

# ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМИ УВЕИТАМИ ГЕРПЕТИЧЕСКОГО И ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОГО ГЕНЕЗА

Гулямова М.Д., Ризопулу А.П. \*\*, Камилов Х.М.,  
Файзиева У.С., Умарова А.А. \*, Гариб Ф.Ю. \*\*, Арипова Т.У. \*

Ташкентский Институт усовершенствования врачей МЗ РУз,

\* Институт иммунологии АН РУз, Ташкент, Узбекистан;

\*\* СПб ГМУ им. акад.И.П.Павлова, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** Обследованы больные с хроническими увеитами, обусловленными наличием ВПГ+ЦМВ (микстувейты) и ВПГ (моноувейты) инфекцией. Обнаружен дефицит CD3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, CD4<sup>+</sup> и достоверный рост CD8<sup>+</sup> лимфоцитов при микстувейтах, более выраженная степень поражения Т-звена иммунитета отмечена при задних увеитах. Моноинфекция герпетического происхождения характеризовалась снижением числа клеток, экспрессирующих CD3<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> лимфоциты, гипоглобулинемией IgG. Независимо от этиологического фактора, в обеих группах у пациентов с увеитами выявлено резкое увеличение числа CD16<sup>+</sup> натуральных киллеров, а также подавление клеток с фенотипом CD25<sup>+</sup> рецепторов к IL-2, повышение числа активированных CD38<sup>+</sup> лимфоцитов, а также клеток с поздними маркерами активации CD95<sup>+</sup> и HLA-DR<sup>+</sup> при увеитах смешанной и моновирусной этиологии. IFN $\alpha$  выявляется в низких концентрациях, либо не выявляется совсем, отмечена повышенная продукция TNF $\alpha$  только в слезной жидкости с задней локализацией процесса.

Обнаружены статистически значимые взаимосвязи между числом лимфоцитов, экспрессирующих HLA-DR<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>, CD95<sup>+</sup> и HLA-DR<sup>+</sup>, количеством CD95<sup>+</sup> лимфоцитами и экспрессией TNF $\alpha$  в период хронической персистенции вирусов семейства Herpesviridae у больных с эндогенными увеитами. Глубина иммунологических поражений коррелировала с тяжестью клинической картины.

**Ключевые слова:** увеит, цитомегаловирус, герпесвирус, цитокины, активационные маркеры лимфоцитов

*Guliamova M.D., Rizopulu A.P., Kamilov H.M., Faisieva U.S., Umarova A.A., Garib F.Yu., Aripova T.U.*

## IMMUNOLOGICAL CHARACTERIZATION OF THE PATIENTS WITH CHRONIC UVEITIS CAUSED BY HERPES AND CYTOMEGALOVIRUS

**Abstract.** The study included patients with chronic uveitis caused by herpes simplex virus (HSV), or mixed HSV/ cytomegalovirus (CMV) infections. Deficiencies in CD3<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and significant increase of CD8<sup>+</sup> lymphocyte subpopulations were found in posterior uveitis. A single-pathogen (HSV) infection was characterized by decreased expression of CD3<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> lymphocytes, IgG hypoglobulinaemia. Irrespective of etiology, both groups of the patients exhibited sharp increase in CD16<sup>+</sup> cells, as well as suppressed CD25<sup>+</sup> receptors for IL-2, increased numbers of activated CD38<sup>+</sup> lymphocytes, enhanced expression of late activation markers (CD95<sup>+</sup> and HLA-DR<sup>+</sup>) in both mixed and single-pathogen uveitis. IFN-alpha is detected at low concentrations, or is absent; increased TNF-alpha production was noted in the tears in cases of posterior uveitis.

Statistically significant interrelations have been found between expression of HLA-DR<sup>+</sup>, and CD3<sup>+</sup>; CD95<sup>+</sup> and HLA-DR<sup>+</sup>; CD95<sup>+</sup> lymphocytes and TNF-alpha levels in the course of chronic persistence of Herpesviridae in the patients with chronic uveitis. The degree of immunological disturbances correlated with severity of clinical features. (*Med. Immunol.*, 2005, vol.7, № 5-6, pp 543-550)

### Адрес для переписки:

Ризопулу А.П.

