

### ИММУННЫЙ ОТВЕТ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ ПРИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

Защитная реакция организма на попадание инфекционного агента заключается в иммунном ответе, в результате которого, как правило, происходит уничтожение бактерий или клеток, зараженных вирусами, и выведение их из организма. Иммунная система человека функционирует за счет интегрированного взаимодействия множества клеточных элементов (макрофагов, лимфоцитов, натуральных киллеров), а также специальных молекул – антител и цитокинов, синтезируемых иммунными клетками.

Зараженные вирусом клетки вначале распознаются макрофагами, моноцитами, дендритными клетками и клетками Лангерганса. После распознавания вируса, указанные клетки дают сигнал другим клеткам иммунной системы, для того чтобы они нейтрализовали вирус и уничтожили зараженные вирусом клетки. Основную роль в иммунной защите от вирусов играют лимфоциты, которые подразделяются на две основные категории – Т-лимфоциты и В-лимфоциты. Антитела синтезируются В-лимфоцитами. Они высоко специфичны к вирусным антигенам и способны нейтрализовать их. Антитела к вирусным белкам можно достаточно легко обнаружить в крови и тканевых жидкостях при помощи так называемого иммуноферментного анализа. Этот метод составляет основу скрининговой диагностики ВИЧ-инфекции (см. раздел 13.2). Выработку антител называют гуморальным иммунным ответом.

Клеточный иммунный ответ реализуется за счет цитотоксических Т-лимфоцитов и натуральных киллеров. При этом антитела способны направлять противовирусную активность клеток иммунной системы. В данном случае говорят об антителозависимой клеточной цитотоксичности.

Т-лимфоциты играют важную роль в регуляции иммунного ответа. Их принято подразделять на две основные категории – хелперы/индьюсеры и супрессоры/цитотоксические лимфоциты. Первые предназначены для усиления иммунного ответа, в то время как вторые, наоборот, подавляют иммунный ответ, а также оказывают цитотоксическое действие. Указанные две категории Т-лимфоцитов можно идентифицировать по наличию на их поверхности специальных молекул – кластерных детерминант CD, которые иначе называют рецепторами указанных клеток. Хелперные/индьюсерные лимфоциты несут на своей поверхности рецептор CD4. Супрессорные Т-лимфоциты распознаются по наличию рецептора CD8. Парадокс заключается в том, что вирус ВИЧ способен связываться с CD4 рецептором и поэтому поражает именно те лимфоциты, которые предназначены помогать другим иммунным клеткам защищаться от вируса. Результатом массовой гибели хелперных Т-лимфоцитов является иммунодефицит, неспособность организма нейтрализовать вирус ВИЧ, и его повышенная восприимчивость к другим инфекциям. Результатом является развитие Синдрома Приобретенного Иммунодефицита (СПИДа).

Лимфоциты регулируют иммунный ответ при помощи специальных веществ, называемых цитокинами. Наиболее известными цитокинами являются интерлейкины (IL-1, 2, 3 и др), интерферон, фактор некроза опухолей (TNF) и др. Предполагается, что цитокины могут играть важную роль как в механизмах противовирусной защиты,

так и патогенезе развития ВИЧ-инфекции (см ниже). То же самое можно сказать и об антителах, которые могут не только нейтрализовать вирус, но в определенной ситуации способствовать его репликации.

В самом деле, функционирование иммунной системы и процессы, ведущие к развитию иммунодефицита, являются чрезвычайно сложными и до конца не ясными. Более или менее понятными являются внешние проявления ВИЧ-инфекции, такие, как выработка антител, динамика появления отдельных вирусных антигенов и стадии клинического течения. Знание этих проявлений имеет большое значение для диагностики, подбора оптимальной антиретровирусной терапии и мониторинга лечения.

Ниже будут представлены особенности гуморального и клеточного иммунного ответа на ВИЧ-инфекцию, нарушения клеток иммунной системы, наблюдающиеся при данном заболевании, а также роль цитокинов в патогенезе ВИЧ-инфекции. Более подробно патогенез ВИЧ-инфекции будет описан в следующей главе.

## **6.1 Динамика иммунного ответа на ВИЧ-инфекцию**

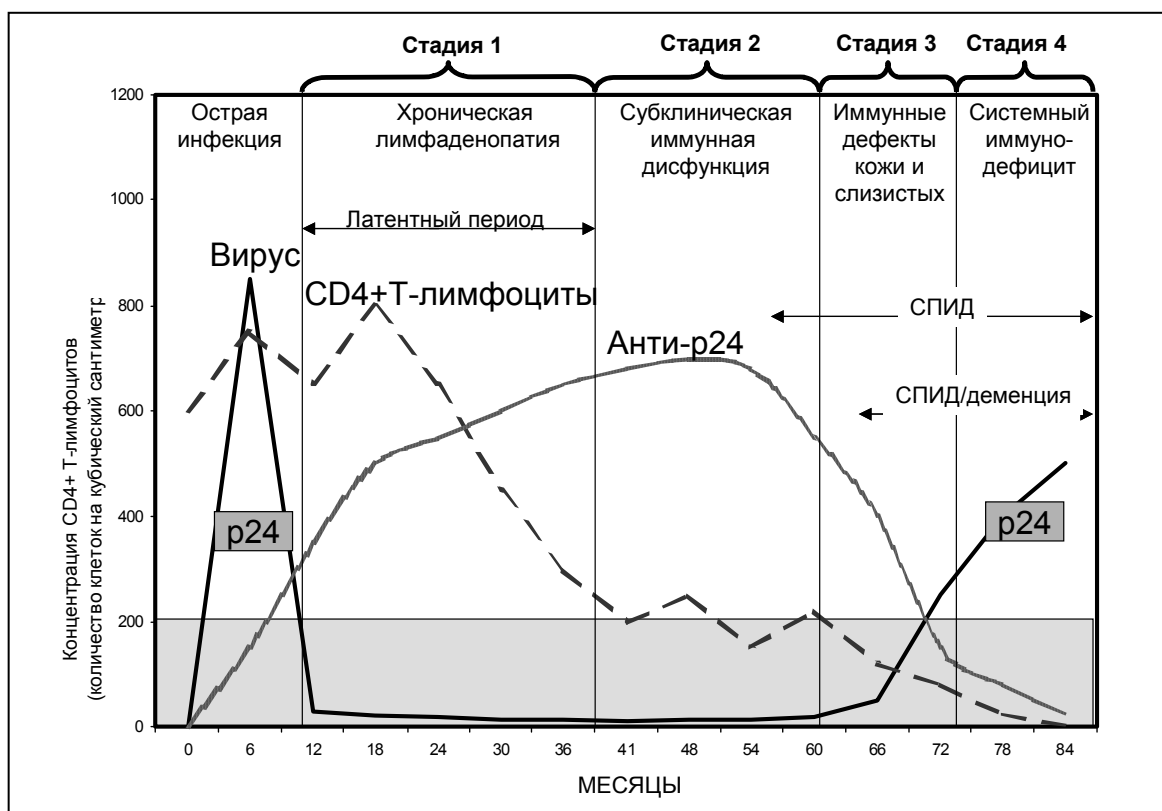
Начальный эпизод вирусемии при первичной ВИЧ-инфекции характеризуется выраженным иммунным ответом, в результате которого происходит значительное снижение концентрации вируса в плазме крови. Следствием является замедление прогрессирования инфекции и, соответственно, начала клинических проявлений СПИДа, которые появляются, в среднем, в течение 10 лет после инфицирования вирусом.

