**Иммунологический сэндвич, или как ищут вирусы**

С.Ю. Афонькин

Наш организм подобен государству, границы которого ежедневно штурмуют толпы иностранцев, въезд которых в страну нежелателен или даже строго запрещен. Через широко распахнутые входные ворота пищеварительной и дыхательной систем в него проникают многочисленные микроскопические простейшие, споры грибов, пыльца, бактерии и всевозможные вирусы. По счастью, большинство этих невольных иммигрантов не представляют для нас потенциальной угрозы. Организм – государство с четко работающей полицейской инфраструктурой, и прибывающие чужаки встречают более чем суровый прием. Большинство из них гибнет еще на контрольно-пропускных пунктах нашего тела – на влажных оболочках глаз, в гортани. Многие вязнут в трясине слизистых выделений носовых ходов и альвеол легких. «Зайцы», попадающие в организм вместе с пищей, перевариваются в желудке. Наконец, наиболее упорных, добравшихся до кровеносной системы, добивает иммунная система.

Основную массу незванных микроскопических визитеров составляют безобидные дилетанты, вовсе не вынашивающие коварных планов интервенции. Иначе ведут себя хорошо вышколенные профессиональные агенты – патогенные вирусы. Они способны нарушать границы клеточного государства нашего тела в самых труднодоступных для микроорганизмов местах, порой не без помощи человека. Именно так на острие нестерильной иглы шприца в кровь проникают вирусы гепатита и СПИДа.

Некоторые вирусы устроены так, что им для активирования необходимо вмешательство защитных сил организма. Так, например, ротавирусам, вызывающим у детей тяжелые кишечные заболевания, необходима атака протеолитических ферментов пищеварительной системы. При этом разрушаются защитные участки на поверхности вирусов и оголяются специальные белки, обеспечивающие связывание этих вирусов с клетками-мишенями.

Поверхностные белки позволяют вирусам безошибочно находить свои жертвы среди миллиардов клеток по специальным белкам-маркерам на их поверхности. Нередко несколько разных типов клеток несут на своей поверхности одинаковые маркеры, что свидетельствует об их общем происхождении. Вирусы атакуют всех представителей одной клеточной «семьи». Вирус СПИДа, например, проникает не только в лимфоциты, но и в макрофаги, в некоторые костные клетки и даже в те клетки кожи, у которых с клетками иммунной системы имеются общие предки.

После того как вирус проник в организм, его атака на клетки-мишени происходит порой так быстро, что иммунная система просто не успевает организовать группу захвата – то есть выработать специфические антитела. С током крови вирусная частица за сутки может попасть в любой участок тела. А первичный иммунный ответ развивается минимум за неделю, да и то если вирусов много и они постоянно доступны для атак макрофагов и лимфоцитов.

Вирусы же, атаковав свою жертву, часто «ложатся на дно»: не размножаются, а лишь встраивают свой генетический материал в виде фрагмента ДНК в геном клетки-мишени. Именно так ведут себя вирусы СПИДа, относящиеся к группе ретровирусов. К сожалению, в клетках нет механизма контроля за «чистотой» собственного генома, и встроенный фрагмент вирусной ДНК может копироваться вместе с геномом клетки-хозяина годами, до поры до времени никак себя не проявляя. Поэтому от момента заражения, например вирусом СПИДа, до начала собственно заболевания могут пройти годы.

На первый взгляд обнаружить специфическую вирусную ДНК в немногих зараженных клетках так же трудно, как найти листик с шифровкой о диверсионных действиях, засунутый между страниц многотомного издания, хранящегося в обширной библиотеке. И тем не менее способ детекции существует. Он основан на уникальности фрагментов ДНК. Достаточно сказать, что отрезок длиной всего в 15 нуклеотидов может иметь миллиард вариантов. Именно благодаря такому разнообразию любой уникальный отрезок ДНК можно опознать по его небольшому фрагменту. Представьте себе, что вам в руки попался маленький клочок бумаги с единственной строчкой: «Мой дядя самых честных правил...». Совершенно очевидно, что это отрывок из романа А.С. Пушкина «Евгений Онегин» и к творчеству Ф.М. Достоевского он отношения не имеет. Не вдаваясь в методические тонкости, достаточно упомянуть полимеразную цепную реакцию (ПЦР).