197022, Санкт-Петербург, ул.Льва Толстого, д. 6/8,  
СПб ГМУ им.акад.И.П.Павлова, НМЦ

по молекулярной медицине.

Тел/факс: (812) 234-90-38, 499-71-94.

E-mail: annarizopulu@inbox.ru

Актуальность изучения вирусных инфекций глаз в настоящее время обусловлена широкой их распространенностью, склонностью к хроническому рецидивирующему течению, частой неэффективностью известных методов терапии. В настоящее время более 150 вирусов признаны патогенными для органа зрения, в том числе вирусы простого герпеса - ВПГ 1 и 2 типов, цитомегаловирусы.

Герпесвирусы широко распространены в человеческой популяции. Так, вирусами простого герпеса (ВПГ) инфицировано 65-90% взрослого и детского населения планеты [3, 17]. Они способны поражать практически все органы и системы организма хозяина, вызывая латентную, острую и хроническую формы инфекции [6, 12, 23].

Рецидивирующее течение герпеса обусловлено особенностями взаимодействия вируса с иммунной системой человека. После первичного заражения вирус простого герпеса сохраняется в латентном состоянии в нервных ганглиях на протяжении всей жизни, периодически вызывая обострения различной локализации у 30-50% пациентов, что свидетельствует о неспособности иммунной системы санировать организм от вируса [2]. Сохраняющиеся в течение всей жизни, иногда в довольно высоких титрах, вируснейтрализующие антитела хотя и препятствуют распространению патогена, но не предупреждают возникновения рецидивов [16]. В то же время адекватный ответ по клеточному типу, обусловленный Th1 лимфоцитами содействует элиминации вирусов.

В последние годы появились убедительные доказательства в пользу того, что при хронической герпесвирусной инфекции, так же как и при СПИДе может формироваться пожизненная иммуносупрессия [15]. Вирусы семейства *Herpesviridae* обладают способностью не только персистировать, но и репродуцироваться в клетках иммунной системы, обуславливая гибель или снижение функциональной активности иммуноцитов, что способствует развитию вторичных иммунодефицитных состояний и поддерживает длительную его персистенцию. Кроме того, они «изобрели» многочисленные способы ускользания от иммунологического надзора. Таким образом, возникает «порочный круг». Вирус поражает ткани глаза при преодолении им местных защитных механизмов, к которым относят продукцию секреторных антител (sIgA) клетками субэпителиальной лимфоидной ткани, местную продукцию интерферона, сенсибилизированные лимфоциты. Попадая в ткани глаза нейрогенным или гематогенным путем, герпесвирусы начинают активно размножаться в клетках эпителия роговицы и эндотелия сосудистого русла глаза, которые, вследствие цитопатических и дистрофических процессов, подвергаются некрозу [4, 21, 23].

С одной стороны, герпесвирусы обладают прямым повреждающим действием на клетки, вызывая их гибель с последующим развитием воспалительных реакций. С другой стороны, ряд авторов указы-

вают на способность вирусов к антигенной мимикрии с возникновением перекрестно-реагирующих антигенов, ответственных за запуск аутоиммунных реакций в роговице [7, 22, 24].

Представляло интерес определить глубину поражения клеточных и гуморальных составляющих иммунной системы у больных увеитами, в этиологической структуре которых были задействованы 2 типа вирусов семейства *Herpesviridae* - вирус простого герпеса 1/2 и цитомегаловирус, что и послужило целью данной работы.

## Материалы и методы

Обследованы больные с увеитами, находившиеся на амбулаторном и стационарном лечении в Клинической офтальмологической больнице Минздрава Республики Узбекистан в период с 2002-2005 годы. Возраст пациентов варьировал от 16 до 65 лет. Давность заболевания была в пределах от нескольких дней до 8 лет. На основании выявления этиологического фактора все больные эндогенными увеитами были распределены по группам. Всего было обследовано 185 пациентов с увеитами, вошедших в 2 основные группы: 130 - с наличием ВПГ+ЦМВ (микстувейты) и 55 - с ВПГ (моноувейты).