На рисунке 6.1 показана динамика иммунного ответа в виде титров антител, специфичных к вирусному белку р24. Антитела к вирусу ВИЧ появляются, в среднем, в течение 2 недель после инфицирования, однако их концентрация остается на относительно низком уровне в течение определенного периода времени. Этот начальный период характеризуется, как «окно», в течение которого достаточно трудно определить антитела, хотя вирус начинает циркулировать в крови, представляя собой угрозу заражения для других лиц.

У данного феномена есть положительное применение, позволяющее установить новые случаи инфицирования и, следовательно, оценить уровень инфицированности (заболеваемости) среди населения. Данный подход называется «расстроенный анализ» (detuned assay). Он заключается в том, что, если в начальном периоде ВИЧ-инфекции одновременно применить тест-наборы с низкой чувствительностью и тест-наборы с повышенной чувствительностью, то антитела не будут проявляться в первом наборе, но будут установлены при помощи второго набора. В данном случае можно говорить о новом случае ВИЧ-инфекции. Эта идея продолжает активно прорабатываться многими эпидемиологами, занимающимися ВИЧ/СПИД. Однако основной проблемой является то, что многие компании прекратили выпускать низкочувствительные тест-системы.

По мере возрастания титров антител, наблюдается снижение концентрации вируса в крови, которая падает до минимального уровня в течение первых 12 месяцев заболевания (Clark, Saag, Decker, et al. 1991; Sei, Tsang, Chu, et al., 1989; Allain, Laurian, Paul, et al. 1986; Paul, Falk, Kessler, et al., 1987). В результате наступает так называемый латентный период, без каких-либо клинических проявлений, который длится в

течение нескольких лет. Однако, по мере снижения концентрации CD4+ Т-лимфоцитов (до уровня 200 клеток на микролитр крови), появляются клинические симптомы СПИДа в виде оппортунистических инфекций, неизбежно ведущих к гибели больного. В конечной стадии вновь наблюдается возрастание вирусной нагрузки и снижение титров анти p24 антител.



**Рисунок 6.1.** Динамика иммунного ответа при ВИЧ-инфекции в соответствии со стадиями вирусной репликации, развитием иммунодефицита и клиническим течением инфекционного процесса.

Иммунный ответ при ВИЧ-инфекции содержит элементы как гуморального, так и клеточно-опосредованного иммунитета. Он направлен как против множественных антигенов самого вируса, так и против вирусных белков, продуцируемых инфицированными клетками. Как указывалось выше, важнейшим патогенетическим фактором ВИЧ-инфекции является то, что те клетки и рецепторы (CD4+ Т-лимфоциты), которые предназначены обеспечивать защиту от вируса ВИЧ, в первую очередь поражаются вирусом, и поэтому становятся неспособными обеспечивать эффективную защиту.

## 6.2 Гуморальный иммунный ответ

Определение уровня антител к вирусным антигенам (p24, gp120 и gp 41) составляет основу скрининга на наличие вируса в крови и других тканевых жидкостях (слюне, например). Их можно установить при помощи иммуноферментного анализа и иммуноблота (см. главу 13).

Первыми появляются антитела, специфичные к структурным антигенам вируса, кодируемым *gag* генами - p24 и p17, а также p55. После антител к антигенам *gag*, появляются антитела к поверхностным белкам - gp160, gp120, p88, и gp41, а также к продуктам вирусного гена *pol* - p31, p51, and p66. Кроме того, могут обнаруживаться

антитела к низкомолекулярным белкам, синтезируемым регуляторными генами вируса *vpr*, *vpu*, *vif*, *rev*, *tat* и *nef* (Fauci and Lane, 2000).

Хотя ясно, что во время ВИЧ-инфекции появляются антитела одновременно ко множеству вирусных антигенов, роль этих антител до конца не ясна. Большинство этих антител несут нейтрализующую функцию, то есть, способны подавлять вирусную репликацию. Пока лишь известно, что антитела к поверхностным белкам вируса, таким, как gp120 и gp41, направлены к участкам вирусного антигена, которые характеризуются повышенной вариабельностью, то есть склонны к молекулярным изменениям, и поэтому потенциально способны избегать антивирусного действия иммунной системы.

В частности, было показано, что антитела способны связываться с так называемым V3 регионом вирусного белка gp120 (с аминокислотами, в последовательности от 423 до 437). Тем самым нейтрализующие антитела препятствуют связыванию вируса с CD4 рецептором клетки мишени (Matthews, Langlois, Robey, et al., 1986; Putney, Matthews, Robey, et al. 1986; Palker, Clark, Langlois, et al., 1988; Rusche, Javaherian, McDanal, et al. 1988; Goudsmit, Debouck, Melen, et al., 1988; Javaherian, Langlois, McDanal, et al., 1989; Kido, Fukutomi, Katunuma, 1990; Clements, Price-Jones, Stephens, et al. 1991; Freed, Myers, Rissler, 1991; Niwa, Yano, Futaki, et al., 1996).

Аналогичным образом нейтрализующие антитела способны связываться с аминокислотными последовательностями от 728 до 745 вирусного белка gp41 (Muster, Steindl, Purtscher, et al., 1993; Conley, Kessler, Boots, et al., 1994; Reitz, Wilson, Naugle, et al., 1988).

Хотя, очевидно, что по мере первоначального возрастания титров противовирусных антител наблюдается снижение вирусной нагрузки, пока нет убедительных данных, свидетельствующих о корреляции между титром нейтрализующих антител и клиническим течением заболевания. Однако ряд исследований позволяет считать, что наличие нейтрализующих антител ассоциируется с более благоприятным течением ВИЧ-инфекции (Sei, Tsang, Roboz, et al., 1988; Pantaleo, Menzo, Vaccarezza, et al., 1995; Cao, Qin, Zhang, et al. 1995; Montefiori, Pantaleo, Fink, et al., 1996; Scarlatti, Leitner, Hodara, et al., 1996).

Парадоксом является то, что антитела, направленные против поверхностных белков, обладают как защитной функцией, так и могут вносить вклад в распространение ВИЧ-инфекции. Защитные свойства противовирусных антител связаны, прежде всего, с их нейтрализующей функцией, вызывающей гибель вирусных частиц и препятствующей тем самым инфицированию других иммунных клеток. Кроме того, защитные антитела участвуют в феномене антителозависимой клеточной цитотоксичности, также способной уничтожать вирусные частицы (Borrow, Lewicki, Hahn, et al. 1994; Koup, Safrit, Cao, et al., 1994; Musey, Hughes, Schacker, et al., 1997; Clark, Saag, Decker, et al., 1991; Sei, Tsang, Roboz, et al., 1988; Sei, Tsang, Chu, et al., 1989; Lathey, Pratt, Spector, 1997).

