывали 3 раза ЗФР с твином-20.

5) Добавляли субстратную смесь (на 5 мл цитратного буферного раствора (рН 5,0) 3 мг ОФД, 15 мкл 3% перекиси водорода) по 100 мкл на лунку. Все компоненты субстратной смеси смешивали непосредственно перед добавлением в лунку. Инкубировали 15 минут в темноте. Реакцию останавливали 2М серной кислотой по 50 мкл на лунку.

6) Фотометрировали при 492 нм. Уровень антител оценивали по значению оптической плотности. Положительным считали результат, превышающий максимальное значение оптической плотности лунок, в которые вместо исследуемой плазмы добавляли разведенную в 200 раз плазму от интактных крыс, на более чем 0,1 единицу оптической плотности.

2.2.4. Определение антител к альфа-цепи HLA-DR методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа

Принцип метода.

Метод основан на образовании комплекса антиген-антитело с последующей его регистрацией при помощи антивидовых антител, меченных ферментом, вступающим в реакции с соответствующим хромогенным субстратом, в результате которых образуются окрашенный продукт, количество которого можно определить спектрофотометрически.

1) Рекомбинантный HLA-DR белок в ЗФР в концентрации 10 мкг/мл сорбировали в лунки планшета по 50 мкл в течение 1 суток при 4⁰С. Планшет промывали ЗФР с твином-20 (0,5 мл твина на 1 л ЗФР) 3 раза.

2) Для блокировки неспецифического связывания вторых антител добавляли 150 мкл на лунку 5% раствора сухого молока в ЗФР с твином-20, инкубировали 1 час при комнатной температуре (23-25⁰С). Промывали 3 раза ЗФР с твином-20.

3) В лунки вносили исследуемую плазму по 100 мкл на лунку в разведении 1:100. В контроле вместо плазмы добавляли ЗФР. Инкубировали 1 час при комнатной температуре (23-25⁰С). Промывали 3 раза ЗФР с твином-20.

- 4) Добавляли антивидовые антитела, меченные пероксидазой хрена (антитела овцы против иммуноглобулинов крысы (ИМТЕК)), разведенные в 8000 раз в ЗФР с твином-20, по 100 мкл на лунку. Инкубировали 1 час при комнатной температуре (23-25⁰С). Промывали 3 раза ЗФР с твином-20.
- 5) Добавляли субстратную смесь (на 5 мл цитратного буферного раствора (рН 5,0) 3 мг ОФД, 15 мкл 3% перекиси водорода) по 100 мкл на лунку. Все компоненты субстратной смеси смешивали непосредственно перед добавлением в лунку. Инкубировали 15 минут в темноте. Реакцию останавливали 2М серной кислотой по 50 мкл на лунку.
- 6) Фотометрировали при 492 нм. Уровень антител оценивали по значению оптической плотности. Положительным считали результат, превышающий максимальное значение оптической плотности лунок, в которые добавляли ЗФР вместо плазмы, на более чем 0,1 единицу оптической плотности.

2.2.5. Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови крыс методом проточной цитофлуориметрии

Принцип метода.

Метод основан на фенотипировании клеток моноклональными антителами, меченными флуоресцентной меткой, с последующей регистрацией сигналов флуоресценции и светорассеяния клеток, проходящих через лазерный луч в потоке жидкости, в режиме поштучного анализа.

Методика.

- 1) *Подсчет общего количества лейкоцитов.* В пробирку с 400 мкл 3% уксусной кислоты, подкрашенной метиленовым синим, добавляли 20 мкл цельной крови крыс. Подсчитывали количество клеток в камере Горяева в 25 больших квадратах. Полученное количество клеток подставляли в формулу и рассчитывали содержание клеток в 1 мкл. $X = (п.*р.*4000):400$, где п - количество клеток в 25 квадратах, р. – разведение (в 20 раз), X - количество клеток в 1 мкл.
- 2) *Определение процентного содержания лимфоцитов в крови.* Готовили мазок крови на обезжиренном стекле, фиксировали его 96% этанолом,

окрашивали фиксированный мазок крови красителем Романовского-Гимза в течение 30 мин. Подсчитывали 100 клеток под имерсионным объективом в капле масла.

3) *Определение процентного содержания CD4⁺-клеток в периферической крови крыс.*

А. Кровь у крыс забирали из сердца с антикоагулянтом. Разбавленную в 3 раза забуференным физиологическим раствором кровь наносили на градиент плотности фиколл-верографина ($\rho=1,08 \text{ г/см}^3$) в соотношении 2:1. Центрифугировали при 1500 об/мин 30 минут.

Б. Собирали образовавшееся кольцо мононуклеарных клеток, суспензию клеток трижды отмывали ЗФР по 5 минут при 1500 об/мин.

В. Подсчитывали количество выделенных клеток в камере Горяева (окраска трипановым синим).

Г. К 100000 клеток добавляли моноклональные антитела к CD4 крысы, меченные флуоресцентной меткой, в количестве 0,5 мкг. Инкубировали час при 37⁰С.

Д. Отмывали трижды ЗФР. Подсчитывали процентное содержание CD4⁺-лимфоцитов среди мононуклеаров с помощью проточного цитофлуориметра.

4) *Абсолютное количество CD4⁺-клеток в 1 мкл крови определяли по следующей формуле: $Z=Y*X$, где*

Z - абсолютное количество CD4⁺-лимфоцитов в 1 мкл крови,

Y – процент CD4⁺-клеток среди лимфоцитов периферической крови,

X - абсолютное количество лимфоцитов в 1 мкл крови.

2.2.6. Определение регуляторного ревматоидного фактора в крови крыс методом пассивной агглютинации танизированных эритроцитов, нагруженных гомологичным IgG

Принцип метода.

Метод основан на связывании регуляторного ревматоидного фактора с гомологичным IgG, сорбированным на поверхности фиксированных глутаровым

альдегидом и танализованных эритроцитов человека, что приводит к агглютинации эритроцитов, т.е. склеиванию их в агрегаты, которые выпадают в хлопьевидный рыхлый осадок.

Методика

- 1) Эритроцитов человека группы 0 трижды отмывали физиологическим раствором при 1200 об/мин по 5 минут.
- 2) Эритроциты фиксировали глутаровым альдегидом. Для этого охлажденный на водяной бане до 0⁰С осадок эритроцитов разводили охлажденным 1% раствором глутарового альдегида до 1% суспензии и инкубировали 30 минут при 0⁰С при периодическом помешивании. 25% глутаровый альдегид разводили до 1% раствором следующего состава: 1 часть 0,15 М Na₂HPO₄ с рН 8,2, 9 частей 0,15 М NaCl и 5 частей дистиллированной воды.
- 3) Фиксированные эритроциты отмывали 5 раз физиологическим раствором при 1200 об/мин по 5 минут.
- 4) Отмытые фиксированные эритроциты разводили до 10% суспензии в ЗФР и смешивали с равным объемом раствора танина (8 мг на 10 мл ЗФР). Инкубировали 10 минут при комнатной температуре, трижды отмывали ЗФР при 1200 об/мин по 5 минут.
- 5) Для сенсibilизации смешивали 4 мл фосфатного буфера (рН 6,4), 1 мл IgG крысы в физиологическом растворе с концентрацией 0,5 мг/мл и 75 мкл плотного осадка танализованных эритроцитов. Инкубировали 20 минут при комнатной температуре, трижды отмывали 5% раствором сухого молока в ЗФР с при 1200 об/мин по 5 минут.
- 6) Для постановки реакции исследуемую плазму титровали ЗФР с шагом 2 и вносили по 50 мкл на лунку. Добавляли равный объем 1-1,5% суспензии танализованных эритроцитов в ЗФР, нагруженных гомологичным IgG. В контроле вместо исследуемой плазмы вносили ЗФР. Инкубировали при 37⁰С.
- 7) Реакцию агглютинации учитывали через 3 часа - определяли титр исследуемых образцов, т.е. последнее наибольшее разведение плазмы, при котором агглютинация еще обнаруживается.

2.2.7. Влияние плазмы крови крыс, иммунизированных gp120 ВИЧ-1, на жизнеспособность мононуклеаров *in vitro*

Принцип метода.

Метод основан на оценке выживаемости мононуклеаров в культуре, содержащей предполагаемые факторы гибели клеток, посредством окрашивания их прижизненным красителем (трипановым синим) с последующим подсчетом жизнеспособных (неокрашенных) и мертвых (окрашенных) клеток в камере Горяева.

Методика.

- 1) Кровь у крыс забирали из сердца с антикоагулянтом. Разбавленную в 3 раза забуференным физиологическим раствором кровь наносили на градиент плотности фиколл-верографина ($\rho=1,08 \text{ г/см}^3$) в соотношении 2:1 (2 части крови и 1 часть раствора фиколл-верографина). Центрифугировали при 1500 об/мин 30 минут.
- 2) Собрали образовавшееся кольцо мононуклеарных клеток, суспензию клеток трижды отмывали средой RPMI-1640 по 5 минут при 1500 об/мин.
- 3) Подсчитывали количество выделенных клеток в камере Горяева (окраска трипановым синим).
- 4) Затем к 10^6 клеток в среде RPMI-1640 добавляли 100 мкл плазмы, содержащей антитела к CD4 крысы, полученной от крыс, иммунизированных gp120 ВИЧ-1, (опытная группа) или 100 мкл плазмы, не содержащей антитела к CD4 крысы (контрольная группа), конечный объем каждой пробы – 1 мл.
- 5) Мононуклеары инкубировали 24 часа при 37°C , 5% CO_2 .
- 6) После инкубации клетки промывали 3 раза средой RPMI-1640 по 5 минут при 1500 об/мин.
- 7) Отмытые клетки ресуспендировали в 100 мкл среды и к обеим группам, опытной и контрольной, добавляли плазму, содержащую регуляторный фактор, или плазму, не содержащую регуляторный ревматоидный фактор.
- 8) После 3 часов инкубации при 37°C подсчитывали количество оставшихся живых и мертвых клеток в камере Горяева, окрашенных трипановым синим.

2.3. Статистический анализ результатов.

Результаты анализировали с помощью программ Microsoft Office Excel 2007, Statistica 10, Prisma 5 для Windows. Для оценки достоверности различий использовали критерии Манна-Уитни, Стьюдента, Уилкоксона. Отличия считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Продукция аутоантител к CD4 и CD4⁺-лимфоцитопения у крыс Wistar, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1

Согласно аутоиммунной гипотезе СПИДа лимфоциты, специфичные к gp120 гликопротеину ВИЧ-1, и активируемые им при заражении, вызывают активацию аутореактивных лимфоцитов, специфичных к CD4⁺ Т-лимфоцитам, с которыми они находятся в идиотип-антиидиотипических взаимодействиях [1, 94, 95, 96]. Следствием развития аутоиммунной реакции против CD4 является истощение CD4⁺-лимфоцитов [96, 114, 133]. Для того, чтобы проверить данную гипотезу, необходима экспериментальная модель, исключая прямой вклад вируса и его белков в развитие CD4⁺-лимфоцитопении, наблюдаемой при ВИЧ-инфекции.

Чтобы проверить может ли иммунный ответ против gp120 гликопротеина ВИЧ-1 вызывать развитие аутоиммунной реакции против CD4 и приведет ли такая аутоиммунная реакция к истощению CD4⁺-клеток, крысы Wistar были иммунизированы gp120 гликопротеином ВИЧ-1. Было апробировано 2 способа иммунизации gp120 гликопротеином ВИЧ-1: внутрикожный и подкожный.

Внутрикожная однократная иммунизация gp120 гликопротеином ВИЧ-1 в НАФ вызвала продукцию аутоантител к рекомбинантному CD4 (rCD4) крысы у 11 из 14 животных. Кинетика антител к rCD4 крысы и gp120 гликопротеину ВИЧ-1 в ответ на внутрикожное введение gp120 ВИЧ-1 у крыс, продуцирующих аутоантитела к rCD4, и крыс, устойчивых к индукции аутоантител к rCD4, показана на рисунке 3.1 А и 3.1 Б, соответственно. Аутоантитела к rCD4 начинают выявляться в крови через 2 недели после иммунизации gp120 гликопротеином ВИЧ-1, их продукция не завершается в течение 16 недель наблюдения.

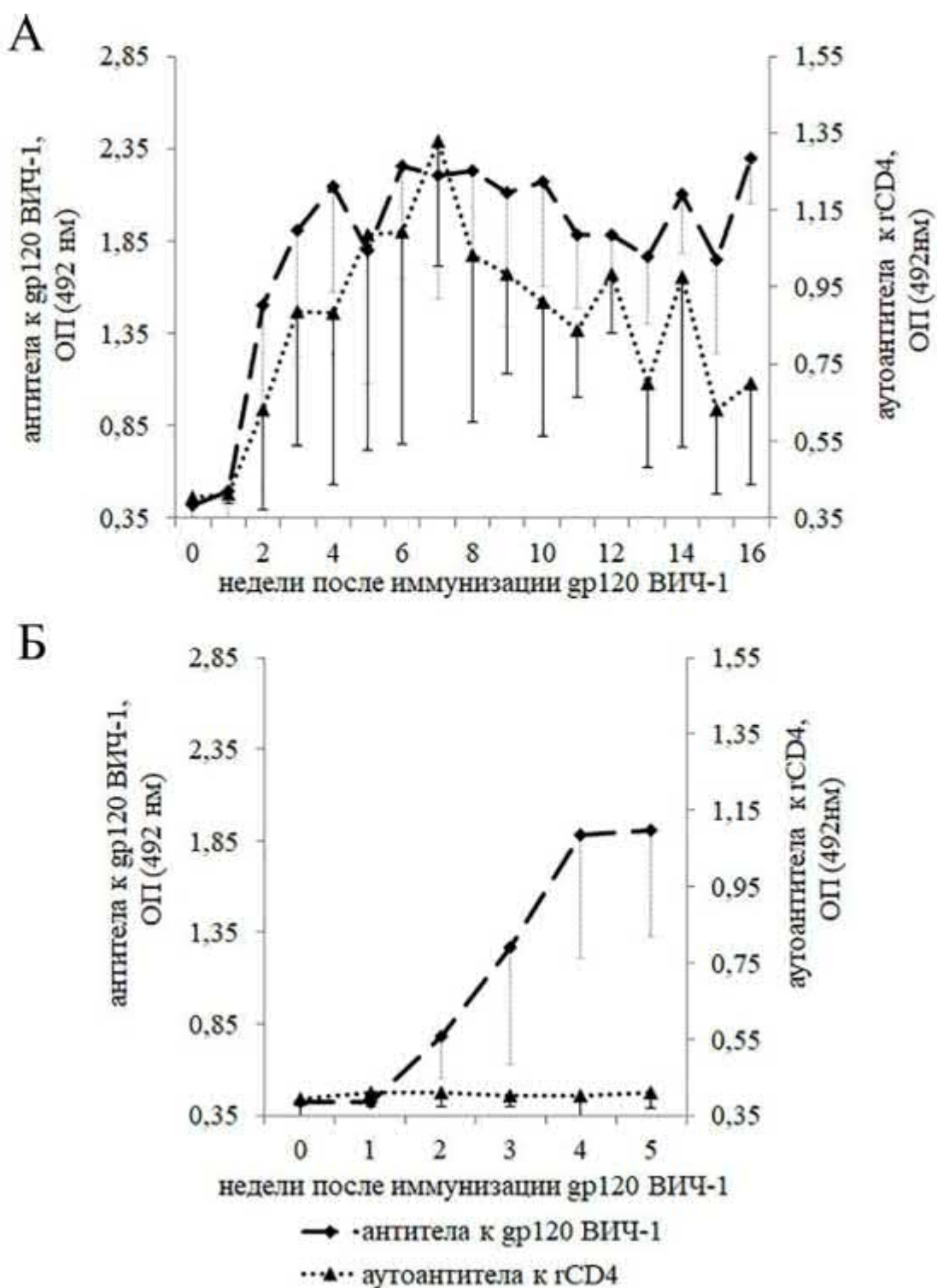


Рисунок 3.1 - Аутоантитела к rCD4 и антитела к gr120 гликопротеину ВИЧ-1 у крыс, иммунизированных gr120 ВИЧ-1 внутрикожно и развивших (А) (n=11) или не развивших (Б) (n=3) аутоиммунную реакцию против rCD4. Каждая точка представлена средним \pm SD. ОП – оптическая плотность (492 нм) при разведении плазмы в 200 раз (для антител к gr120 гликопротеину ВИЧ-1) и в 100 раз (для аутоантител к rCD4).

Уровни антител к gp120 гликопротеину ВИЧ-1 и аутоантител к rCD4 у крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1 подкожно, показаны на рисунке 3.2. На рисунке 3.2 видно, что подкожная иммунизация gp120 гликопротеином ВИЧ-1 не вызывает продукцию аутоантител к CD4. У крыс, получивших инъекцию НАФ, ни антител к gp120 ВИЧ-1, ни аутоантител к rCD4 обнаружено не было (рисунок 3.3).

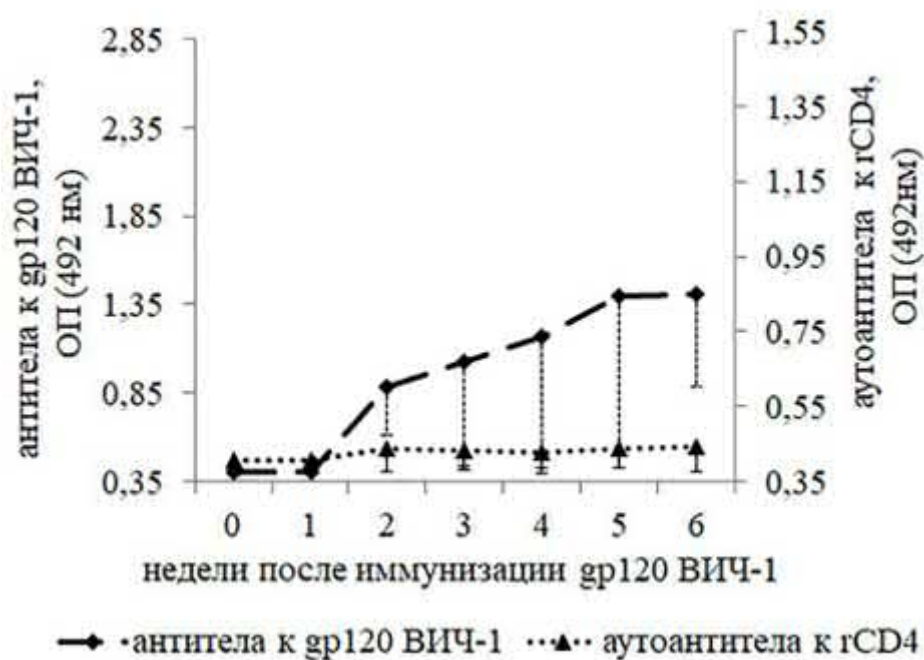


Рисунок 3.2 - Аутоантитела к rCD4 и антитела к gp120 гликопротеину ВИЧ-1 у крыс, получивших подкожную инъекцию gp120 ВИЧ-1. Каждая точка представлена средним от 5 крыс \pm SD. ОП – оптическая плотность (492 нм) при разведении плазмы в 200 раз (для антител к gp120 ВИЧ-1) и в 100 р (для аутоантител к rCD4).