Для клинической характеристики больных была использована классификация Каспарова А.А. [3], наиболее полно охватывающая как патогенетические, так и клинические варианты герпетической инфекции глаз.

Из 130 пациентов с микст-инфекцией (1 основная группа) было выявлено 8 больных (6,2%) с кератитами (поверхностными и глубокими), 47 больных с передними увеитами, включая 14 больных (10,8%) с иридоциклитами (серозный, фибринозно-пластический), 33 больных (25,4%) - с кератоиридоциклитами (с изъязвлением и без изъязвления), 44 пациента с задними увеитами, включая 16 больных (12,3%) с хориоретинитами и 28 больных (21,5%) с нейроретинитами, а также 5 больных (3,8%) с невритами и 26 больных (20%) с панувейтами.

Из 55 пациентов с офтальмогерпесом было выявлено 14 пациентов (25,5%) с кератитами, 18 больных с передними увеитами, включая 6 человек (10,9%) с иридоциклитами и 12 больных (21,8%) с кератоиридоциклитами, 17 пациентов с задними увеитами, включая 15 (27,3%) больных с хориоретинитами и 2 пациента (3,6%) с нейроретинитами, а также 1 пациент (1,8%) с невритом и 5 (9,1%) пациентов с генерализованными увеитами.

Контрольную группу составили 13 практически здоровых людей. Группа сравнения была сформирована из 19 лиц, не имеющих клинических признаков офтальмопатологии, в сыворотке крови которых выявлялись специфические антитела класса IgG к ВПГ и/или ЦМВ.

Диагноз верифицирован в стационарных и амбулаторных условиях на основе анамнестических и

клинических данных, а также результатов лабораторного обследования с использованием иммуноферментного и ПЦР анализов.

Все больные прошли комплексное обследование с использованием общепринятых офтальмологических, рентгенологических методов, при необходимости больные были обследованы специалистами смежных дисциплин. Офтальмологическое обследование включало визометрию, биомикроскопию с осмотром глазного дна линзой Гольдмана, периметрию, тонографию, ультразвуковое сканирование в А- и В-режиме. Для выяснения этиологии процесса все больные проходили обследование на цитомегаловирус (ЦМВ), вирус простого герпеса (ВПГ-1, ВПГ-2) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) (ВектоЦМВ-ДНК-ампли, ВектоВПГ(1,2)-ДНК-ампли, Вектор-Бест, Россия), иммуноферментного анализа (ИФА) с определением маркеров острой и хронической инфекции (IgM и IgG) в сыворотке крови (ВектоЦМВ-IgG и IgM-стрип, ВектоВПГ-IgG и IgM-стрип, Вектор-Бест, Россия), а также выявления антигенов ВПГ, ЦМВ и хламидий в конъюнктивальном соскобе методом прямой иммунофлюоресценции (ПИФ) с моноклональными антителами (Ниармедик, Москва).

Материалом для исследования служила периферическая кровь и слезная жидкость здоровых лиц и больных увеитом с цитомегаловирусной и/или герпетической инфекцией. Взятие слезной жидкости (300-500 мкл) из нижнего конъюнктивального свода производили микропипеткой после раздражения конъюнктивы (помещение за нижнее веко без анестезии кусочка стерильной ваты) или воздействия на рефлексогенные зоны носа (вдыхание 10% нашатырного спирта).

Материал для иммунологических исследований от больных забирали в первый день обращения (поступления) в стационар до назначения терапии.

У всех пациентов исследовали иммунофенотип основных субпопуляций лимфоцитов периферической крови по идентификации дифференцировочных рецепторов, относящихся к кластерам: CD3<sup>+</sup>; CD4<sup>+</sup>; CD8<sup>+</sup>; CD19<sup>+</sup>; CD16<sup>+</sup>; CD25<sup>+</sup>; CD38<sup>+</sup>; CD95<sup>+</sup>; HLA-DR<sup>+</sup> с помощью моноклональных антител («Медбиоспектр», Москва) в реакции непрямой иммунофлюоресценции.