Антитела, принимающие участие в антителозависимой клеточной цитотоксичности, способны активировать специальную группу клеток иммунной системы, именуемую естественными киллерами (ЕК), через специальные Fc рецепторы. Естественные киллеры непосредственно уничтожают инфицированные клетки. Было продемонстрировано, что антитела против вирусных антигенов gp120 и gp41 способны индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность,

направленную против вируса ВИЧ. Причем, данный процесс может усиливаться при помощи интерлейкина-2 (Lyerly, Matthews, Langlois, et al., 1987; Ojo-Amaize, Nishanian, Keith, et al., 1987; Weinhold, Lyerly, Matthews, et al., 1988; Tyler, Nastala, Stanley, et al., 1989; Koup, Sullivan, Levine, et al., 1989; Tyler, Stanley, Zolla-Pazner, et al., 1990; Tanneau, McChesney, Lopez, et al., 1990; Murayama, Cai, Rinaldo, 1990).

Как указывалось выше, помимо защитной функции, антитела могут, наоборот, способствовать распространению ВИЧ-инфекции. В системе *in vitro* было показано, что антитела, направленные против вирусного белка gp41, могут привлекать вирус к иммунным клеткам посредством Fc рецептора и благодаря феномену так называемого *антигенного усиления* (Robinson, Montefiori, Mitchell, 1988; Robinson, Kawamura, Gorny, et al., 1990). Присутствие таких «усиливающих» антител коррелирует с прогрессированием клинических симптомов СПИДа (Homsy, Meyer, Levy, 1990). Кроме того, неинфицированные клетки могут уничтожаться иммунными клетками в том случае, когда они абсорбируют свободно-циркулирующие вирусные антигены, например, gp120 (но не сами вирусы). Данный феномен носит название *уничтожение свидетеля*, и может вносить существенный вклад в снижение концентрации CD4+ Т-лимфоцитов при ВИЧ-инфекции (Wong, Warren, Anderson, et al., 1993).

### 6.3 Клеточный иммунный ответ

Т-клеточный иммунитет играет важную роль в иммунологической защите организма от вирусной инфекции, включая защиту от вируса ВИЧ. Как указывалось выше, Т-клетки подразделяются на две основные категории – хелперные/иньюсерные, несущие маркер CD4 и супрессорные/цитотоксические, несущие маркер CD8.

Попытки установить наличие CD4+ Т-лимфоцитов, специфичных по отношению к вирусу ВИЧ, пока оказались неудачными. Вероятно, это связано с тем, что указанная популяция клеток, являясь мишенью для вируса ВИЧ, первой погибает при ВИЧ-инфекции. Ситуация, однако, отличается в отношении CD8+ Т-лимфоцитов, среди которых удается идентифицировать клоны, специфичные к антигенам вируса ВИЧ. Причем, такие популяции клеток появляются уже в течение первых недель инфекционного процесса. Они способны оказывать цитолитическое действие по отношению к лимфоцитам, инфицированным вирусом ВИЧ. Более того, удалось идентифицировать клетки, обладающие цитолитической активностью и специфичные ко множеству вирусных антигенов, кодируемых шестью генами вируса ВИЧ - *gag*, *env*, *pol*, *tat*, *rev* и *nef*, а также к самому ферменту - обратной транскриптазе. При этом, как оказалось, важна ассоциация вирусного антигена с антигенами гистосовместимости I класса (Walker, Chakrabarti, Moss, et al., 1987; Plata, Autran, Martins, et al. 1987; Koup, Sullivan, Levine, et al., 1989; Riviere, Tanneau-Salvadori, Regnault, et al., 1989; Nixon, Townsend, Elvin, et al., 1988; Gotch, Nixon, Alp, et al., 1990; Walker, Flexner, Paradis, et al., 1988; Hosmalin, Clerici, Houghten, et al., 1990; Lieberman, Fabry, Kuo, et al., 1992; Koenig, Earl, Powell, et al., 1988; Hammond, Obah, Stanhope, et al., 1991; Clerici, Lucey, Zajac, et al., 1991; Koenig, Fuerst, Wood, et al., 1990).

При анализе цитолитического действия CD8+ Т-лимфоцитов удается выделить две субпопуляции клеток. Первая способна спонтанно (без предварительной стимуляции) уничтожать инфицированные вирусом лимфоциты. Вторая субпопуляция требует предварительной активации митогеном, таким, как фитогемагглютинин, или антителами, специфичными к CD3 рецептору (Fauci and Lane, 2000).

Следует отметить, что характер и интенсивность цитолитического действия лимфоцитов коррелирует с прогнозом развития ВИЧ-инфекции. Было показано, что те больные, у которых наблюдается выраженный цитолитический ответ с вовлечением множества клонов CD8<sup>+</sup> лимфоцитов, имеют шансы на более благоприятное течение заболевания по сравнению с больными, у которых цитолитический ответ и вовлеченность клонов CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов ограничены (Klein, vanBaalén, Holwerda, et al., 1995; Greenough, Brettler, Somasundaran, et al., 1997; Riviere, McChesney, Porrot, et al., 1995). Причем, у больных с асимптоматичным течением ВИЧ-инфекции обнаруживается чрезвычайно высокий количественный и функциональный уровень цитолитических лимфоцитов и их предшественников (Hoffenbach, Langlade-Demoyen, Dadaglio, et al., 1989; Moss, Rowland-Jones, Frodsham, et al., 1995; Altman, Moss, Goulder, et al., 1996; Ogg, Jin, Bonhoeffer, et al., 1998).

Молекулярный анализ отдельных клонов CD8<sup>+</sup> лимфоцитов показал, что на начальных этапах инфекции наблюдается количественное увеличение клонов, которые в последующем уменьшаются и теряют цитолитическую активность. Причем отмечается определенная связь между молекулярными характеристиками отдельных клонов и степенью прогрессирования заболевания (Pantaleo, Demarest, Schacker, et al., 1997).

Потеря цитолитической активности CD8<sup>+</sup> лимфоцитов вероятно связана с тем, что вирусные регуляторные белки Tat, Nef и Vpr способны подавлять экспрессию молекул I класса Главного Комплекса Гистосовместимости, необходимых для распознавания цитолитическими клетками инфицированных мишеней (Howcroft, Strebel, Martin, et al., 1993; Schwartz, Marechal, Gall, et al., 1996; Collins, Chen, Kalams, et al., 1998; Kerkau, Vacik, Bennink, et al., 1997).

Также было продемонстрировано, что потеря цитолитической активности CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов при ВИЧ инфекции коррелирует с постепенным количественным снижением концентрации CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. Это подтверждает концепцию о том, что CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты выполняют важную иммунорегуляторную функцию, участвуя в поддержании антиген-специфического цитолитического эффекта CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, а также других эффекторных функций посредством интерлейкина 2 (Torseth, Berman, Merigan, 1988; Kinter, Fauci, 1996; Rosenberg, Billingsley, Caliendo, et al., 1997).