Таким образом, однократная внутрикожная, но не подкожная, иммунизация крыс Wistar gp120 гликопротеином ВИЧ-1 вызывает продукцию аутоантител к rCD4.

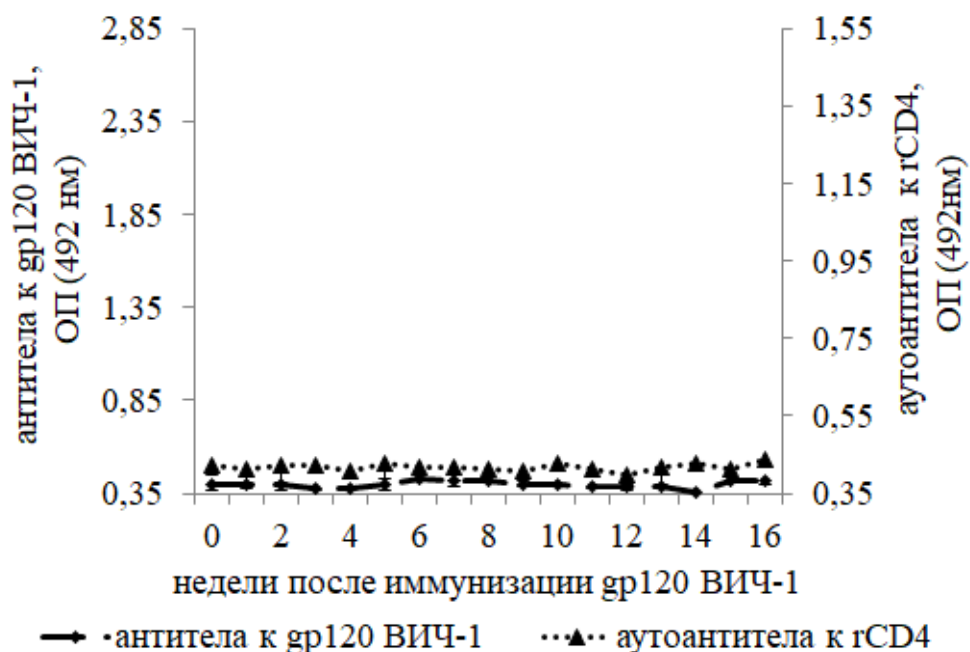


Рисунок 3.3 - Аутоантитела к rCD4 и антитела к gp120 гликопротеину ВИЧ-1 у крыс, получивших внутрикожную инъекцию НАФ. Каждая точка представлена средним от 10 крыс \pm SD. ОП – оптическая плотность (492 нм) при разведении плазмы в 200 раз (для антител к gp120 ВИЧ-1) и в 100 раз (для аутоантител к rCD4).

Известно, что gp120 гликопротеин ВИЧ-1 комплементарен CD4 рецептору Т-лимфоцитов человека, поэтому антитела к gp120 гликопротеину ВИЧ-1 и аутоантитела против CD4, выявляемые в крови ВИЧ-инфицированных людей, а соответственно, и лимфоциты их продуцирующие, связаны в идиотип-антиидиотипических взаимодействиях [40, 91, 94]. Вследствие этого у человека в ходе иммунного ответа против gp120 гликопротеина при ВИЧ-инфекции происходит индукция аутореактивных лимфоцитов, специфичных к CD4.

Для крыс ВИЧ-1 не тропен. Поэтому нам было не известно, могут ли лимфоциты крысы, специфичные к gp120 гликопротеину ВИЧ-1, вступать в идиотип-антиидиотипические взаимодействия с аутореактивными лимфоцитами против CD4 крысы и, в случае их активации gp120 гликопротеином ВИЧ-1, индуцировать аутоиммунную реакцию против CD4 крыс. Сомнения поддерживали данные литературы о наличии лишь 50% гомологии между первым

доменом CD4 молекулы человека, где находится сайт, связывания gp120 гликопротеина ВИЧ-1 и первым доменом CD4 молекулы крысы [38, 158].

Полученный факт, что антитела к CD4 крысы образуются в ответ на иммунизацию крыс Wistar gp120 гликопротеином ВИЧ-1, указывает на то, что в организме крысы лимфоциты, специфичные к gp120 гликопротеину ВИЧ-1, вступают в идиотип-антиидиотипические взаимодействия с аутореактивными лимфоцитами против CD4, и что иммунизация крыс gp120 гликопротеином ВИЧ-1 может быть использована для индукции аутоиммунной реакции против CD4⁺-лимфоцитов и изучения ее роли в гибели клеток.

Для измерения аутоантител против CD4 использовали рекомбинантный CD4 (rCD4) белок крысы. Некоторые исследователи скептически относятся к использованию рекомбинантного CD4 для выявления аутоантител, специфичных к CD4⁺-лимфоцитам, т.к. считают, что рекомбинантная форма молекулы CD4 отличается от мембраносвязанной [29, 36, 146] и поэтому антитела, связывающиеся с рекомбинантным белком, могут не иметь ничего общего с антителами против нативного белка.

Однако, антитела к рекомбинантному CD4, выявляемые у крыс Wistar в ответ на иммунизацию gp120 гликопротеином ВИЧ-1, могут возникнуть в ответ на иммунизацию gp120 ВИЧ-1 только в том случае, если лимфоциты, продуцирующие антитела, специфичные к rCD4, вступают в идиотип-антиидиотипические взаимодействия с лимфоцитами против gp120 гликопротеина ВИЧ-1, и, соответственно, несут внутренний образ gp120 гликопротеина ВИЧ-1. А если антитела к rCD4 несут внутренний образ gp120 ВИЧ-1, значит они, как и gp120 гликопротеин ВИЧ-1, специфичны к мембранной форме молекулы CD4, по крайней мере, в области связывания gp120 ВИЧ-1. Таким образом, антитела к рекомбинантному белку CD4 крысы, выявляемые в крови крыс, иммунизированных gp120 ВИЧ-1, специфичны к мембранной форме молекулы CD4 крысы. Это утверждение не противоречит результатам, полученным J.P. Cogge и соавторами, которые показали, что антиидиотипические

антитела к антителам против gp120 ВИЧ-1 связывают рекомбинантную и мембраносвязанную форму молекулы CD4 человека [40].

При первичном анализе уровня антител к gp120 гликопротеину ВИЧ-1 у крыс, продуцирующих аутоантитела к CD4 в ответ на иммунизацию gp120 ВИЧ-1, и крыс, не продуцирующих аутоантитела к CD4 (крысы, иммунизированные внутрикожно, но не развившие аутоиммунную реакцию против CD4 (рисунок 3.1Б), и крысы, не продуцирующие аутоантитела к CD4 в ответ на подкожную иммунизацию gp120 ВИЧ-1 (рисунок 3.2)) было замечено, что продукция антител к gp120 ВИЧ-1 слабее у крыс, не продуцирующих аутоантитела к CD4, по сравнению с продуцирующими. Был проведен подробный сравнительный анализ уровня антител к gp120 гликопротеину ВИЧ-1 у крыс, продуцирующих аутоантитела к rCD4 в ответ на внутрикожную иммунизацию gp120 гликопротеином ВИЧ-1, и крыс, не продуцирующих аутоантитела к rCD4 в ответ на внутрикожную или подкожную иммунизацию gp120 ВИЧ-1. Интенсивность иммунного ответа на gp120 ВИЧ-1 определяли по значению площади под кривыми, описывающими продукцию антител к gp120 ВИЧ-1 в первые 4 недели после иммунизации. Результаты представлены в таблице 3.1.

Таблица 3.1 - Среднее значение площадей под кривыми, описывающими кинетику продукции антител против gp120 ВИЧ-1, \pm SD.

	Крысы, иммунизированные gp120 ВИЧ-1 внутрикожно и развившие аутоиммунную реакцию на CD4, ед. ОП (группа I)	Крысы, иммунизированные gp120 ВИЧ-1 внутрикожно и не развившие аутоиммунную реакцию на CD4, ед. ОП (группа II)	Крысы, иммунизированные gp120 ВИЧ-1 подкожно, ед. ОП (группа III)
Среднее значение площадей под кривыми \pm SD	5,266 \pm 0,852	3,989 \pm 1,039	0,776 \pm 0,259*
Количество животных	11	3	5

* - достоверные различия с группой I, $p=0,025$, Mann-Whitney test, Prisma 5.0.

Обнаружено, что значение средней площади под кривыми, описывающими кинетику образования антител к gp120 ВИЧ-1 у крыс, иммунизированных подкожно и не имеющих аутоантител против rCD4, достоверно ниже по сравнению с таковым у крыс, иммунизированных gp120 ВИЧ-1 внутрикожно и продуцирующих аутоантитела против rCD4 ($p=0,025$, Mann-Whitney test). Поэтому можно предположить, что причиной отсутствия продукции аутоантител к rCD4 у крыс, иммунизированных gp120 ВИЧ-1, может быть слабый иммунный ответ против gp120 гликопротеина ВИЧ-1. Учитывая, что индукция аутореактивных лимфоцитов у крыс, иммунизированных gp120 ВИЧ-1, происходит через идиотип-антиидиотипические взаимодействия с лимфоцитами против gp120 гликопротеина, то наличие ассоциации между слабой иммунной реакцией против gp120 ВИЧ-1 и отсутствием продукции аутоантител к rCD4 не удивительно.

Согласно аутоиммунной гипотезе СПИДа аутоантитела к CD4 должны индуцировать гибель CD4⁺-лимфоцитов крысы. Поэтому у крыс, иммунизированных gp120 ВИЧ-1, было исследовано количество CD4⁺-лимфоцитов в крови. На рисунке 3.4 видно, что почти в каждой точке измерения количество CD4⁺-клеток меньше в крови у крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1 и развивших аутоиммунную реакцию против CD4, чем в контрольной группе крыс, получивших вместо gp120 ВИЧ-1 инъекцию НАФ.

Минимальное количество CD4⁺-клеток у крыс, иммунизированных gp120 ВИЧ-1, достигало 293 клеток в мкл крови (рисунок 3.5 слева). Пример диаграммы, типичной для крыс контрольной группы, получивших НАФ, представлен на рисунке 3.5 справа.

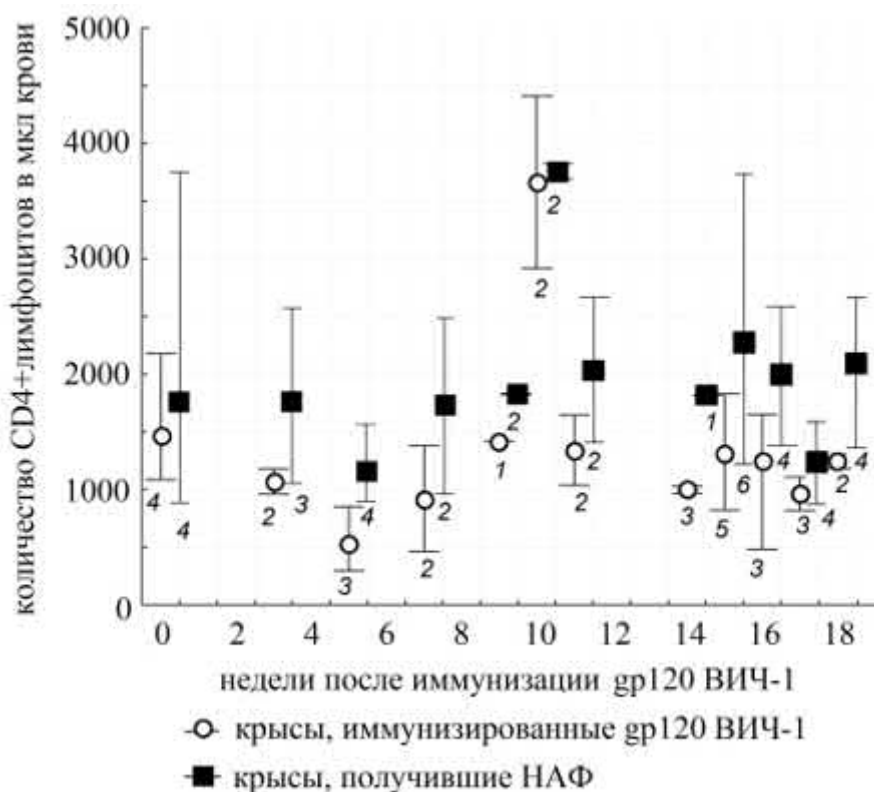


Рисунок 3.4 - Изменение количества CD4⁺-лимфоцитов у крыс, иммунизированных gp120 ВИЧ-1, и у крыс, получивших НАФ. Среднее ± SD. Цифрой указано, сколько животных было исследовано в каждой точке.

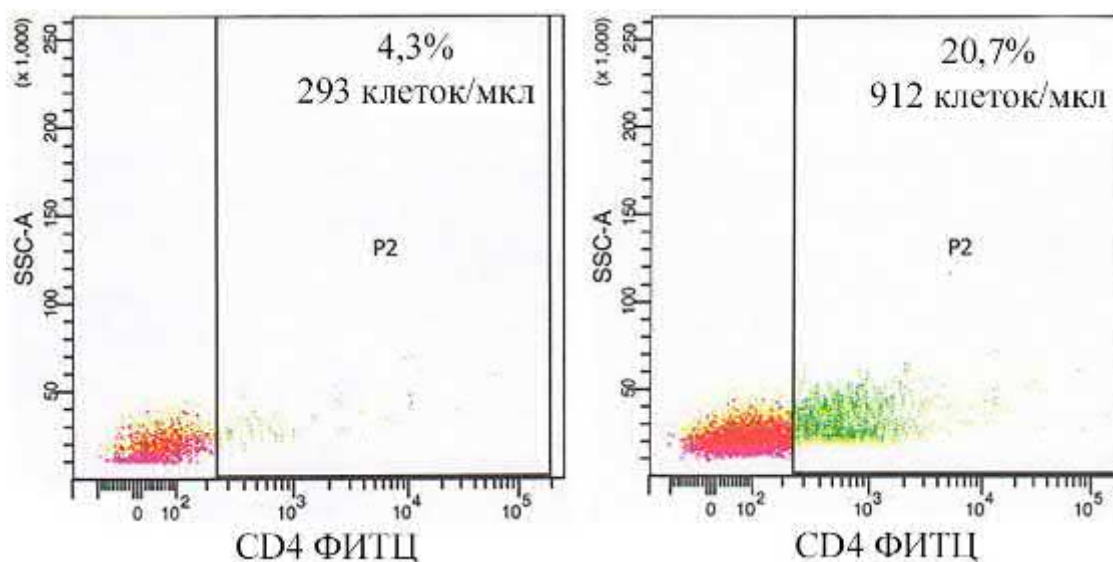


Рисунок 3.5 - Наименьшее количество CD4⁺лимфоцитов в крови крысы, иммунизированной gp120 гликопротеином ВИЧ-1 (слева) и пример диаграммы типичной для крыс, получивших инъекцию НАФ (справа). Измерения выполнены на приборе BD FACS Canto II Flow Cytometer.

Было посчитано среднее количество CD4⁺-лимфоцитов в крови крыс за весь период наблюдения (рисунок 3.6). У крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1 и продуцирующих аутоантитела к rCD4, среднее количество CD4⁺-лимфоцитов составило 1274±802 клеток в мкл крови, что достоверно ниже, чем среднее количество CD4⁺-лимфоцитов у крыс, получивших инъекцию НАФ, которое составило 1911±798 клеток в мкл крови (p=0,003, t-test, Statistica 10).

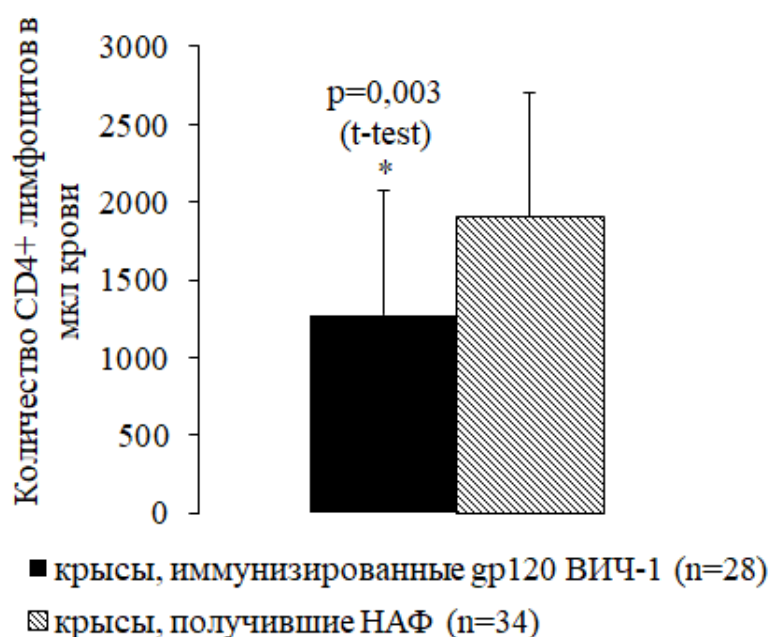


Рисунок 3.6 - Средне количество CD4⁺-лимфоцитов в крови крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1 и развивших аутоиммунную реакцию против CD4, и крыс, получивших НАФ, за весь период наблюдения. Данные представлены как среднее ± SD. n – количество исследованных образцов крови. * - достоверные различия, t-критерий Стьюдента.

Таким образом, у крыс, продуцирующих аутоантитела к CD4 в ответ на иммунизацию gp120 гликопротеином ВИЧ-1, количество CD4⁺ Т-лимфоцитов в крови ниже, чем у крыс, получивших инъекцию НАФ.

Полученные нами результаты не противоречат данным, полученным в нескольких независимых исследованиях. Так, например, Р. Keiser и соавторами

было обнаружено, что иммунизация шимпанзе gp160 гликопротеином ВИЧ-1 (предшественник gp120 и gp41 гликопротеинов) вызывает продукцию аутоантител против CD4, однако их роль в истощении CD4⁺-лимфоцитов исследована не была [93]. При испытании рекомбинантной вакцины против ВИЧ на добровольцах обнаружено, что в ответ на иммунизацию gp160 гликопротеином ВИЧ-1 у 3 из 5 добровольцев наблюдается продукция аутоантител к CD4, причем, показано, что эти антитела возникают как антиидиотипические в ответ на иммунизацию gp160 гликопротеином ВИЧ-1 [90], но, как аутоантитела влияют на количество CD4⁺-лимфоцитов, исследовано не было. Y. Kang и соавторы показали, что внутривенная иммунизация gp120 гликопротеином ВИЧ-1 трансгенных мышей, экспрессирующих CD4 человека, приводит к истощению CD3⁺-клеток в крови и лимфоидных тканях. Однако, что служило причиной гибели лимфоцитов у иммунизированных мышей было не ясно и роль аутоиммунных реакций в статье не рассматривалась [88]. Следовательно, полноценной и простой экспериментальной модели аутоиммунной реакции, индуцированной gp120 гликопротеином ВИЧ, сопровождающейся CD4⁺-лимфоцитопенией ранее получено не было.