Уровень иммуноглобулинов основных классов в сыворотке крови определяли в реакции радиальной иммунодиффузии в геле по Mancini (1969), активность фагоцитоза выявляли по поглощению нейтрофилами инертных частиц латекса (1,5-2 мкм) (Stelzner A., 1987).

Концентрацию TNF $\alpha$  и IFN $\alpha$  в сыворотке крови и слезной жидкости определяли с использованием тест-систем, основанных на «сэндвич»-методе твердофазного иммуноферментного анализа (ТОО «Цитокин», ГНЦ НИИ особо чистых биопрепаратов, Санкт-Петербург).

Полученные результаты обрабатывали стандартными методами вариационной статистики с исполь-

зованием пакета программ прикладного статистического анализа Microsoft для Windows, вычисляя среднюю вариационного ряда (M), ее ошибку (m), достоверность различий по критерию Стьюдента (t), коэффициент линейной корреляции (r). Различие двух сравниваемых показателей считалось достоверным при P<0,05.

## Результаты

Результаты наших исследований показали глубокие отклонения от нормальных значений (контроль) во всех обследованных группах больных. У пациентов с микстувейтами выявлена наибольшая степень снижения числа CD3<sup>+</sup>T-лимфоцитов в сравнении с контролем (P<0,05). При этом у больных с задним увеитом их количество достоверно снижено в сравнении с данными при переднем увеите: 42,0 $\pm$ 1,9% против 49,6 $\pm$ 1,8%, соответственно. Нужно признать, что подобная картина обнаружена и при моновирусном увеите, когда количество CD3<sup>+</sup> клеток при переднем увеите составило 51,1 $\pm$ 2,0%, при заднем - 45,5 $\pm$ 1,7% (P<0,05).

Достоверный дефицит CD3<sup>+</sup> маркеров T-лимфоцитов у больных со смешанным увеитом в сравнении с данными контроля обнаружен и при анализе их абсолютных значений (P<0,05), причем число T-лимфоцитов с CD3<sup>+</sup> фенотипом в группе пациентов с задним увеитом составило 834 $\pm$ 76,6 против 1028 $\pm$ 90,5/мкл - при переднем увеите (P<0,05) (табл. 1). Тем не менее, у больных с микстувейтами статистически значимых различий числа клеток с CD3<sup>+</sup> рецепторами в группах в зависимости от этиологического фактора не обнаружено.

Одновременно, в 1,6 раза была подавлена экспрессия CD4<sup>+</sup> поверхностных маркеров T-хелперов у больных со смешанным задним увеитом (P<0,001) и в 1,5 раза с передним увеитом по отношению к значениям контроля (P<0,001). Причем, обнаружены статистически значимые отличия между группами с разной локализацией.

При герпесвирусном увеите отмечается более глубокий дефицит T-хелперов при задней локализации процесса, который имеет статистически значимое отличие от данных при переднем увеите (P<0,05). Одновременно, при переднем смешанном увеите число CD4<sup>+</sup> лимфоцитов было заметно выше, чем при герпетическом увеите (P<0,05).

Резко возрастала экспрессия CD8<sup>+</sup> рецепторов T-лимфоцитов при смешанном увеите, как в группе с передним, так и с задним увеитом (P<0,05), что, очевидно, обуславливает развитие аутоиммунного компонента, направленного к роговице и ведет к развитию стойкого хронического процесса. С другой стороны, именно дисбаланс иммунорегуляции препятствует эффективной терапии офтальмологических осложнений.