Помимо классического цитолитического действия CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, существует, по крайней мере, три дополнительные формы иммунологической защиты, опосредованной клетками иммунной системы - 1) супрессия вируса CD8<sup>+</sup> лимфоцитами; 2) антителозависимая клеточная цитотоксичность и 3) цитотоксичность естественных киллеров.

Супрессивное влияние CD8<sup>+</sup> лимфоцитов связано со способностью этих клеток подавлять репликацию вируса ВИЧ, не вовлекая цитолитических механизмов. Предполагается, что механизм супрессивного влияния в данном случае связан с выработкой CD8<sup>+</sup> лимфоцитами растворимого фактора, способного подавлять вирусную репликацию. Ранее было показано, что CD8<sup>+</sup> лимфоциты, CD4<sup>+</sup> лимфоциты, а также моноциты и В-лимфоциты способны выделять так называемые b-хемокины, такие, как RANTES, MIP-1 $\alpha$ , и MIP-1 $\beta$ . Указанные хемокины являются потенциальными ингибиторами репликации вируса ВИЧ, действуя путем блокирования ко-рецептора CCR5, специфичного для М-тропных разновидностей вируса ВИЧ. Помимо хемокинов, вероятно, существуют другие растворимые

факторы, способные подавлять вирусную репликацию без вовлечения цитолитических механизмов (Walker, Moody, Stites, et al., 1986; Walker, Levy, 1989; Walker, Erickson, Hsueh, et al., 1991; Chen, Weinhold, Bartlett, et al., 1993; Copeland, McKay, Rosenthal, 1995; Mackewicz, Balckbourn, Levy, 1995; Cocchi, DeVico, Garzino-Demo, et al., 1995; Kinter, Ostrowski, Goletti, et al., 1996; Zagury, Lachgar, Chams, et al., 1998; Furci, Scarlatti, Burastero, et al., 1997; Scala, D'Offizi, Rosso, et al., 1997; Ullum, Lepri, Victor, 1998; Saha, Bentsman, Chess, et al. 1998).

Определенную роль в иммунной защите от ВИЧ-инфекции могут играть антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ) и цитотоксичность естественных киллеров (ЕК), которые являются взаимосвязанными процессами. Общим между ними является то, что они осуществляют цитотоксическое действие за счет прямого влияния естественных киллеров. Отличием является то, что в первом случае цитотоксичность опосредована и направляется вирус-специфичными антителами, в то время как во втором случае наблюдается спонтанное уничтожение естественными киллерами. Указанные механизмы являются относительно примитивными, и их предназначением является обеспечение надзора за опухолевой трансформацией и начальным заражением вирусами и другими инфекционными агентами. Важным условием является распознавание антигенов I класса гистосовместимости модифицированных опухолевыми или инфекционными антигенами. Отрицательной стороной действия АЗКЦ и ЕК является то, что, уничтожая клетки мишени, в данном случае CD4+ Т-лимфоциты, указанные процессы вносят существенный вклад в развитие иммунодефицита при ВИЧ-инфекции (Tyler, Nastala, Stanley, et al., 1989; Murayama, Cai, Rinaldo, 1990; Skowron, Cole, Zheng, et al., 1997).

#### **6.4 Нарушения Т-клеточного звена иммунитета при ВИЧ-инфекции**

Спектр Т-клеточных нарушений при ВИЧ-инфекции достаточно широк. Практически все эти нарушения находят объяснение в количественном истощении CD4+ Т-лимфоцитов. Вместе с тем, показано, что Т-клеточные нарушения могут наблюдаться и на ранних сроках заболевания, даже в период, когда уровень CD4+ Т-лимфоцитов сохраняется на нормальном уровне. Степень и спектр иммунных нарушений зависят от стадии инфекционного процесса. Одним из первых проявлений является нарушение иммунного ответа на такие растворимые антигены, как столбнячный токсин и гриппозную вакцину. Затем следуют нарушения пролиферативного ответа Т-лимфоцитов на аллоантигены и митогены. В конечном итоге, происходит нарушение множества других функций иммунной системы, таких, как секреция интерлейкина-2 и экспрессия рецепторов к данному лимфокину, снижение секреции гамма-интерферона а также образования иммуноглобулинов В-лимфоцитами (Pantaleo, Fauci, 1996; Clerici, Stocks, Zajac, et al., 1989, Fauci, 2002).

Т-лимфоциты у ВИЧ-инфицированных претерпевают множество фенотипических изменений. Помимо нарушения секреции интерлейкина-2 и экспрессии рецептора к данному цитокину, наблюдается снижение концентрации CD4+ клеток, несущих маркер CD28, являющийся важным фактором, обеспечивающим эффективную активацию Т-лимфоцитов. Причем, CD4+ клетки, лишённые данного маркера, неспособны адекватно реагировать на стимуляцию моноклональными антителами к CD3, а также экспрессировать такие маркеры активации, как HLA-DR, CD38 и CD45RO (Choremi-Papadopoulou, Viglis, Gargalianos, et al., 1994; Borthwick, Bofill, Gombert, et al., 1994).

Концентрация CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов способна варьировать в течение инфекционного процесса. После окончания острой фазы первичной инфекции, наблюдается некоторое повышение концентрации CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, которая сохраняется на таком, несколько повышенном, уровне в течение всего латентного периода инфекции. Данное явление, вероятно, отражает экспансию клонов цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к вирусу ВИЧ. Кроме того, в такой экспансии определенную роль могут играть гомеостатические механизмы, направленные на замещение CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, погибающих в результате прямого действия вируса ВИЧ. Однако, эти механизмы более неспособны справиться с массовой гибелью лимфоцитов во время развившейся инфекции, когда происходит снижение числа CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов (Pantaleo, Demarest, Soudeyns, et al., 1994; Wilson, Ogg, Allen, et al., 1998).

Цитотоксическая функция CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в выраженной степени проявляется на ранней стадии инфекционного процесса. По мере развития инфекции, однако, данная функция, по неизвестной причине, полностью теряется. Однако, показано, что по мере развития инфекции происходит значительное изменение фенотипа CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, которые начинают экспрессировать маркеры клеточной активации, такие, как HLA-DR, на фоне отсутствия рецепторов к интерлейкину-2 (маркера CD25) и потери так называемого клоногенного потенциала. Считается, что особенности фенотипа CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов могут иметь определенное прогностическое значение у ВИЧ-инфицированных лиц. Показано, в частности, что те больные, которые экспрессируют маркеры HLA-DR<sup>+</sup> /CD38<sup>+</sup> на поверхности CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, имеют более благоприятный прогноз, нежели те лица, у которых фенотип CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов характеризуется, как HLA-DR<sup>+</sup> /CD38<sup>-</sup>. Поскольку функция CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в значительной степени определяется наличием адекватной поддержки со стороны CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, количественные изменения последних, безусловно, отражаются на функционировании CD8<sup>+</sup> клеток (Giorgi, Ho, Hirji, et al., 1994; Mocroft, Bofill, Lipman, et al., 1997; Liu, Hultin, Cumberland, et al., 1996).