Аутоиммунная реакция против CD4, вызванная иммунизацией gp120 гликопротеином ВИЧ-1 и сопровождающаяся CD4⁺-лимфоцитопенией у крыс Wistar, может рассматриваться как новая неинфекционная экспериментальная модель аутоиммунной CD4⁺-лимфоцитопении, возникающей при ВИЧ-инфекции. Так как аутоиммунная реакция против CD4 у крыс Wistar развивается в ходе иммунного ответа против gp120 гликопротеина ВИЧ-1, а не в результате вирусной инфекции, то данная модель служит фактом в пользу аутоиммунной гипотезы СПИДа, согласно которой основную массу гибнущих при ВИЧ-инфекции лимфоцитов составляют неинфицированные вирусом лимфоциты и причиной их гибели является аутоиммунная реакция против CD4, запускаемая gp120 гликопротеином ВИЧ-1.

Вывод по разделу 3.1. - однократная внутрикожная иммунизация gp120 гликопротеином ВИЧ-1 вызывает у крыс Wistar хроническую продукцию аутоантител к CD4 и развитие транзиторной CD4⁺-лимфоцитопении.

3.2. Роль регуляторного ревматоидного фактора и антител к альфа-цепи HLA-DR в развитии аутоиммунной реакции, индуцированной gp120 гликопротеином ВИЧ-1

3.2.1. Роль регуляторного ревматоидного фактора в развитии аутоиммунной реакции, индуцированной gp120 гликопротеином ВИЧ-1

У крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1, был исследован уровень регуляторного ревматоидного фактора в крови. Регуляторный ревматоидный фактор (регРФ) представляет собой популяцию антиидиотипических антител, специфичных к антигенраспознающим рецепторам лимфоцитов, в том числе аутореактивных. Особенностью молекул регуляторного ревматоидного фактора, отличающей их от других антиидиотипических антител, является наличие, помимо индивидуального паратопа, общего паратопа, специфичного к неозпитомам конформеров Fc фрагментов IgG. Ранее было показано, что продукция регуляторного ревматоидного фактора обеспечивает устойчивость к экспериментальным аутоиммунным заболеваниям (коллаген-индуцированный артрит у крыс, аутоиммунный энцефаломиелит у крыс) и ассоциирован с их ремиссией [24, 123]. Поэтому ожидалось, что регуляторный ревматоидный фактор может участвовать и в обеспечении устойчивости к развитию аутоиммунной реакции против CD4, вызываемой gp120 гликопротеином ВИЧ-1. Анализ уровня регуляторного ревматоидного фактора в крови крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1 (рисунок 3.7), показал, что продукция регуляторного ревматоидного фактора в ответ на иммунизацию gp120 гликопротеином ВИЧ-1 не отличается у крыс, продуцирующих аутоантитела к rCD4, и крыс, устойчивых к индукции аутоиммунной реакции, вызываемой иммунизацией gp120 ВИЧ-1, и контрольных

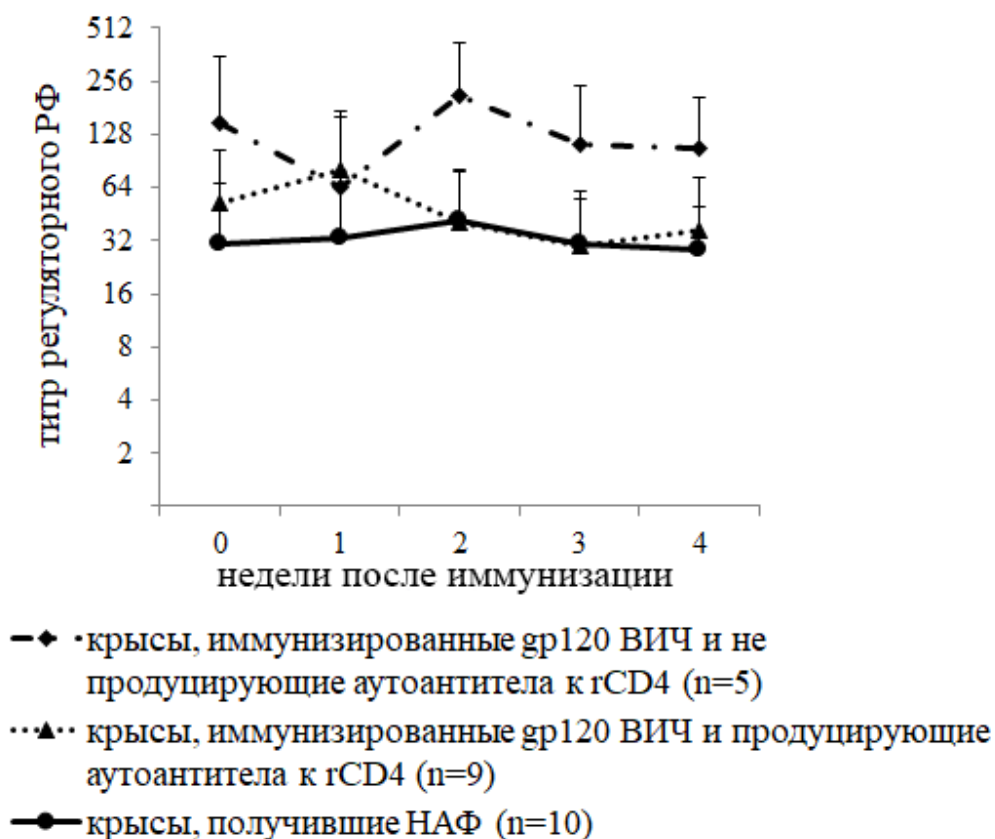


Рисунок 3.7 - Титр регуляторного ревматоидного фактора в крови крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1 внутрикожно или подкожно. Данные представлены как среднее \pm SD.

крыс, инъектированных НАФ. Следовательно, регуляторный ревматоидный фактор не принимает участие в регуляции иммунного ответа против gp120 гликопротеина ВИЧ-1 у крыс.

Ранее роль регуляторного ревматоидного фактора в предотвращении развития экспериментально вызванных аутоиммунных заболеваний была показана на экспериментальных моделях, которые характеризуются тем, что антиген-индуктор аутоиммунного заболевания и аутоантиген-мишень являются перекрестно-реагирующими антигенами [24, 25], и, соответственно, лимфоциты, распознающие данные антигены также являются перекрестно реагирующими. В частности, в модели коллаген-индуцированного артрита крыс бычий коллаген, служащий антигеном-индуктором, и аутоколлаген (аутоантиген-мишень) являются перекрестно-реагирующими антигенами, также как и основной белок

миелина морской свинки, иммунизация которым вызывает экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит, и основной белок миелина крыс (аутоантиген-мишень). Регуляторный ревматоидный фактор в этих моделях вступает в идиотип-антиидиотипические взаимодействия как с лимфоцитами против антигена индуктора, так и лимфоцитами против аутоантигена-мишени. В результате фрагмент иммунной сети, отвечающий на иммунизацию антигеном-индуктором аутоиммунного заболевания, представляет собой цепочку «трех клеток», связанных в идиотип-антиидиотипических взаимодействиях: лимфоцит специфичный к антигену-индуктору – лимфоцит, продуцирующий регуляторный ревматоидный фактор – лимфоцит специфичный к аутоантигену. Регуляторный ревматоидный фактор, продукция которого в этих моделях запускается через идиотип-антиидиотипические взаимодействия с лимфоцитами против антигена индуктора, оказывает негативное регуляторное влияние через идиотип-антиидиотипические взаимодействия не только в отношении лимфоцитов специфичных к антигену-индуктору, но и аутореактивных лимфоцитов [24, 25].

Аутореактивные лимфоциты специфичные к CD4 и лимфоциты против gp120 гликопротеина ВИЧ-1, как известно, составляют комплементарную пару идиотипический лимфоцит - антиидиотипический лимфоцит [40, 90, 94], в которой физически нет места лимфоцитам, продуцирующим регуляторный ревматоидный фактор. Поэтому факт, что регуляторный ревматоидный фактор не участвует в иммунном ответе, запускаемом gp120 гликопротеином ВИЧ-1 не удивителен.

3.2.2. Антитела к альфа-цепи HLA-DR у крыс в ходе развития аутоиммунной реакции к CD4, индуцированной посредством иммунизации gp120 гликопротеином ВИЧ-1

Чтобы выяснить, участвуют ли антитела к МНС-II в регуляции аутоиммунной реакции против CD4, запускаемой в ходе иммунного ответа против gp120 гликопротеина ВИЧ-1 у крыс Wistar, у крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1, был исследован уровень антител к альфа-цепи HLA-DR и их связь с продукцией аутоантител к rCD4. Выбор HLA-DR, т.е. антигена МНС

человека, а не крысы, для проверки гипотезы регуляторной роли антител против МНС-II в отношении аутореактивных лимфоцитов против CD4 в крысиной модели, обусловлен тем, что исследуемая аутоиммунная реакция к CD4 индуцирована gp120 гликопротеином ВИЧ-1, имеющим тропность к CD4 человека и поэтому способным через идиотип-антиидиотипические взаимодействия активировать лимфоциты против CD4 человека, а активированные лимфоциты против CD4 человека в свою очередь способны через идиотип-антиидиотипические взаимодействия активировать лимфоциты против МНС-II человека. Так как индуцируемые у крыс антитела к CD4 специфичны к rCD4 крысы, что вероятно обусловлено гомологией CD4 человека и крысы [38, 158], то можно предполагать, что лимфоциты крысы, продуцирующие аутоантитела к CD4, способны вступать в идиотип-антиидиотипические взаимодействия с лимфоцитами против МНС-II и крысы, и человека. Существование идиотип-антиидиотипических взаимодействий между лимфоцитами против МНС-II и лимфоцитами против CD4 возможно в силу комплементарности CD4 и МНС-II [76]. Использование альфа, а не бета-цепи молекулы HLA-II, для выявления антител к МНС-II обосновано сходством альфа-цепи с gp120 гликопротеином [44], а также меньшим полиморфизмом [89].

Об уровне антител к HLA-DR у крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1, судили по значению оптической плотности реакции связывания плазмы крови крыс, предварительно разведенной в 100 раз, с альфа-цепью HLA-DR, сорбированной на пластике. По уровню антител к HLA-DR исследуемые животных можно поделить на 2 группы: 1) крысы, у которых наблюдается подъем уровня антител к HLA-DR в ответ на иммунизацию gp120 гликопротеином ВИЧ-1 (n=8); 2) крысы, у которых в ответ на иммунизацию gp120 гликопротеином ВИЧ-1 не изменяется уровень антител к HLA-DR (n=8) (рисунок 3.8).

Сравнительный анализ уровня аутоантител к rCD4 у крыс, продуцирующих и не продуцирующих антитела к альфа-цепи HLA-DR, показал, что у крыс с повышением уровня антител к HLA-DR в ответ на иммунизацию gp120

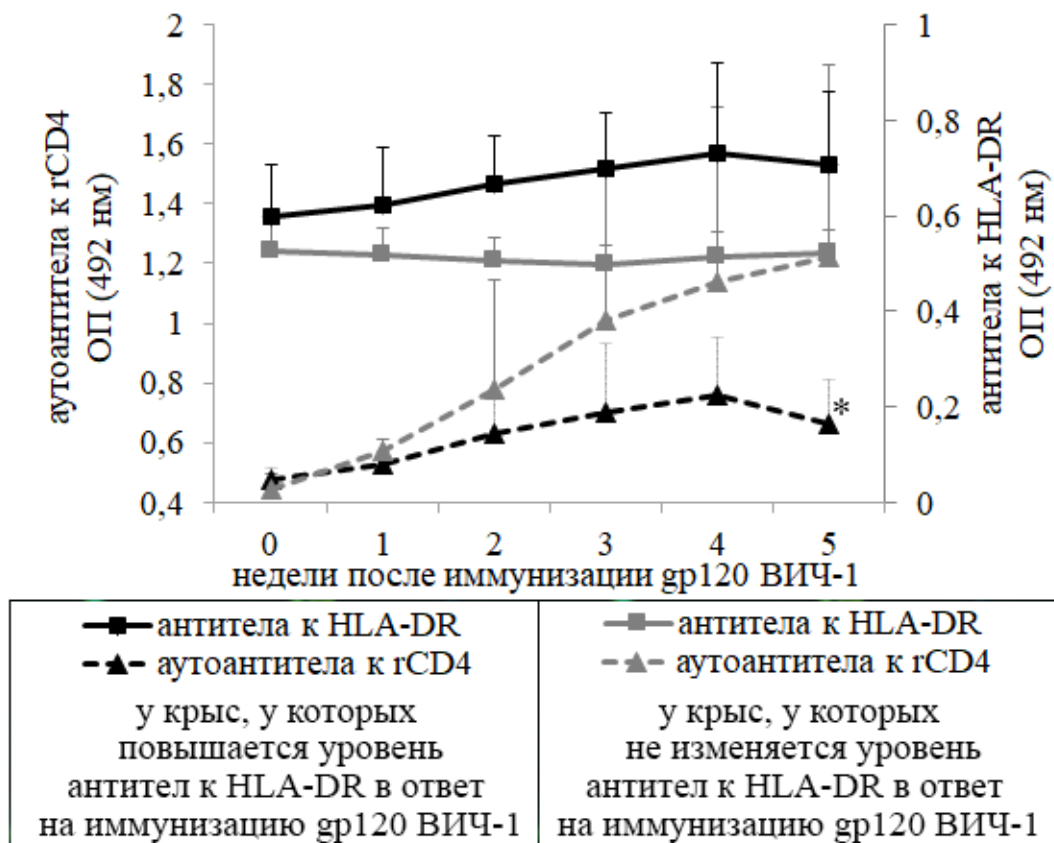


Рисунок 3.8 – Сравнение уровня аутоантител к rCD4 у крыс, продуцирующих и не продуцирующих антитела к альфа-цепи HLA-DR в ответ на иммунизацию gp120 гликопротеином ВИЧ-1. Каждая точка представлена средним от 8 крыс \pm SD. ОП – оптическая плотность (492 нм) при разведении плазмы в 100 раз. * - достоверные различия в уровне аутоантител к CD4 между крысами, продуцирующими и не продуцирующими антитела к альфа-цепи HLA-DR, $p < 0,05$, Mann Whitney test.

гликопротеином ВИЧ-1 уровень аутоантител к rCD4 ниже, чем у крыс, у которых не повышался уровень антител к HLA-DR ($p < 0,05$, Mann Whitney test) (рисунок 3.8).

Таким образом, у крыс, продуцирующих антитела к HLA-DR, уровень аутоантител к CD4 ниже, чем у крыс, не продуцирующих антитела к HLA-DR, что позволяет предполагать, что антитела к HLA-DR и лимфоциты их продуцирующие, могут участвовать в негативной регуляции продукции

аутоантител к CD4, возникающей в ответ на иммунизацию gp120 гликопротеином ВИЧ-1, посредством идиотип-антиидиотипических взаимодействий с аутореактивными лимфоцитами против CD4.

Также был проведен сравнительный анализ уровня антител к gp120 гликопротеину ВИЧ-1 у крыс, продуцирующих и не продуцирующих антитела к HLA-DR в ответ на иммунизацию gp120 гликопротеином ВИЧ-1. Различий между крысами с подъемом уровня антител к HLA-DR и крысами, у которых не изменяется уровень антител к HLA-DR в ответ на иммунизацию gp120 гликопротеином ВИЧ-1 (рисунок 3.9), не выявлено.

Таким образом, антитела к HLA-DR не принимают участие в регуляции продукции антител к gp120 гликопротеину ВИЧ-1.

Ранее роль антител к МНС была показана в экспериментах по изучению феномена протективного и терапевтического действия лимфоцитарной иммунизации при ВИЧ инфекции [103, 189]. В частности, было показано, что иммунизация лимфоцитами приводят к снижению виремии, повышению количества CD4⁺-лимфоцитов, снижению частоты возникновения оппортунистических инфекций, улучшению общего состояния и к другим положительным эффектам у ВИЧ-инфицированных больных [27], а на моделях ВЮ-инфицированных обезьян было показано, что иммунизация аллогенными или ксеногенными лимфоцитами [174, 175] предотвращает заражение их вирусом иммунодефицита обезьян. Иммунизация молекулами МНС-II может заменять иммунизацию лимфоцитами и воспроизводить ее эффекты [18]. Защитный эффект антител против МНС остался не выяснен, предполагается их нейтрализующее действие на ВИЧ, т.к. оболочка ВИЧ помимо гликопротеинов вируса имеет также мембранные белки клетки-хозяина, в т.ч. МНС [30]. Однако, влияние антител против МНС на иммунный ответ против вируса, в том числе запускаемую им аутоиммунную реакцию против CD4, исследовано ранее не было.

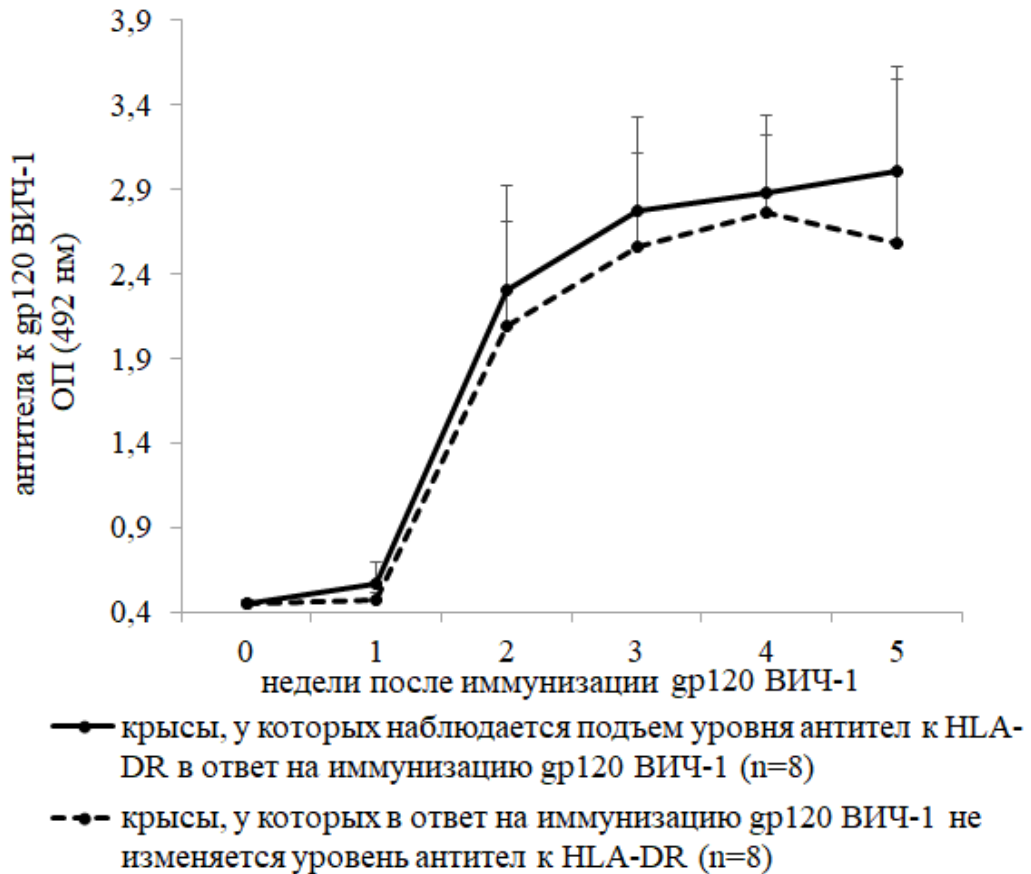


Рисунок 3.9 - Сравнение уровня продукции антител к gp120 гликопротеину ВИЧ-1 у крыс, продуцирующих и не отвечающих продукцией антител к альфа-цепи HLA-DR в ответ на иммунизацию gp120 гликопротеином ВИЧ-1. Каждая точка представлена средним от 8 крыс \pm SD. ОП – оптическая плотность (492 нм) при разведении плазмы в 200 раз.