При герпетическом увеите достоверно снижено число CD8<sup>+</sup> лимфоцитов, как в относительном, так и в абсолютном выражении только в группе боль-

Табл. 1. ОСНОВНЫЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМИ УВЕИТАМИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЭТИОЛОГИЧЕСКОГО ФАКТОРА (M±m)

№№ пп	Иммунологи- ческие показатели	ВПГ+ЦМВ		ВПГ		Группа сравнения	Контроль (здоровые)
		Передний увеит	Задний увеит	Передний увеит	Задний увеит		
1.	CD3 <sup>+</sup> , % в мкл	49,6±1,8* <sup>^</sup> 1028±90,5* <sup>^</sup>	42,0±1,9* <sup>^</sup> 834±76,6* <sup>^</sup>	51,1±2,0* <sup>^</sup> 867±74,1* <sup>^</sup>	45,5±1,7* <sup>^</sup> 1009±92,3* <sup>^</sup>	60,2±3,1 1055±98,7@	63,0±2,6 1323±125
2.	CD4 <sup>+</sup> , % в мкл	23,8±1,6* <sup>^</sup> 493±41,3* <sup>^</sup>	20,1±1,5* <sup>^</sup> 400±37,4* <sup>^</sup>	29,0±2,4* <sup>^</sup> 492±47,5* <sup>^</sup>	23,0±2,1* <sup>^</sup> 510±51,2* <sup>^</sup>	34,7±1,7 608±57,5@	36,6±1,9 769±73,7
3.	CD8 <sup>+</sup> , % в мкл	27,8±1,9* <sup>^</sup> 576±53,1 <sup>^</sup>	31,3±2,2* <sup>^</sup> 622±59,5* <sup>^</sup>	18,5±1,6* <sup>^</sup> 313±30,2* <sup>^</sup>	20,6±1,7* <sup>^</sup> 456±44,2* <sup>^</sup>	23,2±1,8 406±38,8	23,0±1,9 483±46,7
4.	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	0,8±0,09* <sup>^</sup> #	0,7±0,08* <sup>^</sup> #	1,6±0,1* <sup>^</sup> #	1,1±0,1* <sup>^</sup> #	1,5±0,1	1,6±0,1
5.	CD19 <sup>+</sup> , % в мкл	19,4±1,7* <sup>^</sup> 402,0±39,8* <sup>^</sup>	21,8±1,9* <sup>^</sup> 433,4±41,8* <sup>^</sup>	19,5±1,6* <sup>^</sup> 330,7±29,8* <sup>^</sup>	21,0±1,8* <sup>^</sup> 465,6±41,5* <sup>^</sup>	23,5±1,9 412,0±39,5@	26,9±1,6 564,9±52,7
6.	CD16 <sup>+</sup> , в мкл	24,0±1,5* <sup>^</sup> 497±42,3* <sup>^</sup>	28,0±2,1* <sup>^</sup> 557±51,2* <sup>^</sup>	13,8±1,1* <sup>^</sup> 340±31,5* <sup>^</sup>	20,5±1,7* <sup>^</sup> 306±28,5* <sup>^</sup>	13,4±1,2 234±21,5	11,6±0,9 243,6±22,1
7.	Фагоцитоз, %	-	37,8±1,6* <sup>^</sup>	45,0±2,2* <sup>^</sup>	39,0±1,9* <sup>^</sup>	57,8±1,9@	69,7±3,2
8.	IgG, мг/ %	1349±110* <sup>^</sup> #	1482±127* <sup>^</sup> #	858±74,3* <sup>^</sup> #	1162±104* <sup>^</sup> #	1100±117	1120±105
9.	IgA, мг/ %	190±17,9* <sup>^</sup> #	248±27,9* <sup>^</sup> #	144,5±12,3 #	152±13,4* <sup>^</sup> #	140±13,4	125±15,0
10.	IgM, мг/ %	129±10,6#	111±10,1#	96±7,7* <sup>^</sup> #	135±12,1* <sup>^</sup> #	125±14,1	113±10,4

Достоверные различия при p<0,05: \* - с контролем; & - с группой сравнения; ^ - при сравнении групп с различной локализацией процесса (передний и задний увеит); # - между группой больных с ВПГ и группой с ВПГ+ЦМВ; @ - между группами сравнения и контроля.

ных с передним увеитом (P<0,05), что обусловлено относительной (в сравнении с контролем) лейкопенией.