Глубокий иммунодефицит, развивающийся у ВИЧ-инфицированных, трудно объяснить лишь эффектом прямого инфицирования иммунных клеток и количественного снижения их содержания в крови. Более вероятно, что нарушение функций CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов обусловлено комбинированным влиянием как количественного уменьшения числа клеток, так и разнообразными непрямыми эффектами вирусного процесса.

Неуклонное снижение популяции CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных может быть связано с неспособностью иммунной системы к достаточно быстрой регенерации CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов с тем, чтобы компенсировать деструктивное влияние вируса ВИЧ. Такая инертность иммунной системы может быть обусловлена, по меньшей мере, двумя причинами. Первая связана с разрушением резерва тимусных и костномозговых предшественников Т-лимфоцитов. Вторая причина имеет отношение к разрушительному влиянию вируса ВИЧ на микроокружение лимфоидной ткани, которое играет важную роль в восстановлении иммунокомпетентных клеток (Ioachim, Lerner, Tapper, 1983; Fernandez, Mouradian, Metroka, et al., 1983; Janossy, Pinching, Bofill, 1985; Biberfeld, Chayt, Marselle, et al., 1986; Racz, Tenner-Racz, Kahl, et al., 1986; Pallesen, Gerstoft, Mathiesen, 1987; Turner, Levine, Gill, et al., 1987; Pantaleo, Graziosi, Demarest, et al., 1993; Stanley, McCune, Kaneshima, et al., 1993).



Цитопатический эффект вируса может найти объяснение в разнообразных механизмах. В частности, определенное значение могут иметь следующие процессы: нарушение целостности клеточной мембраны в результате обширного отпочковывания вирусных частиц через клеточную поверхность (Leonard, Zagury, Desportes, et al., 1988; Lynn, Tweedale, Cloyd, 1988); вмешательство вирусного генома в процессы развития клеточной РНК; накопление в цитоплазме больших количеств гетеродисперсных молекул РНК; нарушение процессов белкового синтеза в результате накопления избыточных количеств вирусных РНК (Somasundaran, Robinson, 1988; Koga, Lindstrom, Fenyó, et al., 1988); накопление большого количества разрозненных частиц вирусной ДНК в клеточной цитоплазме (Shaw, Hahn, Arya, et al., 1984); развитие патологических процессов тирозинового фосфорилирования белков; внутриклеточное связывание вирусного белка gp120 с мембранным рецептором CD4 (Koga, Sasaki, Yoshida, et al., 1990; Cao, Park, Cooper, et al., 1996).

Видовые особенности цитопатического действия вируса определяются молекулярной последовательностью поверхностного белка gp120, что указывает на важность поверхностных структур вируса в данном процессе. Важным условием распространения инфекционного процесса, вероятно, является слияние мембран инфицированных клеток с мембранами неинфицированных CD4+ клеток благодаря формированию так называемого синцития. По крайней мере, было установлено, что существует корреляция между способностью вируса формировать синцитии в системе *in vitro* и агрессивностью клинического течения инфекции. Причем, эффективность формирования синцития зависит от наличия специальных лейкоцитарных молекул LFA-1 на поверхности человеческих CD4+ Т-лимфоцитов (Yoffe, Lewis, Petrie, et al., 1987; Hildreth, Orentas, 1989; Pantaleo, Butini, Graziosi, et al., 1991).

Гуморальный и клеточный иммунный ответ обеспечивают защитные функции, благодаря удалению вируса и клеток, инфицированных вирусом. Однако, поскольку мишенями для иммунной защиты являются сами же иммунные клетки, защитные процессы могут оказаться основной причиной удаления иммунокомпетентных клеток и нарушения иммунологических функций. Растворимые вирусные белки, в частности gp120, способны связываться с высокой степенью аффинности с молекулами CD4 на поверхности неинфицированных Т-лимфоцитов и моноцитов. Кроме того, вирус и/или вирусные белки связываются с дендритными или фолликулярными дендритными клетками. При этом противовирусные антитела способны распознавать такие молекулы и вызывать их элиминацию посредством антителозависимой клеточной цитотоксичности (Weinhold, Lyerly, Stanley, et al., 1989; Zarling, Ledbetter, Sias, et al. 1990; Manca, Habeshaw, Dalglish, 1990; 335).

Другой важный механизм элиминации иммунных клеток ассоциирован с существованием гомологии между неполиморфными детерминантами антигенов I типа Главного Комплекса Гистосовместимости с вирусными антигенами gp120 и gp41. Такое сходство может вести к образованию аутоантител к собственным белкам, которые способны уничтожать клетки за счет привлечения антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (Golding, Shearer, Hillman, et al. 1989; Grassi, Meneveri, Gullberg, et al. 1991; Silvestris, Williams, Dammacco, 1995)..

Кроме того, существует теория так называемого «слепого гомеостаза», вкратце упомянутая выше. Согласно этой теории, иммунная система стремится восстановить популяцию Т-лимфоцитов вне зависимости от того, к какому типу они принадлежат. В таких условиях результатом селективного уничтожения CD4+ Т-лимфоцитов будет являться усиленное формирование обеих субпопуляций Т-лимфоцитов – как CD4+,

так и CD8+, что может вести к дальнейшему дисбалансу с преобладанием CD8+ Т-лимфоцитов. Если верна, данная теория имеет отношение лишь к ранним фазам инфекционного процесса, поскольку развившаяся болезнь характеризуется выраженным дефицитом обеих субпопуляций Т-лимфоцитов (Fauci and Lane, 2000).

Формирование комплекса вирусного антигена gp120 с антителами к gp120 ведет к перекрестному связыванию поверхностных рецепторов CD4, в результате чего Т-лимфоциты становятся неспособными реагировать на антигенные стимулы, поступающие путем стимуляции другого клеточного рецептора - CD3. Кроме того, перекрестное связывание рецепторов CD4 вирусным антигеном gp120 и/или комплексом gp120/анти-gp120 может вести к нарушениям процессов передачи антигенного сигнала, секреции интерлейкина-2 и экспрессии интерлейкиновых рецепторов. Результатом может явиться неадекватная активация клеток, являющаяся ключевым условием апоптоза и гибели иммунных клеток. Кроме того, важную роль могут сыграть суперантигены, имеющие происхождение от других микробов, которые вызывают состояние неадекватной активации иммунной системы (Banda, Bernier, Kurahara, et al., 1992, Garcia, Dadaglio, Cilote, et al., 1996; Laurence, Hodtsev, Posnett, 1992; Oyaizu, McCloskey, Coronese, et al, 1993). Более подробно механизмы апоптоза и действия суперантигенов, а также другие патогенетические механизмы развития ВИЧ-инфекции будут описаны в главе 3.