Полученные в настоящем исследовании данные об ассоциации между наличием продукции антител к MHC-II и относительно слабым ответом против CD4 у крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1, указывают на регуляторную роль антител против MHC-II в отношении аутореактивных лимфоцитов против CD4, которую антитела против MHC-II могут выполнять через идиотип-антиидиотипические взаимодействия с аутореактивными лимфоцитами против CD4.

Вывод по разделу 3.2 - в крови крыс Wistar, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1, уровень аутоантител к CD4 ниже у крыс,

продуцирующих антитела к альфа-цепи HLA-DR, и не зависит от уровня регуляторного ревматоидного фактора.

3.3. Роль аутоантител к rCD4, индуцированных иммунизацией gp120 гликопротеином ВИЧ-1, в гибели CD4⁺-лимфоцитов

Как было показано в разделе 3.1 на рисунке 3.5, у крыс, продуцирующих аутоантитела к rCD4 в ответ на иммунизацию gp120 гликопротеином ВИЧ-1, количество CD4⁺-лимфоцитов в крови ниже, чем у крыс, получивших инъекцию НАФ.

Для выяснения существования непосредственной связи между содержанием аутоантител к rCD4 и количеством CD4⁺-лимфоцитов в крови крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1, был проведен корреляционный анализ. Достоверной корреляции между количеством CD4⁺-лимфоцитов в крови крыс, иммунизированных gp120 ВИЧ-1, и уровнем аутоантител к rCD4 ($r = 0,426$), не выявлено (рисунок 3.10).

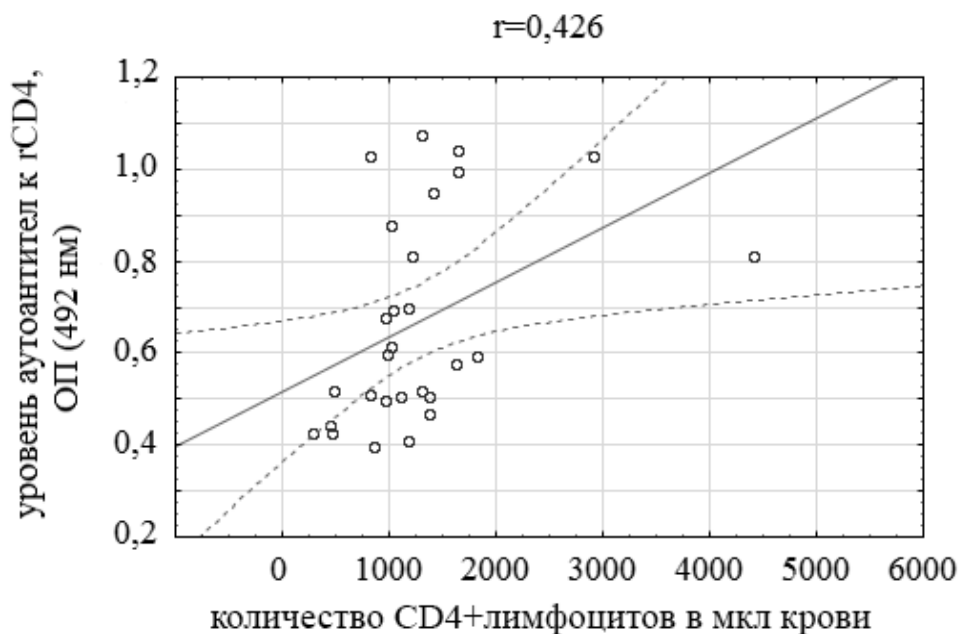


Рисунок 3.10 - Корреляционный анализ количества CD4⁺-лимфоцитов и уровня аутоантител к rCD4 в крови крыс, иммунизированных gp120 ВИЧ-1. Исследовано 28 образцов крови.

Многие исследователи определяли аутоантитела к CD4 у ВИЧ-инфицированных больных на разных стадиях заболевания. Ряд авторов обнаруживают связь повышенного уровня антител к гCD4 и снижения CD4⁺-лимфоцитов в крови ВИЧ-инфицированных больных [91, 114], другие сообщают, что корреляции между уровнем антител к гCD4 и количеством CD4⁺-лимфоцитов нет [29, 48].

Причиной отсутствия корреляции между уровнем аутоантител к CD4⁺-лимфоцитам и уровнем CD4⁺-лимфоцитов у крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1, а также у ВИЧ-инфицированных людей [40, 160, 184] может быть проявлением механизма действия аутоантител к CD4 на CD4⁺-лимфоциты. Как известно, не все антитела и аутоантитела обладают цитотоксическими свойствами. Нецитотоксические антитела, связываясь с клеткой-мишенью, не убивают ее, а могут активировать, как например аутоантитела к рецептору тиреотропного гормона при болезни Грейвса [127], либо блокировать рецепторы клетки, как например аутоантитела к рецептору ацетилхолина при миастении гравис [185]. Возможно, аутоантитела к CD4, индуцируемые у крыс посредством иммунизации gp120 ВИЧ-1, не являются цитотоксическими, не убивают CD4⁺-лимфоциты, а вызывают их активацию, которая может реализоваться в пролиферацию или апоптоз лимфоцитов [29, 114]. Данное предположение не противоречит данным литературы, о том, что при ВИЧ-инфекции наблюдается повышенный уровень активации и пролиферации CD4⁺-лимфоцитов [13, 61], и увеличение количества чувствительных к апоптозу клеток, определяемых по повышенной экспрессии Fas/FasL молекул на мембране, причем число таких клеток увеличивается по мере прогрессирования заболевания [13, 61].

Вывод по разделу 3.3 - уровень CD4⁺-лимфоцитов в крови крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1 и развивших аутоиммунную реакцию против CD4, ниже, чем в крови крыс, инъецированных НАФ, но он не коррелирует с уровнем аутоантител к CD4⁺-лимфоцитам в крови.

3.4. Механизм гибели CD4⁺-лимфоцитов в крови крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1

При индивидуальном анализе кинетики аутоантител к rCD4, регуляторного ревматоидного фактора и изменения количества CD4⁺-лимфоцитов в периферической крови крыс, иммунизированных gp120 ВИЧ-1, было замечено, что снижение количества CD4⁺-лимфоцитов в крови совпадает со спонтанным повышением уровня регРФ в крови крыс (рисунок 3.11).

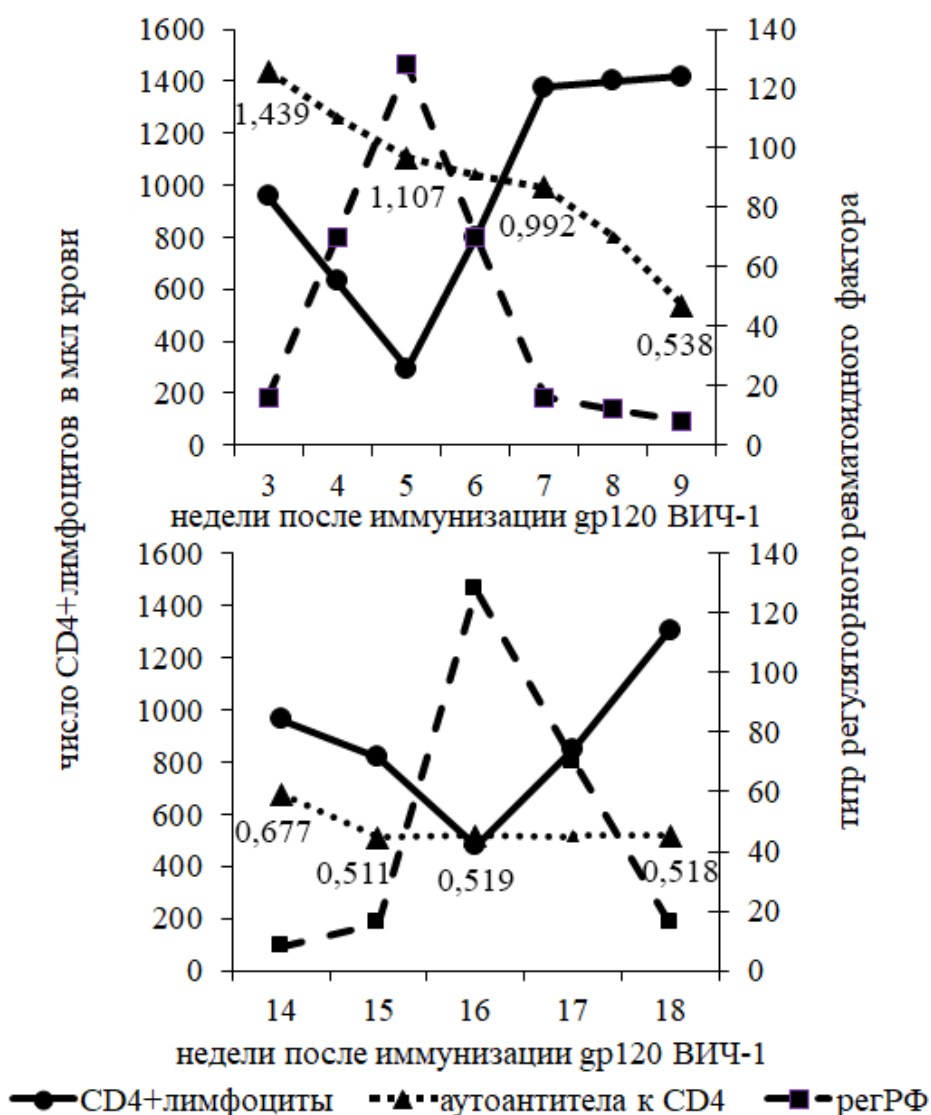


Рисунок 3.11 – Связь между уровнем регуляторного ревматоидного фактора, уровнем аутоантител к rCD4 и количеством CD4⁺-лимфоцитов в крови крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1. Индивидуальные данные. Уровень аутоантител к rCD4 представлен как оптическая плотность плазмы, предварительно разбавленной в 100 раз.

Чтобы выяснить, действительно ли количество $CD4^+$ -лимфоцитов связано с уровнем регуляторного ревматоидного фактора (регРФ) в крови крыс, продуцирующих аутоантитела к rCD4 в ответ на иммунизацию gp120 ВИЧ-1, исследованные образцы крови крыс, продуцирующих аутоантитела к rCD4, были поделены на две группы: группу, характеризующуюся относительно низким уровнем регРФ в крови (титр регРФ $\leq 1:16$) и группу характеризующуюся относительно высоким уровнем регРФ в крови (титр регРФ $> 1:16$) (рисунок 3.12.).

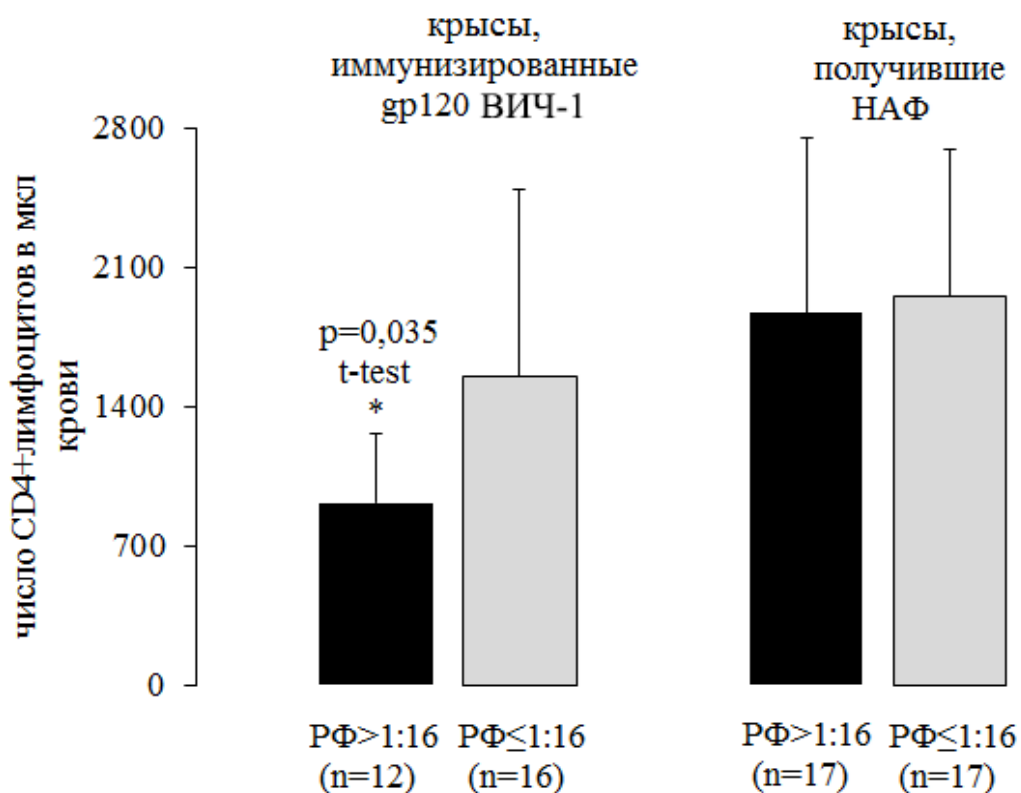


Рисунок 3.12 - Среднее количество $CD4^+$ -лимфоцитов в крови крыс иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1, и в крови крыс, получивших инъекцию неполного адьюванта Фрейнда (НАФ), при относительно высоком (титр $> 1:16$) и при относительно низком (титр $\leq 1:16$) уровне регуляторного ревматоидного фактора. n – количество исследованных образцов. Данные представлены как среднее \pm SD. * - достоверные различия, t-критерий Стьюдента, Statistica 10.0.

Сравнительный анализ количества CD4⁺-лимфоцитов в образцах крови с относительно высоким уровнем регРФ (титр > 1:16) и в образцах крови с относительно низким уровнем регРФ (титр ≤ 1:16) показал, что количество CD4⁺-лимфоцитов в крови крыс, иммунизированных gp120 ВИЧ-1, при высоком уровне регуляторного ревматоидного фактора ниже (911±350 CD4⁺-лимфоцитов в мкл крови), чем при низком уровне регуляторного ревматоидного фактора (1546±940 CD4⁺-лимфоцитов в мкл крови) (рисунок 3.12). У контрольных крыс, получивших инъекцию НАФ вместо иммунизации gp120 гликопротеином ВИЧ-1, различий в количестве CD4⁺-лимфоцитов в крови крыс с относительно высоким и относительно низким уровнем регуляторного ревматоидного фактора обнаружено не было (рисунок 3.12).

Представленные выше данные анализа связи между уровнем регРФ и количеством CD4⁺-лимфоцитов в крови являются результатами нескольких серий экспериментов, проведенных в разное время. Для того, чтобы провести корреляционный анализ, определяющий наличие или отсутствие достоверной связи между снижением числа CD4⁺-лимфоцитов и повышением уровня регРФ в крови иммунизированных животных, был проведен отдельный эксперимент. Три крысы были иммунизированы gp120 гликопротеином ВИЧ-1 внутрикожно, четверым ввели НАФ. У всех животных измеряли количество CD4⁺-лимфоцитов в течение 4 недель, начиная с 3 недели после иммунизации. Ежеженедельно у исследуемых крыс отбирали и замораживали плазму крови, в которой затем измеряли уровень регуляторного ревматоидного фактора одновременно за весь период наблюдения. Анализ связи между количеством CD4⁺-лимфоцитов и уровнем регРФ в крови крыс выявил достоверную отрицательную связь между количеством CD4⁺-лимфоцитов и уровнем регРФ в крови крыс иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1 и развивших аутоиммунную реакцию против rCD4 ($r=0,7370$, $p<0,05$) (рисунок 3.13 А). У крыс, инъецированных НАФ, связи между количеством CD4⁺-лимфоцитов и уровнем регРФ в крови выявлено не было (рисунок 3.13 Б).

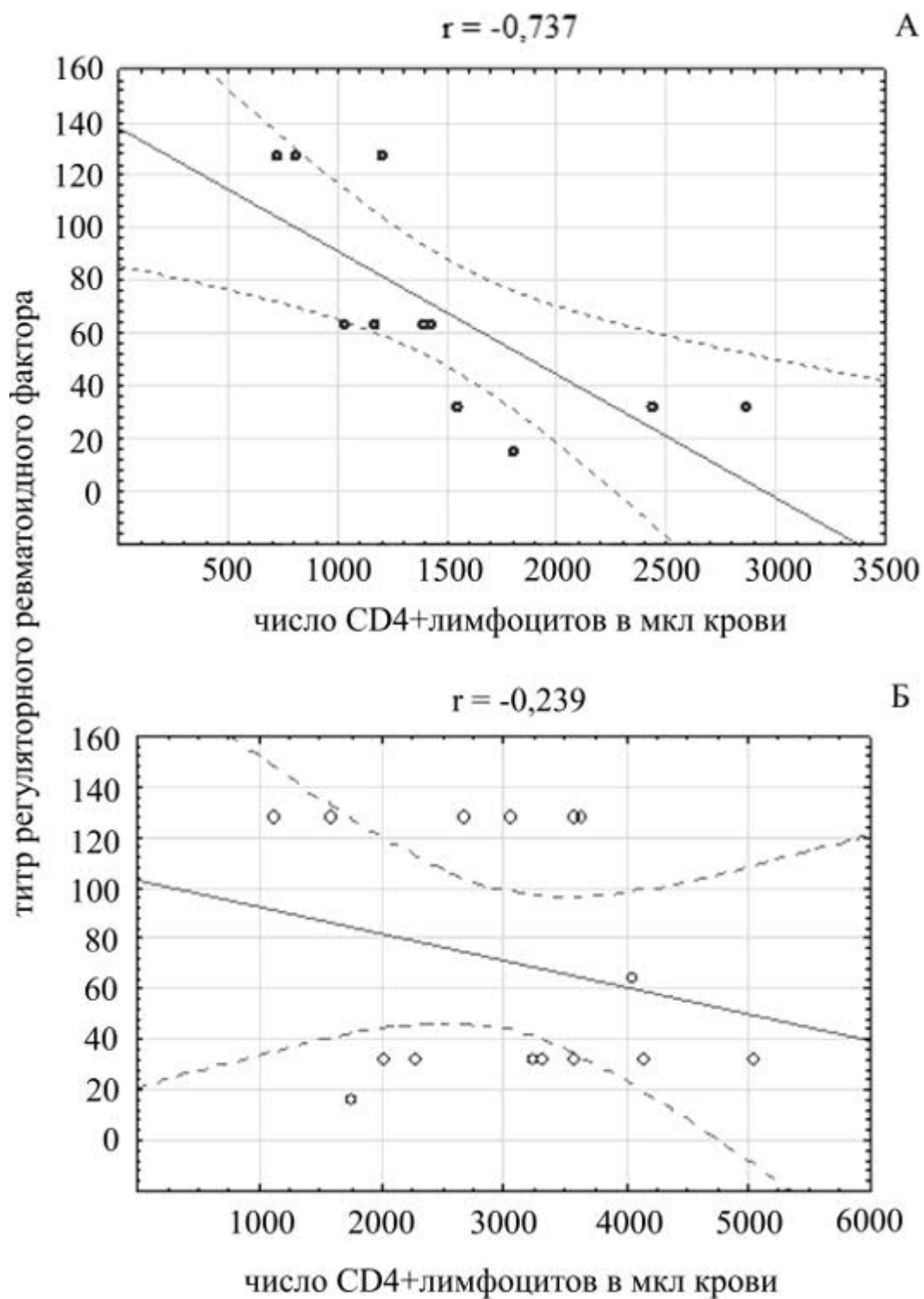


Рисунок 3.13 - Корреляционный анализ уровня регуляторного ревматоидного фактора и количества CD4⁺-лимфоцитов в крови крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1 (А) и крыс, получивших инъекцию НАФ (Б).