Чувствительность молекулярных методов детекции чужеродной ДНК методом ПЦР потрясает воображение – достаточно нескольких десятков молекул ДНК в 1 мл раствора. Таким образом можно, например, обнаружить один зараженный лимфоцит из многих сотен тысяч. Если же учесть, что лимфоциты составляют лишь несколько процентов от всех клеток крови, а единственная копия вирусной ДНК затеряна в клеточном ядре среди сотен тысяч генов самого организма, то успех охоты за вирусом представляется просто фантастическим! Правда, обнаружить вирус таким изощренным способом можно только с помощью дорогих реактивов в хорошо оснащенной биологической лаборатории. К тому же необходимо соблюдать особую чистоту на всех этапах работы.

Дело в том, что окружающий нас мир полон не только микробов и вирусов. Он насыщен молекулами ДНК. Во-первых, каждый человек, включая исследователей, лаборантов, врачей и пациентов, разбрасывает вокруг себя сотни тысяч постоянно слущивающихся клеток кожи. Все они содержат полный геном человека. Во-вторых, в лабораториях, где работают с ДНК, фрагменты этих молекул буквально носятся в воздухе. Попади они в пробы для анализа, и в результате возможна ошибка.

Поэтому уверенная диагностика вирусных инфекций часто становится возможной только тогда, когда вирусы начинают творить свое черное дело – интенсивно размножаться. Делают это они, надо признать, виртуозно. Нередко при этом весь биосинтетический аппарат клетки переключается на производство вирусных частиц. При полиомиелите, например, уже через несколько часов работы в таком режиме из одной лопнувшей клетки выходят сотни тысяч новых вирусных частиц.

И все же, несмотря на такие темпы размножения, попытки поставить диагноз, непосредственно обнаружив разбойничающий вирус, часто обречены на провал. Ведь счет клеток в организме идет на миллиарды, а в поле зрения электронного микроскопа попадают лишь единицы. Поиск вирусов под микроскопом можно уподобить проверке документов у группы случайно задержанных лиц в надежде наткнуться на вражеского шпиона. К тому же некоторые вирусы предпочитают обретаться в местах более чем труднодоступных для взятия проб. К примеру, вирус бешенства в качестве своей штаб-квартиры облюбовал так называемые аммоновы рога – структуру головного мозга, к которой без трепанации черепа не доберешься.

Обычно вирусную инфекцию обнаруживают совершенно иначе. Для того чтобы утверждать, что в организме присутствуют те или иные вирусы, достаточно обнаружить его реакцию на них. Дело в том, что наш организм обеззараживает вирусы примерно так же, как сами вирусы находят клетки-мишени. Все сводится к взаимодействию комплементарных (взаимно соответствующих) поверхностей молекул – они образуют комплекс по принципу «ключ-замок». Сначала иммунная система с помощью макрофагов и Т-лимфоцитов тщательно знакомится с особенностями пространственного устройства отдельных участков вирусных белков (иммунологи называют их антигенами). Затем В-лимфоциты начинают вырабатывать специфические антитела – иммуноглобулины, взаимодействующие только с этими антигенами. Поскольку белки вирусов уникальны, то и образовавшиеся к ним антитела высокоспецифичны. Словно спущенная с цепи свора гончих, иммуноглобулины рыскают по кровеному руслу и протокам лимфатической системы, готовые в любую минуту опознать непрошенных гостей и «вцепиться» в них. Таким образом достаточно доказать существование в организме определенного количества антител к искомому вирусу, и в его присутствии можно не сомневаться.

На первый взгляд такая задача кажется почти неразрешимой. Число различных вариантов антител оценивается специалистами в сотни миллионов, да к тому же все антитела внешне похожи друг на друга. Решить эту проблему можно с помощью специфических взаимодействий антигенов и антител. Дело в том, что вирусные белки реагируют только со специфическими, комплементарными им антителами, а все остальные антитела им безразличны. Таким образом задача исследователя сводится к добавлению в образец плазмы крови своеобразной приманки – вирусных белков. Если комплексы образуются, значит, данный вирус уже успел поразбойничать в организме.