## **6.5 Другие иммунные нарушения при ВИЧ-инфекции**

### Нарушения В-лимфоцитов

Нарушения В-лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных проявляются неадекватной активацией, что отражается в спонтанной пролиферации, секреции иммуноглобулинов и гипергаммаглобулинемии, а также повышенной спонтанной секреции таких цитокинов, как TNF $\alpha$  и интерлейкин-6. Другим проявлением дефекта В-лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных является ослабленная реакция на первичную и вторичную иммунизацию белковыми и полисахаридными антигенами. Такие нарушения могут, отчасти, служить причиной повышенной заболеваемости ВИЧ-инфицированных разнообразными бактериальными инфекциями, а также причиной повышенной смертности детей, неспособных адекватно реагировать на обычное бактериальное окружение (Kehrl, Rieckmann, Kozlow, et al.; 1992; Rieckmann, Poli, Fox, et al., 1991; Rieckmann, Poli, Kehrl, et al., 1991; Amadori, Chieco-Bianchi, 1990; Ginaldi, De Martinis, D'Ostilio, et al. 1998).

При ВИЧ-инфекции отмечается некоторое снижение количества В-лимфоцитов. Было показано, что продукты экспрессии генов V $\beta$ 3, расположенные на поверхности В-лимфоцитов, могут служить в качестве вирусных рецепторов, наравне с CD4 молекулами на поверхности Т-лимфоцитов, что может явиться причиной прямого цитотоксического действия вируса на В-лимфоциты. При этом, также, может наблюдаться действие вируса в качестве суперантигена (Berberian, Goodglick, Kipps, et al. 1993; Goodglick, Zevit, Neshat, et al, 1995).

В ряде исследований было продемонстрировано общее повышение концентрации иммуноглобулинов класса Е у ВИЧ-инфицированных. Предполагается ассоциация между повышением уровня иммуноглобулинов Е и появлением разновидностей вируса ВИЧ, индуцируемых синцитиумом (Wright, Nelson, Ledford, et al., 1990; Mazza, Grieco, Reddy, et al., 1995; Vigano, Balotta, Trabattoni, et al., 1996).

## Нарушения моноцитов и макрофагов

Также, как и Т-лимфоциты, моноциты несут на своей поверхности CD4 рецепторы и, следовательно, являются мишенями для вируса ВИЧ. Однако количественное содержание моноцитов у больных с ВИЧ-инфекцией, как правило, остается на уровне нормы. Дело в том, что степень цитотоксичности вируса по отношению к моноцитам является относительно низкой. Это означает, что клетки моноцитарного ряда могут служить в качестве резервуара для вируса ВИЧ, и принимать участие в его распространении даже в условиях антиретровирусной терапии (Cheng-Mayer, Liu, Landau, et al., 1997; Rana, Besson, Cook, et al., 1997; Di Marzio, Tse, Landau, 1998; He, Chen, Farzan, et al. 1997; Perelson, Essunger, Cao, et al., 1997)

Хотя в условиях *in vivo* достаточно сложно выявить инфицированные циркулирующие моноциты, инфицирование тканевых макрофагов, в особенности макрофагов головного мозга (инфильтрирующих макрофагов или оседлых клеток микроглии), а также альвеолярных макрофагов, довольно легко установить (Weinberg, Mathhews, Cullen, et al., 1991; Schnittman, Psallidopoulos, Lane, et al., 1989; Valentin, Gegerfelt, Matsuda, et al., 1991; Collman, Hassan, Walker, et al., 1989; Koenig, Gendelman, Orenstein, et al., 1986; Armstrong, Horne, 1984).

Инфицирование моноцитарных предшественников в костном мозгу является патогномичным признаком ряда гематологических нарушений у ВИЧ-инфицированных. Кроме того, у таких лиц наблюдаются такие нарушения, как недостаточная секреция интерлейкинов 1 и 12 и, наоборот, усиленная секреция интерлейкина 10, нарушения антиген-презентирующих свойств и способности индуцировать Т-клеточный ответ, дефекты Fc рецепторов и системы комплемента, нарушения окислительного метаболизма (респираторного взрыва), а также дефекты хемотаксиса и антигензависимой клеточной цитотоксичности (Ennen, Seipp, Norley, et al., 1990; Yoo, Chen, Kraus, et al. 1996; Polyak, Chen, Hirsch, et al., 1997; Meyaard, Schuitemaker, Miedema, 1993; Bender, Augor, Quinn et al., 1986; Baldwin, Fleischmann, Chung, et al., 1990; Kent, Stent, Sonza, et al., 1994; Poli, Botazzi, Acero, et al., 1985; Muller, Rollag, Froland, 1990; Spear, Kessler, Rothberg, et al., 1990; Lafrenie, Wahl, Epstein, et al., 1996).

Механизмы моноцитарных нарушений не могут быть объяснены лишь прямым цитотоксическим действием вируса ВИЧ. При воздействии на моноциты вирусным белком gp120, а также определенными цитокинами, может происходить неадекватная активация клеток, что ведет к дисфункции иммунной системы. Следствием указанных процессов может явиться неэффективная антибактериальная активность моноцитов-макрофагов по отношению к таким патогенам, как *Candida*, *Toxoplasma gondii*, и *Histoplasma capsulatum* (Crowe, Vardaxis, Kent, et al., 1994; Biggs, Hewish, Kent, et al., 1995; Chaturvedi, Newman, 1997).

## Нарушения дендритных клеток и клеток Лангерганса

Дендритные клетки представляют собой первую линию обороны слизистых оболочек и лимфоидных органов против вируса ВИЧ. Предполагается также, что эти клетки обеспечивают перенос вируса к лимфоидным органам, предоставляя его CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитам и способствуя вирусной диссеминации. Дендритные клетки экспрессируют ряд хемокиновых рецепторов, которые могут использоваться в качестве корецепторов для связывания вируса (Granelli-Piperno, Moser, Pope, et al.,

1996; Rubbert, Combadiere, Ostrowski, et al., 1998; см. также главу 1, раздел «Жизненный цикл вируса ВИЧ» и подраздел «Связывание с рецепторами и корецепторами иммунных клеток»).

В настоящее время не существует единой точки зрения относительно действия вируса ВИЧ на функции дендритных клеток. Есть сообщения о том, что при ВИЧ-инфекции нарушается способность дендритных клеток предоставлять антигены иммунным клеткам, хотя другие группы исследователей не обнаружили каких-либо дисфункций дендритных клеток (Macatonia, Lau, Patterson, et al., 1990; Karhumaki, Viljanen, Cottler-Fox, et al., 1993; Hsia, Tsai, Zvaifler, et al., 1995). Больше согласие существует относительно способности вируса ВИЧ вызывать функциональные нарушения клеток Лангерганса, которые представляют собой те же самые дендритные клетки, только расположенные в коже и слизистых оболочках. Причем, указанные клетки могут играть важную роль в инициации и распространении инфекционного процесса (Dezutter-Dambuyant, Schmitt, 1993; Giannetti, Zambruno, Cimarelli, et al. 1993; Muller, Weier, Kojouharoff, et al., 1993; Zambruno, Giannetti, Bertazzoni, et al., 1995; Blauvelt, Katz, 1995).