Полученные данные позволяют предположить, что гибель CD4⁺-лимфоцитов у крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1, происходит в результате совместного действия аутоантител к CD4 и регуляторного ревматоидного фактора. Чтобы проверить данное предположение, был проведен дополнительный эксперимент *in vitro*.

Лимфоциты, полученные из периферической крови интактных крыс, инкубировали в течение 24 часов с плазмой, содержащей аутоантитела к CD4, полученной от крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1. Затем добавляли плазму, содержащую регуляторный ревматоидный фактор (титр >1:16), полученную от интактных крыс. Было обнаружено, что лимфоциты, предварительно инкубированные с плазмой, содержащей аутоантитела к CD4, гибнут после обработки их плазмой, содержащей регРФ (рисунок 3.14). Не наблюдается гибели клеток, если плазму, не содержащую регРФ, добавить к лимфоцитам, предварительно инкубированным с плазмой, содержащей аутоантитела к CD4. Также клетки остаются живыми, если плазму, содержащую регРФ, добавить к лимфоцитам, предварительно инкубированным с плазмой, не содержащей аутоантитела к CD4. То есть ни аутоантитела к CD4, ни регРФ по отдельности не индуцируют гибель CD4⁺-лимфоцитов.

Таким образом, *in vitro* исследования роли аутоантител к CD4 и регуляторного ревматоидного фактора в гибели CD4⁺-лимфоцитов, как и результаты, полученные на экспериментальной модели аутоиммунной CD4⁺-лимфоцитопении крыс, вызванной иммунизацией gp120 гликопротеином ВИЧ-1, свидетельствуют о том, что причиной развития CD4⁺-лимфоцитопении у крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1, является совместное действие аутоантител к CD4 и регуляторного ревматоидного фактора. Действие этих факторов может быть разделено во времени.

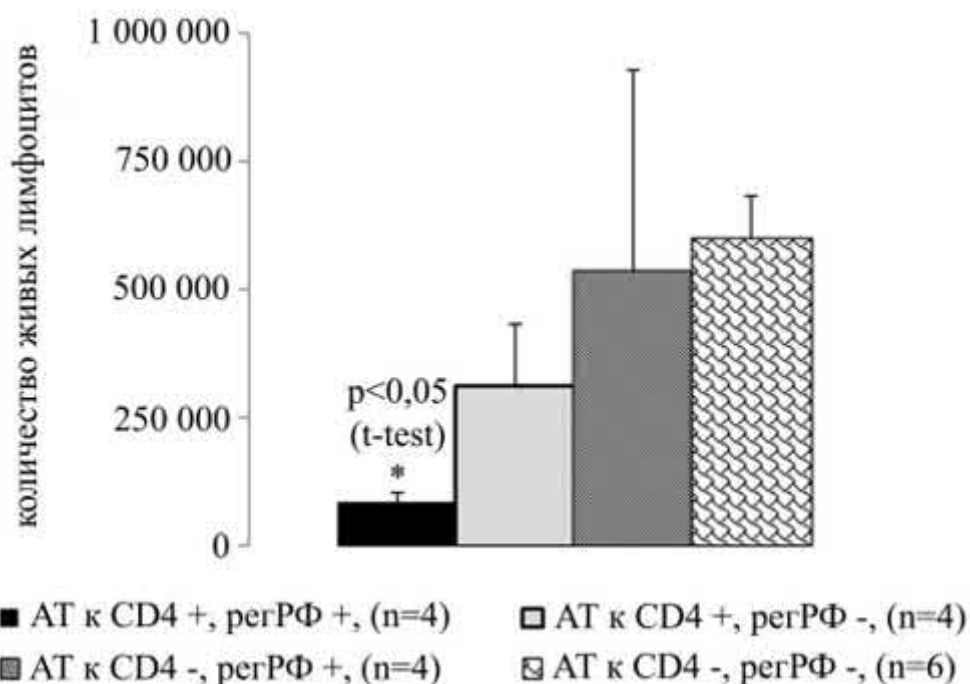


Рисунок 3.14 - Гибель лимфоцитов, инкубированных с плазмой, полученной от gp120-иммунизированных крыс и содержащей аутоантитела против CD4, и впоследствии обработанных плазмой, содержащей регуляторный ревматоидный фактор (среднее ± SD). * - достоверные различия, Mann Whitney test, Prisma 5.

Полученные данные о роли регуляторного ревматоидного фактора в гибели CD4⁺-лимфоцитов в присутствии аутоантител к CD4 не противоречат результатам, полученным С. Susal и соавторами, которые показали обратную связь между соотношением «антитела против Fab/антитела против rCD4» и уровнем CD4⁺ Т-лимфоцитов у больных СПИДом. Антитела к Fab фрагментам и регРФ имеют общие характеристики. И те и другие специфичны к Fab и осуществляют негативную регуляцию иммунного ответа [179].

Факт, что два сигнала (аутоантитела к CD4 и регуляторный ревматоидный фактор) необходимы для гибели CD4⁺-лимфоцитов у иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1 крыс согласуется с гипотезой активационно-индуцированной гибели CD4⁺-лимфоцитов. Механизм активационно-индуцированной гибели рассматривается сегодня многими авторами в качестве основного молекулярно-клеточного механизма гибели неинфицированных вирусом CD4⁺ Т-лимфоцитов в крови ВИЧ-инфицированных больных. Согласно

гипотезе активационно-индуцированной гибели необходимо последовательное действие двух факторов на незараженные CD4⁺ Т-лимфоциты: фактора активации клеток и фактора, который убивает активированные клетки [13, 20, 57, 61, 71, 128]. Между активацией и киллингом лимфоциты могут циркулировать.

Мы предполагаем, что регуляторный ревматоидный фактор, присутствующий в крови в норме, выступает для CD4⁺ Т-лимфоцитов, ранее уже активированных аутоантителами к CD4, в качестве второго активационного сигнала, т.е. сигнала, ведущего к гибели. Основанием для данного предположения служат знания о механизме предотвращения развития агрессивных аутоиммунных реакций регуляторным ревматоидным фактором, полученные нами на модели экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита. На данной модели показано, что регРФ предотвращает развитие аутоиммунного заболевания посредством сдерживания экспансии активированных антигеном CD4⁺-лимфоцитов, убивая их. Так, у крыс, продуцирующих регРФ в ответ на иммунизацию основным белком миелина, количество CD4⁺-лимфоцитов в регионарных лимфоузлах было ниже, чем у крыс, не продуцирующих регРФ [172]. *In vitro* сыворотка крови, полученная от крыс, иммунизированных основным белком миелина, и содержащая регРФ, убивала активированные основным белком миелина CD4⁺ Т-лимфоциты *in vitro*, тогда как наивные лимфоциты не являлись ее мишенью [172]. Мы предполагаем, что регРФ отличает активированные CD4⁺ Т-лимфоциты от неактивированных с помощью общего паратопа, специфичного к индуцибельной молекуле активации CD4⁺-лимфоцитов, несущей такие же неопитопы, что и конформеры Fc фрагментов, специфичные к регРФ.

Возможно, что при ВИЧ-инфекции аутоантитела к CD4 вызывают поликлональную активацию CD4⁺-лимфоцитов [29, 114], и последние, независимо от их специфичности, становятся мишенью цитопатического действия регуляторного ревматоидного фактора. Таким образом, аутоантитела к CD4 вовлекают естественно существующий в крови регуляторный ревматоидный фактор в патологический процесс истощения CD4⁺-лимфоцитов. Гипотетическая схема, объясняющая механизм совместного действия аутоантител к CD4 и

регуляторного ревматоидного фактора на CD4⁺-лимфоциты показана на рисунке 3.15.

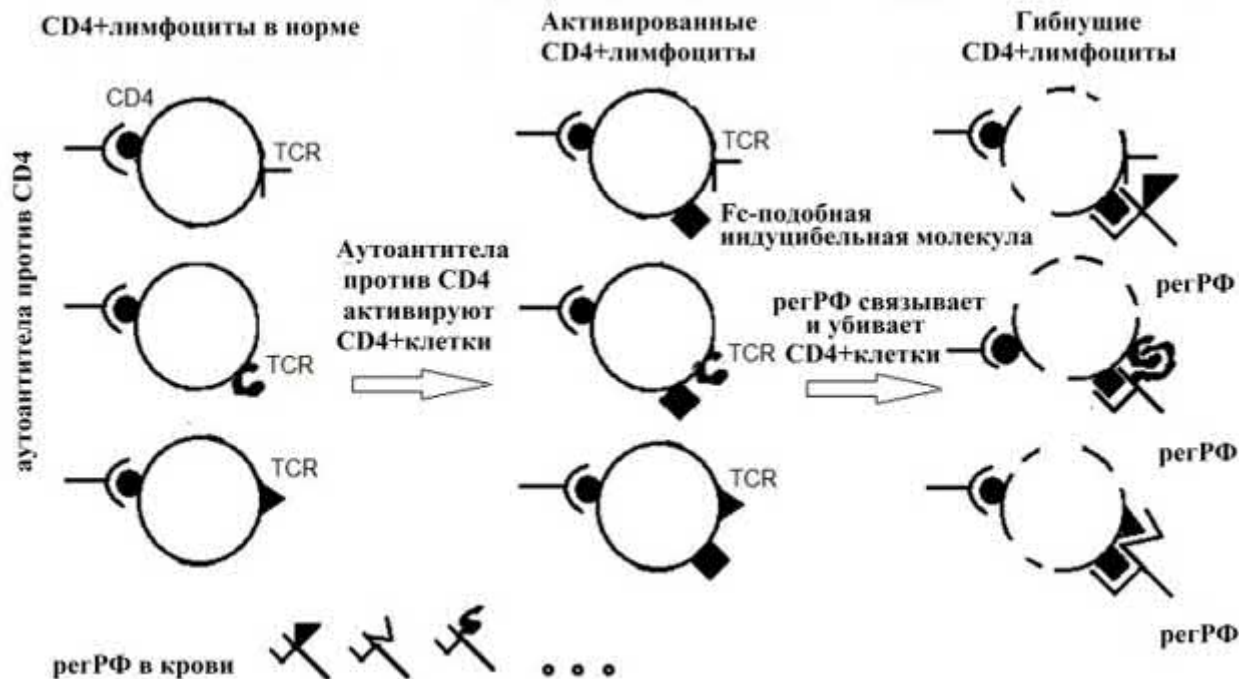


Рисунок 3.15 - Гипотетическая схема гибели неинфицированных CD4⁺-лимфоцитов при ВИЧ-инфекции. В норме в крови присутствует регуляторный ревматоидный фактор, функцией которого является сдерживание экспансии активированных CD4⁺ Т-лимфоцитов посредством их киллинга. Аутоантитела к CD4, продуцируемые в ответ на иммунизацию gp120 гликопротеином ВИЧ-1, вызывают поликлональную активацию CD4⁺ Т-лимфоцитов и тем самым делают CD4⁺ Т-лимфоциты мишенью цитопатического действия регуляторного ревматоидного фактора. Антигеном, который узнает регуляторный ревматоидный фактор на активированных лимфоцитах, может быть молекула активации, подобная конформерам Fc фрагментов IgG, к которым специфичен общий паратоп регуляторного ревматоидного фактора.

Вывод по разделу 3.4. - CD4⁺-лимфоциты в крови крыс, продуцирующих аутоантитела к CD4 в ответ на иммунизацию gp120 гликопротеином ВИЧ-1, и CD4⁺-лимфоциты *in vitro*, обработанные плазмой, содержащей аутоантитела к

CD4 и полученной от gp120-иммунизированных крыс, погибают под действием регуляторного ревматоидного фактора, естественно присутствующего в крови.

Материалы данной главы представлены в следующих публикациях.

1. **Храмова, Т.В.** Продукция аутоантител к CD4 у негуманизированных крыс в ответ на иммунизацию gp 120 белком ВИЧ / Т.В. Храмова, Л.В. Бедулева, Т.О. Толстолуцкая, К.М. Вахрушева, С.Ю. Березкина, М.М. Гусева // Современная медицина: актуальные вопросы. – 2014. – № 35. – С.71-76.
2. **Храмова, Т.В.** Механизм развития CD4+лимфоцитопении у крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1, и исследование возможности формирования толерантности к gp120 ВИЧ-1 с помощью циклоспорина А / Т.В. Храмова, С.Ю. Березкина, К.М. Вахрушева; науч. рук. Л.В. Бедулева // Материалы XLIII итоговой студенческой научной конференции Удмуртского государственного университета. – Ижевск: Удмуртский университет, 2015. – С. 57-59.
3. **Храмова, Т.В.** Роль ревматоидного фактора в гибели CD4⁺ лимфоцитов у крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1 / Т.В. Храмова, Л.В. Бедулева, С.Ю. Березкина, И.В. Меньшиков // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9, № 2-1. – С. 540-542.
4. **Храмова, Т.В.** Исследование механизма гибели CD4+лимфоцитов у крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1 / Т.В. Храмова, Л.В. Бедулева, С.Ю. Березкина, И.В. Меньшиков, Т.О. Толстолуцкая, К.М. Вахрушева // Медицинская иммунология. – 2015. – Т. 17, № 5. – С. 150-151.
5. **Menshikov, I.** The idiotypic network in the regulation of autoimmunity: Theoretical and experimental studies / I. Menshikov, L. Beduleva, M. Frolov, N. Abisheva, **T. Khramova**, E. Stolyarova, K. Fomina // Journal of Theoretical Biology. – 2015. - Vol. 375. – P.32-39. DOI: 10.1016/j.jtbi.2014.10.003.
6. **Beduleva, L.** Combined action of anti-CD4 autoantibodies and rheumatoid factor in the development of CD4 lymphocytopenia in rats immunized with HIV-1 gp120 / L. Beduleva, **T. Khramova**, I. Menshikov, E. Stolyarova, S.

Pavlova // AIDS Research and Human Retroviruses. – 2016. - Vol. 32, № 12. – P. 1173-1179. DOI: 10.1089/aid.2015.0358.

7. **Храмова, Т.В. Экспериментальная модель аутоиммунной CD4+лимфоцитопении у крыс, вызванная иммунизацией gp120 ВИЧ / Т.В. Храмова, А.Я. Снигирев, Л.В. Бедулева, И.В. Меншиков, О.Б. Горбунов // Инфекционные болезни. – 2016. – Т.14, № S1. – С. 299.**

8. **Храмова, Т.В. Регуляторный ревматоидный фактор убивает активированные лимфоциты / Т.В. Храмова, Е.Ю. Столярова, С.Ю. Павлова // Научно-практическая ревматология. – 2016. – Т. 54, № S3. – С. 62.**

9. **Храмова, Т.В. Роль аутоантител к CD4 и регуляторного ревматоидного фактора в гибели CD4⁺ лимфоцитов у крыс, иммунизированных gp120 ВИЧ-1 / Т.В. Храмова, А.Я. Снигирев, В.С. Ворожцова, А.М. Вайтина // Медицинская иммунология. – 2017. – Т.19, № S. – С. 70.**

10. **Stolyarova, E. Mechanism by which regulatory rheumatoid factor prevents experimental autoimmune encephalomyelitis / E. Stolyarova, L. Beduleva, I. Menshikov, A. Snigiryev, T. Khramova // Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Target. – 2018. – Vol.18, №6. – P.596-601. DOI: 10.2174/1871530318666180308123350.**

11. **Храмова, Т.В. Исследование эффективности иммунизации лимфоцитами для предотвращения развития аутоиммунной реакции против CD4+ лимфоцитов, запускаемой GP120 ВИЧ / Т.В. Храмова; науч. рук. Л.В. Бедулева // Материалы XLVII итоговой студенческой научной конференции Удмуртского государственного университета. – Ижевск: Удмуртский университет, 2019. – С. 68-70.**

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Аутоиммунная гипотеза СПИДа, предложенная вскоре после описания его первых случаев, говорит о том, что причиной истощения CD4⁺ Т-лимфоцитов, ведущего к развитию СПИДа при ВИЧ-инфекции, является не столько сам вирус, сколько аутоиммунная реакция против CD4⁺-лимфоцитов, запускаемая gp120 гликопротеином вируса и убивающая незараженные CD4⁺ Т-клетки [1, 93]. Однако после открытия ВИЧ, исследования главным образом сфокусировались на изучении природы вируса, его генетики, жизненного цикла и иммунного ответа, способного нейтрализовать ВИЧ. Аутоиммунная гипотеза СПИДа получила много разнообразных фактов в свою пользу, однако не достаточно для ее полного принятия и смены парадигмы. Сегодня, в связи с накопившимися фактами, которые не удается объяснить в рамках существующих представлений о ВИЧ-инфекции как классической инфекции, в частности отсутствие вакцины, нечувствительность некоторых пациентов к антиретровирусной терапии, а также понимание, что основную массу гибнущих CD4⁺ Т-лимфоцитов составляют неинфицированные клетки, интерес к аутоиммунной гипотезе СПИДа возобновлен [102, 114, 115].

Результаты данного исследования указывают на то, что gp120 гликопротеин ВИЧ-1 может вызывать продукцию аутоантител против CD4 вследствие наличия между лимфоцитами, специфичными к gp120 гликопротеину ВИЧ-1, и аутореактивными лимфоцитами против CD4 идиотип-антиидиотипических взаимодействий, даже у крыс Wistar. Индуцируемая иммунизацией gp120 гликопротеином ВИЧ-1 аутоиммунная реакция против CD4, как и ожидалось, приводит к развитию CD4⁺-лимфоцитопении у иммунизированных крыс. Также, как и многие исследователи, измерявшие аутоантитела к CD4 у ВИЧ-инфицированных больных, мы не выявили корреляции между уровнем аутоантител к CD4 и количеством CD4⁺-лимфоцитов в крови крыс, иммунизированных gp120 ВИЧ-1. Таким образом, аутоантитела к CD4,

образующиеся в ходе иммунного ответа к gp120 ВИЧ-1, непосредственно не убивают CD4⁺ Т-лимфоциты.