Успех охоты на вирус во многом зависит от качества приманки. Чтобы ее получить, вирусы культивируют в лабораториях на специальных клеточных линиях, затем очищают, концентрируют, после чего лизируют вирусные частицы – «разбирают» их на отдельные части. Некоторые из белков, на которые реагирует иммунная система (обычно это поверхностные белки вируса), тем или иным способом фиксируют на поверхности лунок, сделанных в специальных пластиковых планшетах. После добавления в лунки антител они прочно сядут на подготовленное для них ложе, если там есть вирусные белки.

Приготовление вирусных лизатов – процедура довольно хлопотная и опасная. Особенно когда имеешь дело с таким безжалостным убийцей, как вирус СПИДа. Гораздо безопаснее работать с отдельными вирусными белками, которые можно получить с помощью методов биотехнологии. Для этого соответствующие вирусные гены вводят в кишечную палочку. Она послушно начинает работать «на заказ», синтезируя помимо своих собственных белков некоторое количество вирусных. Кроме того, небольшие фрагменты вирусных белков удается синтезировать биохимическими методами.

Надо, впрочем, честно признаться, что оба этих способа не лишены своих недостатков. Например, трудно полностью отделить вирусные белки от белков кишечной палочки. А к последним в крови людей есть антитела, поэтому возможны ошибки при тестировании. Короткие синтетические пептиды могут оказаться плохими иммуногенами. Ведь крупный белок подчас облепляется антителами словно ежик яблоками. Разные иммуноглобулины садятся на разные участки белка – отсюда и мощный комплексный ответ иммунной системы на чужеродные белки. А на одну «иголочку» синтетического пептида много яблок не наколешь. В идеале следовало бы ловить антитела к вирусу на все его белки одновременно. Однако при таком способе резко возрастает стоимость тестирования.

Предположим, полученные тем или иным способом вирусные белки все-таки связались с комплементарными к ним антителами. Как же теперь выявить эти комплексы в сыворотке крови? Это стало возможно с начала 70-х гг. Именно тогда голландские исследователи Е.Энгвалл, П.Пельман, В.Ван-Вимен и А.Шуурс научились присоединять к антителам молекулы ферментов. Ферменты подбирают таким образом, чтобы легче было регистрировать результат катализируемых ими реакций. Например, они должны заметно менять цвет реакционной смеси. Антитела человека для других животных являются чужеродными белками, т.е. антигенами. Если ввести их, например, кролику, то в его крови появятся антитела на человеческие антитела, которые можно выделить. К полученным антителам животного «пришивают» соответствующий фермент. Получившийся комплекс, называемый конъюгатом, и используют для связывания с антителами человека.

В лунку с зафиксированными в ней вирусными антигенами (белками и их фрагментами) вносят каплю сыворотки крови пациента. Если антитела против вируса присутствуют в сыворотке, они прочно присоединятся к вирусным антигенам. Затем лунку промывают, удаляя все человеческие антитела, не имеющие отношения к данному вирусу. После промывки добавляют заранее полученный конъюгат. Если в лунке остались человеческие антитела, конъюгат к ним обязательно присоединится. Лунки снова промывают и добавляют субстрат для фермента. Если фермент в лунке остался, он изменит цвет реакционной смеси. Это и будет являться свидетельством того, что данный вирус в организм попал и иммунная система на такое вторжение отреагировала!

Описанную схему можно менять на все лады. Например, сажать на поверхность лунок не вирусный антиген, а очищенные антитела к нему. Тогда мы будем искать в сыворотке не антитела к вирусу, а сами вирусные частицы. Вместо кроличьих антител иногда используют белок А золотистого стафилококка, который великолепно связывается с любыми человеческими антителами. Наконец, фермент можно заменить радиоактивной меткой или флуоресцирующей краской. В общем, как говорится, возможны варианты.

В целом же наиболее распространенный в медицинской практике принцип поиска вирусов остается неизменным: на антиген сажают антитело, потом сверху еще одно антитело... Это похоже на приготовление бутерброда, не случайно поэтому иммунологи называют такой прием сэндвич-методом. Существуют и другие, более изощренные приемы. К сожалению, все они, включая дорогую диагностику чужеродной ДНК с помощью ПЦР, пока позволяют лишь констатировать печальный факт наличия вирусной инфекции. Однако диагностика инфекций совершенно необходима при оценке эффективности действия противовирусных препаратов, а также вакцин.