Результаты ряда исследований позволяют предположить, что подверженность клеток Лангерганса к инфицированию вирусом ВИЧ зависит от подтипа вирусов. (Soto-Ramirez, Renjifo, McLane, et al., 1996). В частности, подтип В, распространенный в США и Западной Европе, плохо реплицируется в клетках Лангерганса, в то время как подтип Е, получивший распространение в Юго-Восточной Азии, способен достаточно эффективно реплицироваться в этих клетках (Soto-Ramirez, Renjifo, McLane, et al., 1996). В связи с вышеизложенным, было высказано предположение о том, что эпидемиологические особенности механизмов передачи вируса связаны с особенностями заражения клеток Лангерганса. Так, в США и Европе основными путями передачи вируса являются гомосексуальный и трансфузионный (через зараженные иглы), в то время как в странах южной части Африки (субэкваториальных странах), Азии и Индии около 90 процентов инфекции передается гетеросексуальным путем (Quinn, 1996). Считается, что та молекулярная разновидность вируса ВИЧ, которая эффективно реплицируется в клетках Лангерганса, вероятнее всего вовлекается в развитие инфекции, передаваемой гетеросексуальным путем (Spiga, Marx, Patterson, et al, 1996). Следует, однако, отметить, что существуют определенные противоречия в интерпретации этой гипотезы, и необходимо провести дальнейшие, более углубленные исследования, для того чтобы установить истинную роль молекулярной дихотомии вируса в предпочтительном заражении иммунных клеток и эпидемиологических особенностях его глобального распространения (Pope, Frankel, Mascola, et al., 1997; Dittmar, Simmons, Hibbitts, et al, 1997).

#### Нарушения естественных киллеров

Как указывалось выше, роль естественных киллеров заключается в обеспечении иммунологического надзора за вирус-инфицированными клетками, определенными типами опухолей и аллогенными клетками. Функциональные нарушения естественных киллеров имеют место в течение всего процесса ВИЧ-инфекции; причем степень этих нарушений зависит от тяжести заболевания. Было продемонстрировано количественное снижение количества CD16<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> субпопуляций естественных киллеров. Данные о нарушении цитолитических свойств естественных киллеров достаточно противоречивы. Если такие нарушения и существуют, то, более вероятно, они связаны с недостаточностью стимулирующих сигналов со стороны CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов (Hu, Hultin, Hultin, et al., 1995; Lucia,

Jennings, Cauda, et al., 1995; Ahmad, Menezes, 1996a; Ahmad, Menezes, 1996b; Ullum, Gotzsche, Victor, et al., 1995).

Важно отметить, что естественные киллеры являются важными источниками СС-хемокинов, которые способны подавлять вирус ВИЧ у инфицированных лиц (см. ниже: роль цитокинов). В частности, они способны продуцировать значительные количества таких хемокинов, как MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  и RANTES. Данная продукция еще больше усиливается при стимуляции интерлейкинами 2 и 15. Таким образом, аналогично CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитам, естественные киллеры способны как подавлять репликацию вируса, так и действовать посредством цитокинов и других растворимых факторов (Oliva A, Kinter AL, Vaccarezza M, et al., 1998).

## 6.6 Роль цитокинов в патогенезе ВИЧ-инфекции

Иммунная система находится в состоянии гомеостаза, благодаря регуляции со стороны цитокинов – химических соединений, продуцируемых, в основном, лимфоцитами и макрофагами. Цитокины содержатся в крови в избыточных количествах и продуцируются постоянно, даже в условиях, когда иммунная система находится в состоянии покоя. При активации иммунных клеток во время антигенной стимуляции происходит усиление продукции цитокинов.

Показано, что цитокины могут играть определенную роль в регуляции экспрессии вируса ВИЧ в системе *in vitro*. Цитокинами, способными индуцировать экспрессию вируса ВИЧ, являются интерлейкины IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, факторы некроза опухолей - TNF $\alpha$  и TNF $\beta$ , фактор, стимулирующий колонии макрофагов, - M-CSF, а также фактор, стимулирующий колонии гранулоцитов-макрофагов, - GM-CSF (Cohen, Kinter, Fauci, 1997; Fauci, 1996; Miedema, 1992; Poli, Fauci, 1995; Alonso, Pontiggia, Medenica, et al., 1997; Smithgall, Wong, Critchett, et al., 1996; Bayard-McNeeley, Doo, He, et al., 1996; Kinter, Poli, Fox, et al., 1995; Lucey, Pinto, Bethke, et al., 1997). Среди указанных цитокинов, наиболее выраженный эффект отмечался у так называемых про-воспалительных цитокинов, к которым относятся TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-6 (Cohen, Kinter, Fauci, 1997; Poli, Fauci, 1995). Показано, что интерфероны INF- $\alpha$  и INF- $\beta$ , а также IL-16 способны подавлять репликацию вируса ВИЧ (Zhou, Goldstein, Devadas, et al. 1997; Maciaszek, Parada, Cruikshank, et al., 1997). Другая группа цитокинов - трансформирующий фактор роста - TGF- $\beta$ , такие интерлейкины, как IL-4 и IL-10, а также IFN $\gamma$ , способны либо усилить, либо подавить экспрессию вируса ВИЧ, в зависимости от примененной модели исследования (Naif, Li, Ho-Shon, et al., 1997; Valentin, Lu, Rosati, et al., 1998; Weissman, Poli, Fauci, 1995).

Важно отметить, что высокие уровни экспрессии цитокинов имеют место в лимфоидной ткани – там, где, в основном, происходит активная репликация вируса ВИЧ. Причем, основными продуцентами цитокинов являются хронически активированные CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты и макрофаги (Boyle, Berger, Tschuchnigg, et al., 1993; Graziosi, Pantaleo, Gantt, et al., 1994; Graziosi, Gantt, Vaccarezza, et al., 1996; Alonso, Pontiggia, Medenica, et al., 1997; Emilie, Peuchmaur, Maillot, et al. 1990; Esser, vonBriesen, Brugger, et al., 1991).