В ходе исследования обнаружено, что гибель CD4⁺-лимфоцитов у крыс, иммунизированных gp120 ВИЧ-1 и продуцирующих аутоантитела против CD4, ассоциирована с повышением уровня регуляторного ревматоидного фактора, присутствующего в норме в крови. Регуляторный ревматоидный фактор представляет собой популяцию антиидиотипических антител, специфичных к антигенраспознающим рецепторам лимфоцитов, в том числе аутореактивных. Особенностью молекул регуляторного ревматоидного фактора, отличающей их от других антиидиотипических антител, является наличие, помимо индивидуального паратопа, общего паратопа, специфичного к неозпитомам конформеров Fc фрагментов IgG [24, 123, 162]. В норме механизм иммунорегуляторного действия регуляторного ревматоидного фактора заключается в сдерживании экспансии лимфоцитов посредством киллинга активированных лимфоцитов [171].

В эксперименте *in vitro* показано, что мононуклеары, полученные от интактных крыс, гибнут после обработки их плазмой, содержащей аутоантитела к CD4, полученной от крыс иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1, и последующего воздействия плазмы, содержащей регуляторный ревматоидный фактор. Воздействие на лимфоциты только аутоантител к CD4 или только регуляторного ревматоидного фактора не приводит к гибели клеток.

Таким образом, истощение CD4⁺-лимфоцитов у крыс, иммунизированных gp120 ВИЧ-1, является результатом совместного действия аутоантител к CD4 и регуляторного ревматоидного фактора. Мы предполагаем, что аутоантитела к CD4 приводят к генерализованной активации CD4⁺-лимфоцитов, а регуляторный ревматоидный фактор, присутствующий в крови в норме, выступает для активированных CD4⁺-лимфоцитов в качестве второго активационного сигнала, т.е. сигнала, ведущего к гибели.

Понимание того, что основной причиной гибели CD4⁺-лимфоцитов при ВИЧ-инфекции является аутоиммунная реакция против CD4, индуцируемая белками ВИЧ, открывает новое направление в создании эффективных средств

лечения и профилактики ВИЧ-инфекции. Становится понятно, что для предотвращения иммунодефицита, развивающегося при ВИЧ-инфекции, необходимо найти способы блокирования развития аутоиммунной реакции против CD4⁺-лимфоцитов. Разработанная в ходе данного исследования модель аутоиммунной CD4⁺-лимфоцитопении у крыс, индуцированной иммунизацией gp120 гликопротеином ВИЧ-1, может быть полезна для исследования таких подходов.

ВЫВОДЫ

1. Однократная внутрикожная иммунизация gp120 гликопротеином ВИЧ-1 вызывает у крыс Wistar продукцию аутоантител к CD4 и развитие транзиторной CD4⁺-лимфоцитопении.
2. В крови крыс Wistar, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1, уровень аутоантител к CD4 ниже у крыс, продуцирующих антитела к альфа-цепи HLA-DR, и не зависит от уровня регуляторного ревматоидного фактора.
3. Количество CD4⁺-лимфоцитов в крови крыс, продуцирующих аутоантитела к CD4 в ответ на иммунизацию gp120 гликопротеином ВИЧ-1, ниже, чем в крови крыс, получивших инъекцию неполного адьюванта Фрейнда, однако аутоантитела к CD4, продуцируемые в ответ на иммунизацию gp120 гликопротеином ВИЧ-1, не коррелируют с количеством CD4⁺-лимфоцитов в крови крыс и не вызывают гибель CD4⁺-лимфоцитов *in vitro*.
4. Низкий уровень CD4⁺-лимфоцитов в крови крыс, продуцирующих аутоантитела к CD4 в ответ на иммунизацию gp120 гликопротеином ВИЧ-1, наблюдается у крыс, имеющих относительно высокий уровень регуляторного ревматоидного фактора в крови.
5. *In vitro* гибель лимфоцитов крыс происходит после их предварительной обработки плазмой, содержащей аутоантитела к CD4, полученной от крыс, иммунизированных gp120 гликопротеином ВИЧ-1, и последующей обработки плазмой, содержащей регуляторный ревматоидный фактор.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Полученные в настоящем исследовании данные следует включить в учебные курсы «иммунология», «клиническая иммунология» для студентов биологических и медицинских высших учебных заведений.

Результаты исследования указывают на то, что необходимо рассмотреть новые подходы к созданию профилактических и терапевтических вакцин от ВИЧ-инфекции/СПИДа, основанные не на индукции сильного нейтрализующего гуморального или клеточного иммунного ответа, но на предотвращении развития аутоиммунных реакций против CD4⁺-лимфоцитов.

Полученные данные в пользу ключевой роли аутоантител в развитии CD4⁺ Т-лимфоцитопении и роли иммунного ответа против gp120 гликопротеина ВИЧ-1 в их индукции обосновывают необходимость раннего назначения антиретровирусной терапии при ВИЧ-инфекции.

В клинических исследованиях целесообразно на ранних этапах ВИЧ-инфекции измерять уровень аутоантител к CD4⁺-лимфоцитам и уровень регуляторного ревматоидного фактора в крови в качестве прогностических показателей развития ВИЧ-индуцированного иммунодефицита.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

На следующем этапе работы необходимо провести исследование роли аутоантител к CD4⁺-лимфоцитам и регуляторного ревматоидного фактора в гибели CD4⁺-лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных людей.

Полученные в ходе исследования факты об аутоиммунной причине истощения CD4⁺-лимфоцитов при ВИЧ-инфекции вместе с данными литературы служат основанием предполагать, что для эффективного предотвращения развития иммунодефицита при ВИЧ-инфекции необходимо заблокировать продукцию аутоантител к CD4⁺-лимфоцитам, индуцируемую gp120 гликопротеином ВИЧ. В связи с этим в дальнейшем планируется поиск средств предотвращения индукции и средств подавления аутоиммунной реакции против CD4⁺-лимфоцитов, индуцируемой gp120 гликопротеином ВИЧ, при сохранении иммунного ответа на ВИЧ. Для этой цели будет использована разработанная экспериментальная неинфекционная модель аутоиммунной CD4⁺-лимфоцитопении крыс, запускаемая иммунизацией gp120 гликопротеином ВИЧ-1.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

CD4 – cluster of differentiation 4 (кластер дифференцировки 4), антигенный маркер Т-хелперов

HLA–DR – human leukocyte antigens DR isotype (человеческие лейкоцитарные антигены II класса гистосовместимости, сублокус DR)

IgG – иммуноглобулин G

MHC – major histocompatibility complex (главный комплекс гистосовместимости)

rCD4 – рекомбинантная форма CD4

АЗКЦ – антителозависимая клеточная цитотоксичность

АРВТ – антиретровирусная терапия

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ВИО – вирус иммунодефицита обезьяны

ЗФР – забуференный физиологический раствор

ИФА – иммуноферментный анализ

НАФ – неполный адъювант Фрейнда

ОП – оптическая плотность

ОФД – ортофенилендиамин

РА – ревматоидный артрит

РФ – ревматоидный фактор

РегРФ – регуляторный ревматоидный фактор

СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита

ФИТЦ – флуоресцеин-изоцианат

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бедулева, Л.В. Роль аутоиммунной реакции против CD4 в патогенезе СПИДа / Л.В. Бедулева, И.В. Меньшиков, П.В. Иванов // Вестник удмуртского университета. Биология. Науки о земле. – 2013. - № 3. – С. 64-77.
2. Взоров, А.Н. Вакцины против ВИЧ на основе вирусоподобных частиц и влияние модификаций в белке env на их антигенные свойства / А.Н. Взоров, Р.В. Компанс // Молекулярная биология. – 2016. – Т. 50 (№3). – С. 406-415.
3. Гудима, Г.О. Современные стратегии биомедицинской профилактики ВИЧ-инфекции/СПИДа. Часть 1. Анти-ВИЧ/СПИД-вакцины и антиретровирусная терапия / Г.О. Гудима, И.Г. Сидорович, Э.В. Карамов и др. // Иммунология. – 2013. - №1. – С. 4-9.
4. Дьяченко, А.Г. Две стратегии профилактики ВИЧ-инфекции / А.Г. Дьяченко, П.А. Дьяченко, С.Л. Грабовый // Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія. – 2015. - № 3–4 (82–83). – С. 6-14.
5. Урываев, Л.В. ВИЧ-инфекция – вызов человечеству. Есть ли шансы победить заболевание? / Л.В. Урываев, М.Р. Бобкова, И.А. Лаповок // Вопросы вирусологии. - 2012. - № 1. – С. 104-126.
6. Хасанова, Г.Р. К вопросу о патогенезе ВИЧ-инфекции: роль активации иммунной системы в прогрессировании заболевания / Г.Р. Хасанова, И.Г. Мустафин, В.А. Анохин // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2012. - №3. – С. 47-52.
7. Черешнев, В.А. Системный анализ патогенеза ВИЧ-инфекции / В.А. Черешнев, С.И. Бажан, Б.А. Бахметьев и др. // Успехи современной биологии. – 2012. – Т. 132 (№2). – С. 115-140.
8. Шалдина, М.В. Антиретровирусная терапия как основной метод лечения ВИЧ-инфекции / М.В. Шалдина, И.А. Пирогова // Вестник совета молодых учёных и специалистов Челябинской области. – 2017. – Т.2 (№4). – С. 71-74.

9. Шмагель, К.В. Активация иммунитета при ВИЧ-инфекции / К.В. Шмагель, Н.Г. Шмагель, В.А. Черешнев // Медицинская иммунология. – 2017. – Т. 19(№5). – С. 489-504.
10. Abulafia-Lapid, R. Major CD4 epitopes involved in anti-CD4 T-cell autoimmunity in HIV-1 patients / R. Abulafia-Lapid, Y. Keren-Zur, Y. Yachnin et al. // Vaccine. – 2007. - Vol. 25. - P. 3192-3199.
11. Abulafia-Lapid, R. Peptide therapy for anti-CD4 autoimmunity in HIV-1 infection: toward the development of an autoimmune animal model / R. Abulafia-Lapid, M. Afentoulis, A.A. Vandebark // Vaccine. – 2009. – Vol. 27. – P. 3475–3480.
12. Abulafia-Lapid, R. T-cell vaccination against anti-CD4 autoimmunity in HIV-1 infected patients / R. Abulafia-Lapid, Z. Bentwich, Y. Keren-Zur et al. // Journal of Clinical Virology. – 2004. - Vol. 31S. – P. S48–S54.
13. Alimonti, J.B. Mechanism of CD4+ T lymphocyte death in human immunodeficiency virus infection and AIDS / J.B. Alimonti, T.B. Ball, K.R. Fowke // J Gen Virol. – 2003. – Vol. 84. – P. 1649-1661.
14. Anderton, S.M. Avoiding autoimmune disease – T cells know their limits / S.M. Anderton // Trends Immunol. – 2006. – Vol. 27. – P. 208-214.
15. Andrieu, J.M. AIDS and related syndromes as a viral-induced autoimmune disease of the immune system: an anti-MHC II disorder. Therapeutic implications / J.M. Andrieu, P. Even, A. Venet // AIDS Research. – 1986. – Vol. 2. – P. 163-174.
16. Ansari A.A. Autoimmunity, anergy, lentiviral immunity and disease /A.A. Ansari // Autoimmun Rev. - 2004. - Vol. 3. - P. 530-540.
17. Arthos, J. Identification of the residues in human CD4 critical for the binding of HIV / J. Arthos, K.C. Deen, M.A. Chaikin et al. // Cell. – 1989. – Vol. 57. – P. 469-481.
18. Arthur, L.O. Macaques immunized with HLA-DR are protected from challenge with simian immunodeficiency virus / L.O. Arthur, J.W. Bess, R.G. et al. // J Virol. – 1995. – Vol. 69. – P. 3117–3124.

19. Atlan, H. Mechanism of autoimmunity and AIDS prospects for therapeutic intervention / H. Atlan, M.J. Gersten, P.L. Salk et al. // *Res. Immunol.* – 1994. – Vol. 145. – P. 165-183.
20. Badley, A.D. Mechanisms of HIV-associated lymphocyte apoptosis / A.D. Badley, A.A. Pilon, A. Landay et al.// *Blood.* – 2000. –Vol. 96. – P. 2951-2964.
21. Banda N.K. Crosslinking CD4 by human immunodeficiency virus gp120 primes T cells for activation-induced apoptosis / N.K. Banda, J. Bernier, D.K. Kurahara et al. // *J Exp Med.* – 1992. – Vol. 176. – P. 1099-1106.
22. Barre-Sinoussi, F. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS) / F. Barre-Sinoussi, J.C. Chermann, F. Rey et al. // *Science.* – 1983. - Vol. 220. – P. 868–871.
23. Battegay, M. Immunological recovery and antiretroviral therapy in HIV-1 infection / M. Battegay, R. Nuesch, B. Hirschel et al. // *Lancet Infect Dis.* – 2006. – Vol. 6. – P. 280-287.
24. Beduleva, L. Rheumatoid factor in idiotypic regulation of autoimmunity / L. Beduleva, I. Menshikov, E. Stolyarova et al. // *Int J Rheum Dis.* – 2015. – Vol. 18. – P. 408-420.
25. Beduleva, L. Role of idiotype-anti-idiotype interactions in the induction of collagen-induced arthritis in rats / L. Beduleva, I. Menshikov // *Immunobiology.* - 2010. - Vol. 215. - P. 963-970.
26. Bonner, B.C. Cytofluorometric analysis of anti-lymphocyte antibodies in AIDS / B.C. Bonner, T.A. Poulton // *FEMS Microbiol Immunol.* – 1991. -Vol. 4. – P. 33-40.
27. Bourinbaiar, A.S. Therapeutic AIDS vaccines / A.S. Bourinbaiar, R.S. Root-Bernstein, R. Abulafia-Lapid et al. // *Curr Pharm Des.* – 2006. – Vol. 12. – P. 2017-30.
28. Burastero, S.E. Autoantibodies to CD4 in HIV type 1-exposed seronegative individuals / S.E. Burastero, D. Gaffi, L. Lopalco et al. // *AIDS Res Hum Retroviruses.* – 1996. – Vol. 12. – P. 273-280.

29. Burastero, S.E. Protective versus pathogenic anti-CD4 immunity: insights from the study of natural resistance to HIV infection // S.E. Burastero, M. F, B. Frigerio et al. // *Journal of Translational Medicine*. – 2009. – Vol. 7. – P. 1-10.
30. Burnie, J. The incorporation of host proteins into the external HIV-1 envelope / J. Burnie, C. Guzzo // *Viruses*. – 2019. - Vol. 11. – P. 1-25.
31. Calenbuhr, V. Natural tolerance in a simple immune network / V. Calenbuhr, H. Bersini, J. Stewart et al. // *Journal of Theoretical Biology*. – 1995. – Vol. 177. – P. 199–213.
32. Callahan, L.N. Analysis of HIV-induced autoantibodies to cryptic epitopes on human CD4 / L.N. Callahan, G. Roderiquez, M. Mallinson et al. // *J Immunol*. – 1992. – Vol. 149. – P. 2194-2202.
33. Caporossi, A.P. Autoimmune T-cell response to the CD4 molecule in HIV-infected patients / A.P. Caporossi, G. Bruno, S. Salemi et al. // *Viral Immunology*. – 1998. – Vol. 11. – P. 9-17.
34. Carter, C.J. Extensive viral mimicry of 22 AIDS-related autoantigens by HIV-1 proteins and pathway analysis of 561 viral/human homologues suggest an initial treatable autoimmune component of AIDS / C.J. Carter // *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. – 2011. – Vol. 63. – P. 254–268.
35. Chams, V. Biological properties of anti-CD4 autoantibodies purified from HIV-infected patients / V. Chams, T. Idziorek, D. Klatzmann // *AIDS*. – 1991. – Vol. 5. – P. 565-9.
36. Chams, V. Detection of anti-CD4 autoantibodies in the sera of HIV-infected patients using recombinant soluble CD4 molecules / V. Chams, T. Jouault, E. Fenouillet et al. // *AIDS*. – 1988. – Vol. 2. – P. 353-361.
37. Choe, H. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates / H. Choe, M. Farzan, Y. Sun et al. // *Cell*. – 1996. –Vol. 85. – P. 1135–1148.
38. Clark, S.J. Peptide and nucleotide sequences of rat CD4 (W3/25) antigen: evidence for derivation from a structure with four immunoglobulin-related

- domains / S.J. Clark, W.A. Jefferies, A.N. Barclay et al. // Proc Natl Acad Sci USA. – 1987. -Vol. 84. – P. 1649-53.
39. Cohen, I.R. Network regulation of autoimmunity: an automaton model / I.R. Cohen, H. Atlan // Journal of Autoimmunity. – 1989. – Vol. 2. – P. 613-625.
40. Corre, J.P. Anti-idiotypic antibodies to human anti-gp120 antibodies bind recombinant and cellular human CD4 / J.P. Corre, M. Fevrier, S. Chamaret et al. // Eur J Immunol. – 1991. – Vol. 21. – P. 743-751.
41. Coulie, P.G. Rheumatoid factor (RF) production during anamnestic immune responses in the mouse. III. Activation of RF precursor cells in induced by their interaction with immune complexes and carrierspecific helper T cells / P.G. Coulie, J. Van Snick // J Exp Med. – 1985. – Vol. 161. – P. 88-97.
42. Coutinho, A. Will the idiotypic network help to solve natural tolerance? / A. Coutinho // Trends in Immunology. – 2003. – Vol. 24. - 53–54.
43. Cumont, M.C. Early divergence in lymphoid tissue apoptosis between pathogenic and nonpathogenic simian immunodeficiency virus infections of nonhuman primates / M.C. Cumont, O. Diop, B. Vaslin et al. // J. Virol. – 2008. – Vol. 82. – P. 1175–1184.
44. Dalgleish, A.G. Autoimmune mechanisms of depletion of CD4 cells in HIV infection / A.G. Dalgleish // British Journal of Hematology. – 1995. – Vol. 91. -P. 525-534.
45. Dalgleish, A.G. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus / A.G. Dalgleish, P.C.L. Beverley, P.R. Clapham et al. // Nature. – 1984. – Vol. 312. – P. 763–767.
46. Daniel, V. Association of T cell dysfunction with presence of IgG autoantibodies on CD4⁺ lymphocytes in haemophilia patients; results of a 10-year study // V. Daniel, C. Susal, R. Weimer et al. // Clin Exp Immunol. – 1996. – Vol. 104. – P. 4-10.
47. Daniel, V. Autoantibodies in HIV-infected hemophilia patient against different epitopes on CD4⁺ lymphocytes and recombinant CD4 / V. Daniel, R. Weimer, G. Zettlmeissl et al. // Vox Sang. – 1992. – Vol. 62. – P. 39-44.

48. Daniel, V. Evidence for autoantibody-induced CD4 depletion mediated by apoptotic and non-apoptotic mechanisms in HIV-positive long-term surviving haemophilia patients / V. Daniel, M. Sadeghi, C. Naujokat et al. // *Clin Exp Immunol.* – 2004. – Vol. 135. – P. 94–104.
49. Daniel, V. Lymphocyte autoantibodies and alloantibodies in HIV-positive haemophilia patients / V. Daniel, K. Schimpf, G. Opelz // *Clin Exp Immunol.* – 1989. – Vol. 75. – P. 178-183.
50. Daniyal, M. Review: comprehensive review on treatment of HIV / M. Daniyal, M. Akram, A. Hamid et al. // *Pak J Pharm Sci.* – 2016. – Vol. 29. – P. 1331-1338.
51. De Boer, R. Size and connectivity as emergent properties of a developing immune network / R. De Boer, A.S. Perelson. // *J Theor Biol.* – 1991. – Vol. 149. – P. 381-424.
52. Deeks, S.G. Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4⁺ T-cell changes independent of viral load / S.G. Deeks, C.M. Kitchen, L. Liu // *Blood.* – 2004. – Vol. 104. – P. 942-947.
53. Delhalle, S. Phages and HIV-1: from display to interplay / S. Delhalle, J.C. Schmit, A. Chevigne // *Int J Mol Sci.* – 2012. – Vol.13. – P. 4727-4794.
54. Denisova, G. Characterization of new monoclonal antibodies that discriminate between soluble and membrane CD4 and compete with human anti-CD4 autoimmune sera / G. Denisova, L. Lideman, E. Spectorman et al. // *Mol Immunol.* – 2003. – Vol. 40. P. 231-239.
55. Diaz-Lopez, C. Are there clinical or serological differences between male and female patients with primary Sjögren's syndrome? / C. Diaz-Lopez, C. Geli, H. Corominas et al. // *Journal of Rheumatology.* – 2004. – Vol. 31. – P. 1352–1355.
56. Dimitrov, D.S. HIV and membrane receptors / D.S. Dimitrov, C.C. Broder // *Landes Bioscience.* – 1997. – P. 61-78.
57. Dockrell, D.H. Activation-induced CD4⁺ T cell death in HIV-positive individuals correlates with Fas susceptibility, CD4⁺ T cell count, and HIV plasma viral copy number / D.H. Dockrell, Badley A.D., Algeciras-Schimmich A. et al. // *AIDS Research and Human Retroviruses.* – 1999. – Vol. 15. – P. 1509-1518.

58. Doitsh, G. Dissecting how CD4 T cells are lost during HIV infection / G. Doitsh, W.C. Greene // *Cell Host & Microbe*. – 2016. - Vol. 19. – P. 280-291.
59. Dorsett, B. Anti-lymphocyte antibodies in patient with the acquired immune deficiency syndrome / B. Dorsett, W. Cronin, V. Chuma et al. // *The American Journal of Medicine*. – 1985. – Vol. 75. – P. 621-626.
60. Excler, J.-L. Nonneutralizing functional antibodies: a new “old” paradigm for HIV vaccines / J.-L. Excler, J.Ake, M.L. Robb et al. // *Clin Vaccine Immunol*. – 2014. – Vol. 21. – P. 1023–1036.
61. Fevrier, M. CD4⁺ T cell depletion in human immunodeficiency virus (HIV) infection: role of apoptosis / M. Fevrier, K. Dorgham, A. Rebollo // *Viruses*. – 2011. – Vol. 3. – P. 586-612.
62. Finkel, T.H. Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes / T.H. Finkel, G. Tudor-Williams, N.K. Banda et al. // *Nat Med*. – 1995. –Vol. 1. – P. 129-134.
63. Furci, L. Human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein 120-specific T lymphocytes provide intermolecular help for anti-CD4 autoantibody production in exposed uninfected subjects / L. Furci, A. Beretta, A. Siccardi et al. // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 2009. - Vol. 13. – P. 1461-1469.
64. Gallo, R.C. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS / R.C. Gallo, S.Z. Salahuddin, M. Popovic et al. // *Science*. – 1984. – Vol. 224. – P. 500-503.
65. Giorgi, J.V. Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage / J.V. Giorgi, L.E. Hultin, J.A. McKeating et al. // *J Infect Dis*. – 1999. – Vol. 179. – P. 859-870.
66. Gottlieb, M.S. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency / M.S. Gottlieb, R. Schroff, H.M. Schanker et al. // *N. Engl. J. Med*. – 1981. – Vol. 305. P. 1425–1431.

67. Gougeon, M.L. Programmed cell death in AIDS-related HIV and SIV infections / M.L. Gougeon, S. Garcia, J. Heeney et al. // *AIDS Res Hum Retroviruses*. – 1993. – Vol. 9. – P. 553-563.
68. Gougeon, M.L. To kill or be killed: how HIV exhaust the immune system / M.-L. Gougeon // *Cell Death and Differentiation*. – 2005. – Vol. 12. – P. 845-854.
69. Gowda, S.D. Evidence that T cell activation is required for HIV-1 entry in CD4⁺ lymphocytes / S.D. Gowda, B.S. Stein, N. Monagheghpour et al. // *The Journal of Immunology*. – 1989. – Vol. 142. – P. 773-780.
70. Grant, M.D. Cytotoxic T-lymphocytes that kill autologous CD4⁺ lymphocytes are associated with CD4⁺ lymphocyte depletion in HIV-1 infection / M.D Grant, F.M. Smail, K.L. Rosenthal // *J AIDS*. – 1994. – Vol. 7. – P. 571-579.
71. Grossman, Z. CD4⁺ T-cell depletion in HIV infection: Are we closer to understanding the cause / Z. Grossman, M. Meier-Schellersheim, A.E Sousa et al. // *Nature Medicine*. – 2002. – Vol. 8. – P. 319-323.
72. Groux, H. Activation-induced death by apoptosis in CD4⁺ T cells from human immunodeficiency virus-infected asymptomatic individuals / H. Groux, G. Torpier, D. Monte et al. // *J Exp Med*. – 1992. – Vol. 175. – P. 331-340.
73. Hazenberg, M.D. Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS / M.D. Hazenberg, S.A. Otto, B.H. van Benthem et al. // *AIDS*. – 2003. – Vol. 17(13). – P. 1881-1888.
74. Herbeuval, J.P. HAART reduces death ligand but not death receptors in lymphoid tissue of HIV-infected patients and simian immunodeficiency virus-infected macaques / J.P. Herbeuval, J. Nilsson, A. Boasso et al. // *Aids*. – 2009. – Vol. 23. – P. 35–40.
75. Herbeuval, J.P. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in HIV-1-infected patients and its in vitro production by antigen-presenting cells / J.P. Herbeuval, A. Boasso, J.C. Grivel et al. // *Blood*. – 2005. – Vol. 105. – P. 2458–2464.

76. Hoffmann, G.W. An idiotypic network model of AIDS pathogenesis / G.W. Hoffmann, T.A. Kion, M.D. Grant // *Proc Natl Acad Sci.* – 1991. – Vol. 88. – P. 3060-3064.
77. Hoffmann, G.W. The T cell receptor and AIDS pathogenesis / G.W. Hoffmann // *Scand. J. Immunol.* – 1995. – Vol. 41. – P. 331-337.
78. Holmdahl, R. Generation of monoclonal rheumatoid factors after immunization with collagen II-anti-collagen II immune complexes. An anti-idiotypic antibody to anti-collagen II is also a rheumatoid factor / R. Holmdahl, C. Nordling, K. Rubin et al. // *Scand J Immunol.* – 1986. – Vol. 24. – P. 197-203.
79. Hsu, D.C. Progress in HIV vaccine development / D.C. Hsu, R.J. O'Connell // *Hum Vaccin Immunother.* – 2017. – Vol. 13. – P. 1018–1030.
80. Huang, M.B. Characterization of Nef-CXCR4 interactions important for apoptosis induction / M.B. Huang, L.L. Jin, C.O. James et al. // *J. Virol.* – 2004. – Vol. 78. – P. 11084–11096.
81. Iida, T. Role of apoptosis induction in both peripheral lymph nodes and thymus in progressive loss of CD4⁺ cells in SHIV-infected macaques / T. Iida, H. Ichimura, T. Shimada et al. // *AIDS Res. Hum. Retrovir.* – 2000. – Vol. 16. – P. 9–18.
82. Ingegnoli, F. Rheumatoid factors: clinical application / F. Ingegnoli, R. Castelli, R. Gualtierotti // *Dis Markers.* – 2013. – Vol. 35. – P. 727-734.
83. James, C.O. Extracellular Nef protein targets CD4⁺ T cells for apoptosis by interacting with CXCR4 surface receptors / J. Co, M.B. Huang, M. Khan et al. // *J. Virol.* – 2004. – Vol. 78. – P. 3099–3109.
84. Jameson, B.A. Location and chemical synthesis of a binding site for HIV-1 on the CD4 protein / B.A. Jameson, P.E. Rao, L.I. Kong et al. // *Science.* – 1988. -Vol. 240. –P. 1335-1339.
85. Jerne N.K. Towards a network theory of the immune system / N.K. Jerne // *Ann Immunol.* – 1974. - Vol. 125C. – P. 373-389.
86. Jiang, W. Drug Use is Associated with Anti-CD4 IgG-mediated CD4⁺ T Cell Death and Poor CD4⁺ T Cell Recovery in Viral-suppressive HIV-infected

- Individuals Under Antiretroviral Therapy / W. Jiang, Z. Luo, L. Martin et al. // *Curr HIV Res.* – 2018. – Vol. 16. – P. 143-150.
87. Johnson, P.M. Idiotypic interactions between rheumatoid factors and other antibodies / P.M. Johnson, H.B. Smalley HB // *Scand J Rheumatol Suppl* – 1988. – Vol. – P. 93–96.
88. Kang, Y. An ongoing immune response to HIV envelope gp120 in human CD4-transgenic mice contributes to a T cell decline upon intravenous administration of gp120 / Y. Kang, E.F. Marco Melo, D.W. Scott // *Eur J Immunol.* – 1998. – Vol. 28. – P. 2253-2264.
89. Kaufman, J. The class II molecules of the human and murine major histocompatibility complex / J. Kaufman, C. Auffrey, A. Korman et al. // *Cell.* - 1984. – Vol. 36. – P. 1-13.
90. Keay., S. Anti-CD4 anti-idiotypic antibodies in volunteers immunized with rgp 160 of HIV-1 or infected with HIV-1 / S. Keay, C. Tacket, J.R. Murphy et al. // *AIDS Research and Human Retroviruses.* – 1992. – Vol. 8. – P. 1091–1098.
91. Keay, S. Association between anti-CD4 antibodies and a decline in CD4+ lymphocytes in human immunodeficiency virus type 1 seroconverters / S. Keay, W. Weckler, S.S. Wasserman et al. // *J Infect Dis.* – 1995. – Vol. 171. – P. 312-319.
92. Keiser, P. Anti-CD4 antibodies are associated with HIV-1 seroconversion and may be detectable before anti-HIV-1 antibodies. The Multicenter AIDS Cohort Study / P. Keiser, S. Keay, S Wasserman et al. // *AIDS Res Hum Retroviruses.* – 1992. – Vol. 8. P. 1919-1927.
93. Keiser, P. Anti-CD4 antibodies generated in response to HIV-1 rgp 160 immunization of HIV-1-infected chimpanzees / P. Keiser, B. Fernie, C. Tacket et al. // *AIDS.* – 1993. – Vol. 7. – P. 136–137.
94. Kennedy, J.R. AIDS – an autoimmune model/ J.R. Kennedy // *Medical Hypotheses.* – 1992. –Vol. 37. – P. 16-19.
95. Kennedy, J.R. An immune model defined by AIDS / J.R. Kennedy // *Medical Hypotheses.* – 1990. – Vol. 31. – P. 303-307.

96. Kennedy, J.R. Does HIV disrupt a naturally occurring immune modulation systems? / J.R. Kennedy // *Medical Hypotheses*. – 1993. – Vol. 41. – P. 445-449.
97. Kion, T.A. Anti-HIV and anti-anti-MHC antibodies in alloimmune and autoimmune mice / T.A. Kion, G.W. Hoffmann // *Science*. – 1991. – Vol. 253. – P. 1138-40.
98. Kiprov, D.D. Antilymphocyte antibodies and seropositivity for retroviruses in groups at high risk for AIDS // D.D. Kiprov, R.E. Anderson, P.L. Morand et al. // *New England Journal of Medicine*. – 1985. - Vol. 312. – P. 1517.
99. Kojima, K. Crossreaction of monoclonal antiidiotypic antibodies specific for human antithyroglobulin antibody with the Fc portion of human IgG / K. Kojima, T. Yamada, S. Ohgaki et al. // *J Rheumatol*. – 1988. –Vol. 15. – P. 587–592.
100. Kowalski, M. Antibodies to CD4 in individuals infected with human immunodeficiency virus type 1 // M. Kowalski, B. Ardman, L. Basiripour et al. // *Proc Nati Acad Sci USA*. – 1989. - Vol. 86. – P. 3346-3350.
101. Kumar, V. Regulation of autoimmunity / V. Kumar, E.E. Sercarz // *Current Opinion in Immunology*. - 1991. – Vol. 3. – P. 888–895.
102. Kuwata, T. Association of progressive CD4+ T cell decline in SIV infection with the induction of autoreactive antibodies / T. Kuwata, Y. Nishimura, S. Whitted et al. // *PLoS Pathogens*. – 2009. – Vol.5. – P. 1-17.
103. Lehner, T. Alloimmunization as a strategy for vaccine design against HIV/AIDS / T. Lehner, G.M. Shearer, C.J. Hackett CJ et al. // *AIDS Res Hum Retroviruses*. – 2000. – Vol. 16. – P. 309-313.
104. Levy, J. A. HIV pathogenesis: 25 years of progress and persistent challenges / J.A. Levy // *AIDS*. – 2009. – Vol. 23. – P. 147–160.
105. Levy, J.A. Isolation of lympho-cytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS / J.A. Levy, A.D. Hoffman, S.M. Kramer et al. // *Science*. – 1984. –Vol. 225. – P. 840-842.
106. Lewis, G.K. Role of Fc-mediated antibody function in protective immunity against HIV-1 / G.K. Lewis // *Immunology*. - 2014. – Vol. 142. – P. 46–57.

107. Li, C.J. Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein / C.J. Li, D.J. Friedman, C. Wang et al. // *Science*. – 1995. – Vol. 268. - P. 429–431.
108. Lideman, L.F. Anti-CD4 autoimmunity in HIV-infected persons in Russia / L.F. Lideman, E.V. Kasennova, G.F. Denisova et al. // *Vopr Virusol*. – 2005. – Vol. 50. – P. 15-19.
109. Lin, G. Identification of gp120 Binding sites on CXCR4 by using CD4-independent human immunodeficiency virus type 2 env proteins / G. Lin, F. Baribaud, J. Romano et al. // *J Virol*. – 2003.- Vol. 77. – P. 931-942.
110. Lisco, A. Identification of rare HIV-1-infected patients with extreme CD4+ T cell decline despite ART-mediated viral suppression / A. Lisco, C.S. Wong, S.L. Lage et al. // *Journal of clinical investigation insight*. – 2019. – Vol. 4. – P. 1-13.
111. Lopalco, L. Anti-CD4 antibodies in exposed seronegative adults and in newborns of HIV type 1-seropositive mothers: a follow-up study / L. Lopalco, Z. Magnani, C. Confetti et al. // *AIDS Res Hum Retroviruses*. – 1999. –Vol. 15. – P. 1079-1085.
112. Lopalco, L. Anti-cell antibodies in exposed seronegative individuals with HIV type 1-neutralizing activity / L. Lopalco, C. Pastori, A. Cosma et al. // *AIDS Res Hum Retroviruses*. – 2000. – Vol. 16. – P. 109-115.
113. Lopalco, L. Predictive value of anti-cell and antihuman immunodeficiency virus (HIV) humoral responses in HIV-1-exposed seronegative cohorts of European and Asian origin / L. Lopalco, C. Barassi, C. Paolucci et al. // *J Gen Virol*. – 2005. – Vol. 86. – P. 339-348.
114. Luo, Z. Pathological role of anti-CD4 antibodies in HIV-infected immunologic non-responders under viral suppressive antiretroviral therapy / Z. Luo, Z. Li, Z. Wan et al. // *J Infect Dis*. – 2017. – Vol. 216. – P. 82-91.
115. Luo, Z. The effect of plasma auto-IgGs on CD4+ T cell apoptosis and recovery in HIV-infected patients under antiretroviral therapy / Z. Luo, Z. Zhou, E. Ogunrinde et al. // *J Leukoc Biol*. – 2017. – Vol. 102. – P. 1481-1486.

116. Lyerly, H.K. Anti-gp 120 antibodies from HIV seropositive individuals mediate broadly reactive anti-HIV ADCC / H.K. Lyerly, D.L. Reed, T.J. Matthews et al. // *AIDS Res Hum Retroviruses*. – 1987. – Vol. 3. – P. 409–422.
117. Marchalonis, J.J. Analysis of autoantibodies to T-cell receptors among HIV-infected individuals: epitope analysis and time course / J.J. Marchalonis, N.M. Ampel, S.F. Schluter et al. // *Clinical Immunology and Immunopathology*. – 1997. – Vol. 82. – P. 174-189.
118. Marlink, R. Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1 / R. Marlink, P. Kanki, I. Thior et al. // *Science*. – 1994. – Vol 265. – P. 1587-1590.
119. Massabki, P.S. Clinical implications of autoantibodies in HIV infection / P.S. Massabki, C. Accetturi, I.A. Nishie et al. // *AIDS*. – 1997. – Vol. 11. – P. 1845-1850.
120. Matrajt, L. The majority of CD4⁺ T-cell depletion during acute simian-human immunodeficiency virus SHIV89.6P infection occurs in uninfected cells / L. Matrajt, P.M. Younan, H.-P. Kiem et al. // *J Virol*. – 2014. – Vol. 88. – P. 3202-3212.
121. Mauri, C. The expanding family of regulatory B cells / C. Mauri, M. Menon // *Int Immunol*. – 2015. – Vol. 27. – P. 479-486.
122. Menendez-Arias, L. Targeting HIV: antiretroviral therapy and development of drug resistance / L. Menendez-Arias // *Trends Pharmacol Sci*. – 2002. – Vol. 23. – P. 381-388.
123. Menshikov, I. The idiotypic network in the regulation of autoimmunity: Theoretical and experimental studies / I. Menshikov, L. Beduleva, M. Frolov et al. // *J Theor Biol*. – 2015. – Vol. 375. – P. 32-39.
124. Metlas, R. HIV-1 gp120 and immune network / R. Metlas, V. Veljkovic // *International Reviews of Immunology*. – 2004. – Vol. 23. – P. 413-422.
125. Meyaard, L. Programmed death of T cells in HIV-1 infection // L. Meyaard, S.A. Otto, R.R. Jonker et al. // *Science*. – 1992. – Vol. 257. – P. 217-219.