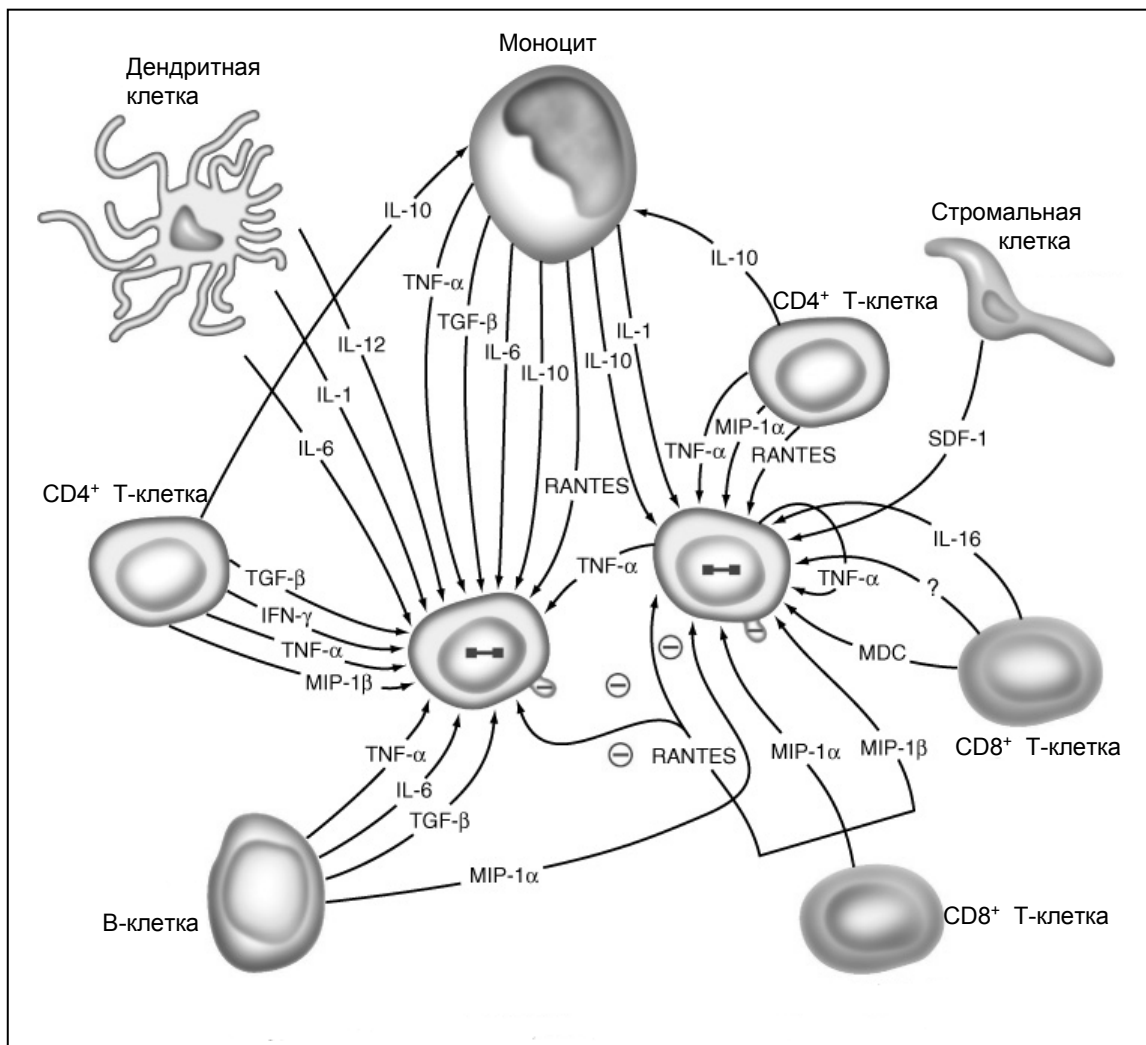
Как известно, Т-хелперные лимфоциты подразделяются на две группы, в зависимости от типа продуцируемых цитокинов. Клетки первой группы называются Т-хелперами-1 (ТН)-1. Они характеризуются способностью секретировать IL-2 и IFN $\gamma$  и опосредовать клеточные иммунные реакции. Клетки второй группы - ТН-2 характеризуются

секрецией IL-4, IL-5 и IL-10 и способностью опосредовать гуморальный иммунный ответ. В связи с этим принято подразделять характер иммунного ответа в зависимости от секретируемых цитокинов на два типа - TH-1 и TH-2 (Romagnani, 1992; Hsieh, Macatonia, Tripp, et al. 1993; Trinchieri, 1993). Показано, что ВИЧ-инфицированные лица проявляют снижение способности функционировать по типу TH-1, в сравнении с TH-2. Однако, пока нет убедительных доказательств того, что дихотомия иммунных клеток играет существенную роль в патогенезе ВИЧ-инфекции (Clerici, Hakim, Venzon, et al., 1993; Clerici, Wynn, Berzofsky, et al., 1994; Maggi, Mazzetti, Ravina, et al., 1994; Meyaard, Otto, Keet, vanLier, et al., 1994; Clerici, Shearer, 1993; Klein, Dobmeyer, Dobmeyer, et al., 1997; Vyakarnam, Mearns, Martin, et al., 1995; Clerici, Balotta, Meroni, et al., 1996).

Многие соединения, участвующие в регуляции репликации вируса ВИЧ, способны функционировать в синергичном взаимодействии. Конечным результатом действия многих цитокинов является та или иная степень репликации вируса ВИЧ, которая зависит от баланса между стимулирующим и подавляющим действием цитокинов. Примером такой эндогенной регуляции является действие интерлейкина-10 (IL-10), который способен подавлять репликацию вируса ВИЧ путем блокирования цитокинов, стимулирующих репликацию вируса – таких, как TNF $\alpha$  и IL-6.

Молекулярные механизмы регуляции вирусной репликации могут быть охарактеризованы на примере такого цитокина, как TNF $\alpha$ , который активирует белок NF- $\kappa$ B, служащий активатором вируса на уровне его транскрипции. В то же время, стимулирующий эффект IL-1 $\beta$ , хотя и реализуется на уровне транскрипции, никак не связан с белком NF- $\kappa$ B (Osborn, Kunkel, Nabel, 1989; Duh, Maury, Folks, et al., 1989). Действие таких цитокинов, как IL-6, GM-CSF и IFN $\gamma$  на репликацию вируса ВИЧ, вероятнее всего, происходит на посттранскрипционном уровне. У ВИЧ-инфицированных больных повышенные уровни TNF $\alpha$  и IL-6 обнаруживаются в плазме и цереброспинальной жидкости, а повышенные концентрации TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$  и IL-6 наблюдаются в лимфоузлах. Механизмы действия  $\beta$ -хемокинов RANTES, MIP-1 $\alpha$  и MIP-1 $\beta$  заключаются в блокировании связывания вируса с макрофагальным ко-рецептором CCR5.

Участие цитокинов в регуляции репликации вируса ВИЧ представлено на рисунке 6.2.



**Рисунок 6.2. Сеть цитокинов, участвующих в регуляции репликации вируса ВИЧ.** Провоспалительные цитокины TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , и IL-6 способствуют усилению репликации. TGF- $\beta$  и IL-10 подавляют репликацию; причем в случае с IL-10 это происходит за счет подавления провоспалительных цитокинов. SDF-1 подавляет штаммы утилизирующие CXCR4, в то время как MDC-1 подавляет как штаммы утилизирующие CXCR4, так и штаммы утилизирующие CCR5. (Заимствовано из Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, Sixth Edition, 2005, рисунок 116-3, стр 1539, Elsevier Inc.)