126. Meythaler, M. Differential CD4⁺ T-lymphocyte apoptosis and bystander T-cell activation in rhesus macaques and sooty mangabeys during acute simian immunodeficiency virus infection / M. Meythaler, A. Martinot., Z. Wang et al. // *J. Virol.* – 2009. - Vol. 83. – P. 572–583.
127. Michalek, K. TSH receptor autoantibodies / K. Michalek, S.A. Morshed, R. Latif et al. // *Autoimmunity Reviews.* – 2009. – Vol. 9. – P. 113-116.
128. Miedema, F. Immune activation and collateral damage in AIDS pathogenesis / F. Miedema, M.D. Hazenberg, K. Tesselaar et al. // *Frontiers in Immunology.* – 2013. – Vol. 4. – P. 1-14.
129. Milligan, C. Passively acquired antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) activity in HIV-infected infants is associated with reduced mortality / C. Milligan, B.A. Richardson, G. John-Stewart et al. // *Cell Host & Microbe.* – 2015. – Vol. 17. – P. 500–506.
130. Mitra, D. HIV-1 upregulates Fas ligand expression in CD4⁺ T cells in vitro and in vivo: association with Fas-mediated apoptosis and modulation by aurointricarboxylic acid / D. Mitra, M. Steiner, D.H. Lynch // *J. Immunology.* – 1996. – Vol. 87. – P. 581–585.
131. Miyara, M. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression / M. Miyara, S. Sakaguchi // *Trends in Molecular Medicine.* – 2007. – Vol. 13. – P. 108–116.
132. Moore, T.L. Rheumatoid factors / T.L. Moore, R.W. Dorner // *Clin Biochem.* – 1983. – Vol. 26. – P. 75-84.
133. Muller, C. Antibodies against CD4⁺ lymphocytes in plasma of HIV-infected patients are related to CD4 cell depletion in vivo / C. Müller, S. Kukel, R. Bauer // *Immunol Lett.* – 1994. – Vol. 41. – P. 163-167.
134. Muller, C. Relationship of antibodies against CD4⁺ T cells in HIV-infected patients to markers of activation and progression: autoantibodies are closely associated with CD4 cell depletion / C. Muller, S. Kukel, R. Bauer // *Immunology.* – 1993. – Vol. 79. – P. 248-254.

135. Munoz-Arias, I. Blood-derived CD4 T cells naturally resist pyroptosis during abortive HIV-1 infection / I. Munoz-Arias, G. Doitsh, Z. Yang et al. // *Cell Host Microbe*. – 2015. – Vol. 18. – P. 463-470.
136. Nardacci, R. Syncytial apoptosis signaling network induced by the HIV-1 envelope glycoprotein complex: an overview / R. Nardacci, J.-L. Perfettini, L. Grieco et al. // *Cell Death Dis*. – 2015. – Vol. 6. – P. 1-9.
137. Nardella, F.A. Fc epitopes for human rheumatoid factors and relationships of rheumatoid factors to the Fc binding proteins of microorganism / F.A. Nardella, I.P. Oppliger, G.C. Stone et al. // *Scand J Rheumatology*. – 1988. – Vol. 75. – P. 190-198.
138. Newkirk, M.M. Rheumatoid factors: host resistance or autoimmunity? / M.M. Newkirk // *Clinical Immunology*. – 2002. – Vol. 104. – P. 1–13.
139. Osterland, C.K. Anti-gammaglobulin factors in human sera revealed by enzymatic splitting of anti-Rh antibodies / C.K. Osterland, M. Harboe, H.G. Kunkel // *Vox Sang*. – 1963. – Vol. 8. – P. 133-152.
140. Oyaizu, N. Accelerated apoptosis in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from human immunodeficiency virus type-1 infected patients and in CD4 cross-linked PBMCs from normal individuals / N. Oyaizu, T.W. McCloskey, M. Coronese et al. // *Blood*. – 1993. – Vol. 82. – P. 3392–3400.
141. Pegu, A. Use of broadly neutralizing antibodies for HIV-1 prevention / A. Pegu, A.J. Hessel, J.R. Mascola et al. // *Immunol Rev*. – 2017. – Vol. 275. – P. 296–312.
142. Pike, R.M. Serological reactions in rheumatoid arthritis; factors affecting the agglutination of sensitized sheep erythrocytes in rheumatid-arthritis serum / R.M. Pike, S.E. Sulkin, H.C. Coggeshall // *Journal of Immunology*. – 1949. – Vol. 63.- P. 441–446.
143. Pohlers, D. Differential clinical efficacy of anti-CD4 monoclonal antibodies in rat adjuvant arthritis is paralleled by differential influence on NF-kappaB binding activity and TNF-alpha secretion of T cells / D. Pohlers, C.B. Schmidt-Weber, A. Franch et al. // *Arthritis Res*. – 2002. – Vol. 4. – P. 184-189.

144. Preble, O.T. AIDS from the perspective of experimental pathology / O.T. Preble, J.A. Sonnabend // *J Exp Pathol.* – 1983. – Vol. 1. – P. 3-6.
145. Pu., J. Development of protein- and peptide-based HIV entry inhibitors targeting gp120 or gp41 / J. Pu, Q. Wang, W. Xu et al. // *Viruses.* – 2019. – Vol. 11. – C. 1-35.
146. Reeves, J.P. Recombinant human CD4 elicits antibody responses different in epitope specificity from those that cellular CD4 elicits / J.P. Reeves, S.L. Epstein // *Mol Immunol.* – 1993. – Vol. 30. – P. 765-73.
147. Reinberger, S. Kinetics of lymphocyte apoptosis in macaques infected with different simian immunodeficiency viruses or simian/human immunodeficiency hybrid viruses / S. Reinberger, M. Spring, T. Nisslein et al. // *Clin. Immunol.* – 1999. – Vol. 90. – Vol. 141–146.
148. Rerks-Ngarm, S. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand / S. Rerks-Ngarm, P. Pitisuttithum, S. Nitayaphan et al. / *N. Engl. J. Med.* - 2009.– Vol. 361. - P. 2209–2220.
149. Richard, J. Small CD4 mimetics prevent HIV-1 uninfected bystander CD4 + T cell killing mediated by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity / J. Richard, M. Veillette, S. Ding et al. // *E Bio Medicine.* – 2016. –Vol. 3. – P. 122-134.
150. Ribeiro, R.M. In vivo dynamics of T cell activation, proliferation, and death in HIV-1 infection: why are CD4+ but not CD8+ T cells depleted? / R.M. Ribeiro, H. Mohri, D.D. Ho et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2002. – Vol. 99. – P. 15572-15577.
151. Rizzuto, C.D. A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding / C.D. Rizzuto, R. Wyatt, N. Hernandez-Ramos et al // *Science.* – 1998. – Vol. 280. – P. 1949 – 1953.
152. Root-Bernstein, R. Human immunodeficiency virus proteins mimic human T cell receptors inducing cross-reactive antibodies / R. Root-Bernstein // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2017. – Vol. 18. – P. 1-23.

153. Rose, H.M. Differential agglutination of normal and sensitized sheep erythrocytes by sera of patients with rheumatoid arthritis / H.M. Rose, C. Ragan, E. Pearce // *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. – 1948. – Vol. 68. – P. 1–6.
154. Rosser, E.C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function / E.C. Rosser, C. Mauri // *Immunity*. – 2015. – Vol. 42. – P. 607-612.
155. Rubens, M. HIV vaccine: recent advances, current roadblocks, and future directions / M. Rubens, V. Ramamoorthy, A. Saxena et al. // *J Immunol Res*. – 2015. – Vol. 2015. – P. 1-9.
156. Salit, R.B. Detection of CD4 (+) T-cell antibodies in a patient with idiopathic CD4 T lymphocytopenia and cryptococcal meningitis / R.B. Salit, K.G. Hankey, Yi. R. Rapoport et al. // *J Haematol*. – 2007. – Vol. 139. – P. 133–137.
157. Sansonno, D. Non-enveloped HCV core protein as constitutive antigen of cold-precipitable immune complexes in type II mixed cryoglobulinaemia / D. Sansonno, G. Lauletta, L. Nisi et al. // *Clinical and Experimental Immunology*. – 2003. – Vol. 133. – P. 275–282.
158. Schockmel, G.A. Construction of a binding site for human immunodeficiency virus type 1 gp120 in rat CD4 / G.A. Schockmel, C. Somoza, S.J. Davis et al. // *J Exp Med*. – 1992. – Vol. 175. – P. 301-304.
159. Schramm, B. Cytopathicity of human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) in human lymphoid tissue is coreceptor dependent and comparable to that of HIV-1 // B. Schramm, M.L. Penn, E.H. Palacios et al. // *J Virol*. – 2000. – Vol. 74. – P. 9594-9600.
160. Sekigawa, I. Characterization of autoantibodies to the CD4 molecule in human immunodeficiency virus infection / I. Sekigawa, J.E. Groopmen, J.D. Allan et al. // *Clinical Immunology and Immunopathology*. – 1991. – Vol. 58. – P. 145-153.
161. Seledtsov, V.I. A possible role for idiotype/anti-idiotype B-T cell interactions in maintaining immune memory / V.I. Seledtsov, G.V. Seledtsova // *Frontiers in Immunology*. – 2017. – Vol. 8 (409). - P. 1-4.

162. Shmerling, R.H. The rheumatoid factor: an analysis of clinical utility / R.H. Shmerling, T.L. Delbanco // *American Journal of Medicine*. – 1991. – Vol. 91. – P. 528–534.
163. Sidorov, A. Fc fragments of immunoglobulin G are in inductor of regulatory rheumatoid factor and a promising therapeutic agent for rheumatic diseases / A. Sidorov, L. Beduleva, I. Menshikov et al. // *Int J Biol Macromol*. – 2017. – Vol. 95. – P. 938-945.
164. Silvestri, G. Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterized by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia / G. Silvestri, D.L. Sodora, R.A. Koup et al. // *Immunity*. – 2003. – Vol. 18. P. 441-452.
165. Silvestris, F. Autoreactivity in HIV infection: the role of molecular mimicry / F. Silvestris, R.C. Williams, F. Dammacco // *Clinical Immunology and Immunopathology*. – 1995. – Vol. 75. – P. 197-205.
166. Simard, J.F. Rheumatoid factor positivity in the general population / J.F. Simard, M. Holmqvist // *British Medical Journal*. – 2012. – Vol. 345. – P. 1-2.
167. Simon, V. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment / V. Simon, D.D. Ho, Q. Abdool Karim // *The Lancet*. – 2006. – Vol. 368. – P. 489–504.
168. Sok, D. Recent progress in broadly neutralizing antibodies to HIV / Sok D., D.R. Burton // *Nat Immunol*. – 2018. – Vol. 19. – P. 1179-1188.
169. Sokoya, T. HIV as a cause of immune activation and immunosenescence / T. Sokoya, H.C. Steel, M. Nieuwoudt et al. // *Mediators Inflamm*. – 2017. – Vol. 2017. – P. 1-16.
170. Sousa, A.E. CD4 T cell depletion is linked directly to immune activation in the pathogenesis of HIV-1 and HIV-2 but only indirectly to the viral load / A.E. Sousa, J. Carneiro, M. Meier-Schellersheim et al. // *J Immunol*. – 2002. – Vol. 169(6). – P. 3400-3406.

171. Sternfeld T. Mitochondrial membrane potential and apoptosis of blood mononuclear cells in untreated HIV-1 infected patients / T. Sternfeld, A. Tischleder, M. Schuster et al. // *HIV Med.* – 2009. – Vol. 10. – P. 512–519.
172. Stolyarova, E. Mechanism by which regulatory rheumatoid factor prevents experimental autoimmune encephalomyelitis / E. Stolyarova, L. Beduleva, I. Menshikov et al. // *Endocrine Metabolic & Immune Disorders Drug Target.* – 2018. - Vol. 18(6). - P. 596-601.
173. Stolyarova, E. The role of neutrophil proteases in LPS-induced production of regulatory rheumatoid factor that suppresses autoimmunity / E. Stolyarova, L. Beduleva, A. Sidorov et al. // *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* – 2017. – Vol. 17. – P. 71-77.
174. Stott, E.J. Anti-cell antibody in macaques / E.J. Stott // *Nature.* – 1991. – Vol. 353. – P. 393.
175. Stott E.J. Preliminary report: Protection of cynomolgus macaques against simian immunodeficiency virus by fixed infected-cell vaccine / E.J. Stott, W.L. Chan, K.H. Mills et al. // *Lancet.* – 1990. – P. 336. – P. 1538– 1541.
176. Stratta, P. Rheumatoid factor: The end of the term as we know it? / P. Stratta, C. Bozzola, M. Quaglia // *Arthritis&Rheumatism.* – 2012. – Vol. 64. – P. 320-321.
177. Susal, C. Complementarities and network interactions in AIDS / C. Susal, G.W. Hoffman, V. Daniel et al. // *J Autoimmun.* – 1993. – Vol. 6. – P. 601–610.
178. Susal, C. Does AIDS emerge from a disequilibrium between two complementary groups of molecules that mimic MHC? / C. Susal, V. Daniel, G. Opeiz // *Immunology Today.* – 1996. – Vol. 17. – P. 114–119.
179. Susal, C. Molecular mimicry between HIV-1 and antigen receptor molecules: a clue to the pathogenesis of AIDS / C. Susal, M. Kropelin, V. Daniel et al. // *Vox Sang.* – 1993. – Vol. 65. – P. 10-17.
180. Susal, C. Striking inverse association of IgG-anti-Fab antibodies and CD4 cell counts in patient with AIDS/ARC / C. Susal, V. Daniel, H.-H. Oberg et al. // *Blood.* – 1992. – Vol. 79. – P. 954-957.

181. Szabo, B. Prevalence and specificity of lymphocytotoxic antibodies in different stages of HIV infection / B. Szabo, F.D. Toth, J. Kiss et al. // *Acta Virol.* – 1992. – Vol. 36. – P. 392-400.
182. Tasliyurt, T. The frequency of antibodies against cyclic citrullinated peptides and rheumatoid factor in healthy population: a field study of rheumatoid arthritis from northern turkey / T. Tasliyurt, B. Kisacik, S.U. Kaya et al. // *Rheumatology International.* – Vol. 2013. – Vol. 33. – P. 939–942.
183. Teillaud, J.-L. Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC) / J.-L. Teillaud // *eLS* - 2012. – P. 1-8.
184. Thiriart, C. Antibodies to soluble CD4 in HIV-1-infected individuals / C. Thiriart, J. Goudsmit, P. Schellekens et al. // *AIDS.* – 1988. – Vol. 2. – P. 345-351.
185. Tozzoli, R. Receptor autoimmunity: diagnostic and therapeutic implications / R. Tozzoli // *Auto Immun Highlights.* – 2020. – Vol. 11. – P. 1-7.
186. Van Esch, W.J.E. Differential requirements for induction of total immunoglobulin and physiological rheumatoid factor production by human peripheral blood B cells / W.J.E. Van Esch, C.C. Reparon-Schuijt, E.W.N. Levarht et al. // *Clin Exp Immunol.* – 2001. – Vol. 123. – P. 496-504.
187. Vella, S. The history of antiretroviral therapy and of its implementation in resource-limited areas of the world / S. Vella, B. Schwartlander, S.P. Sow et al. // *AIDS.* – 2012. – Vol. 26. – P. 1231-1241.
188. Wang, Z. CD4 engagement induces Fas antigen-dependent apoptosis of T cells in vivo / Z.Q. Wang, A. Dudhane, T. Orlikowsky et al. // *European Journal of Immunology.* - 1994. – Vol. 24. – P. 1549–1552.
189. Wang, Y. Development of a human leukocyte antigen-based HIV vaccine // Y. Wang. - *F1000Research.* – 2018. – Vol. 7. - P. 1-6.
190. Warren, R.Q. Specificity of anti-lymphocyte antibodies in sera from patients with AIDS-related complex (ARC) and healthy homosexuals / R.Q. Warren, E.A. Johnson, R.P. Donnelly et al. // *Clin Exp Immunol.* – 1988. – Vol. 73. – P. 168-173.

191. Watanabe, M. A chimpanzee-passaged human immunodeficiency virus isolate is cytopathic for chimpanzee cells but does not induce disease / M. Watanabe, Ringler D.J., Fultz P.N. et al. // *Journal of Virology*. – 1991. – Vol. 65. – P. 3344-3348.
192. Westendorp, M.O. Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120 / M.O. Westendorp, R. Frank, C. Ochsenbauer et al. // *Nature*. – 1995. – Vol. 375. – P. 497-500.
193. Westwood, O.M.R. Rheumatoid factors: what's new? / O.M.R. Westwood, P.N. Nelson, F.C. Hay // *Rheumatology*. – 2006. – Vol. 45. – P. 379–385.
194. Wilks, D. Anti-CD4 autoantibodies and screening for anti-idiotypic antibodies to anti-CD4 monoclonal antibodies in HIV-seropositive people / D. Wilks, L.C. Walker, J.A. Habeshaw et al. // *AIDS*. – 1990. – Vol. 4. – P. 113-118.
195. Xu, W. Distinct systemic microbiome and microbial translocation are associated with plasma level of anti-CD4 autoantibody in HIV infection / W. Xu, Z. Luo, A.V. Alekseyenko et al. // *Sci Rep*. – 2018. – Vol. 8. – P. 1-12.
196. Yang, S.H. The molecular basis of immune regulation in autoimmunity / S.H. Yang, C.Y. Gao, L. Li et al. // *Clin Sci (Lond)*. – 2018. – Vol. 132. – P. 43-67.
197. Zandman-Goddard, G. HIV and autoimmunity / G. Zandman-Goddard, Y. Shoenfeld // *Autoimmunity Reviews*. – 2002. – Vol. 1. – P. 329-337.
198. Zangerle, R. Serum HIV-1 RNA levels compared to soluble markers of immune activation to predict disease progression in HIV-1-infected individuals / R. Zangerle, S. Steinhuber, M. Sarcletti et al. // *Int Arch Allergy Immunol*. – 1998. – Vol. 116. – P. 228-239.
199. Zarling, J.M. HIV-infected humans, but not chimpanzees, have circulating cytotoxic T lymphocytes that lyse uninfected CD4+ cells / J.M. Zarling, J.A. Ledbetter, J. Sias et al. // *J Immunol*. – 1990. – Vol. 144. – P. 2992-2998.
200. Zauli, G. Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein sensitizes CD4(+) T lymphoid cells to apoptosis via functional upregulation of the CD95/CD95 ligand pathway / G. Zauli, D. Gibellini; P. Secchiero et al. // *Blood*. – 1999. – Vol. 93. – P. 1000–1010.

201. Ziegler, J.L. Hypothesis: AIDS is an autoimmune disease directed at the immune system and triggered by a lymphotropic retrovirus / J.L. Ziegler, D.P. Stites // *Clin Immunol Immunopathol.* – 1986. – Vol. 41. – P. 305-313.
202. Zonios, D. Idiopathic CD4 lymphocytopenia: a case of missing, wandering or ineffective T cells / D. Zonios, V. Sheikh, I. Sereti // *Arthritis Res Ther.* – 2012. – Vol. 14. - P. 1-7.