Следовательно, в Т-звене иммунной системе при хронических увеитах смешанной герпетической цитомегаловирусной природы обнаруживаются глубокий дисбаланс, который проявляется значительным дефицитом Т-лимфоцитов и Т-хелперов и достоверным ростом CD8-позитивных лимфоцитов, что проявляется иммунорегуляторным дисбалансом и, очевидно ведет к развитию аутоагрессии по отношению к роговице глаз. Причем, наблюдается более выраженная степень поражения Т-звена иммунитета при задних увеитах. При моноинфекции герпетического происхождения выявлен достоверный иммунодефицит, который характеризуется снижением экспрессии CD3<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> лимфоцитов.

Анализ активности гуморального звена иммунитета показал, что число В-лимфоцитов с CD19<sup>+</sup> фенотипом достоверно снижено в сравнении с показателями в группе контроля у пациентов со смешанными и с моноувеитами (P<0,05). Причем различий по группам в зависимости от этиологического фактора не отмечено (табл. 1). Обнаружена гиперпродукция IgG у больных со смешанным увеитом в обеих группах по сравнению с контролем (P<0,05). Продукция IgG при заднем микстувеите была достоверно повышена по сравнению с аналогичной группой при герпесвирусном увеите (P<0,05), параллельно этому отмечены изменения - практически 2-х кратные при переднем увеите при сравнении групп с моно- и микстинфекцией (P<0,005). При герпесвирусном переднем увеите содержание IgG в сыворот-

ке крови было в 1,4 раза ниже, чем при заднем увеите (P<0,001).

Анализ продукции IgA в сыворотке крови показал, что при смешанной вирусной инфекции глаз регистрируется повышенное его значение по отношению к группе контроля. Так, при заднем микстувеите концентрация IgA составляла 248±27,9 мг%, что в 1,6 раза отличалось от нормы (P<0,001), при переднем -190±17,9 (P<0,05). Важно отметить достоверно повышенную концентрацию IgA при заднем увеите в сравнении с передним (P<0,05). Сравнительный анализ в зависимости от этиологии показал, что микстувеиты характеризуются гиперпродукцией IgA по отношению к моноувеитам (P<0,05). При герпетическом увеите достоверно повышено содержание в сыворотке крови IgA у пациентов с задней локализацией процесса по сравнению с нормой (P<0,05).

Различия в продукции IgM были отмечены при сравнении показателей больных герпетическими и смешанными поражениями (P<0,05). Кроме того, выявлен достоверно повышенный уровень сывороточного IgM в группе больных с герпетическим задним увеитом (135±12 мг%) в сравнении с передним (96±7,7 мг%) (P<0,05).

Следовательно, при смешанном увеите наблюдается дисбаланс в работе гуморального звена иммунитета, который выражается в подавлении экспрессии CD19<sup>+</sup> рецепторов В-лимфоцитов, гиперпродукции IgG и IgA. При герпесвирусном увеите выявляется дефицит числа В-клеток, сниженная концентрация IgG и несколько повышенный синтез IgM в сыворотке крови.

При хронической герпетической и цитомегаловирусной инфекции глаз обнаружено резкое усиление экспрессии CD16<sup>+</sup> натуральных киллеров, как относительных их значений, так и абсолютных по сравнению с контролем (Таблица 1). Так, при смешанном заднем увеите число натуральных киллеров повышалось практически в 2,5 раза ( $P < 0,001$ ), при переднем - в 2 раза ( $P < 0,001$ ) по сравнению с контролем. Отмечено достоверное повышение их числа, которое имело прямую зависимость с утяжелением клинического процесса. При герпетическом увеите зарегистрировано повышение натуральных киллеров только у больных с задним увеитом ( $P < 0,05$ ). Причем, это повышение достоверно различалось и с данными группы больных с передним увеитом ( $P < 0,05$ ).

Фагоцитарная активность была снижена значительно во всех обследованных группах больных по сравнению со здоровыми. Наибольшее подавление фагоцитоза было выявлено при задних увеитах как при моно-, так и при микстувейтах. При герпетическом увеите, кроме того, обнаружена достоверность различий в зависимости от локализации процесса. Так при переднем увеите процент фагоцитирующих клеток составлял -  $45,0 \pm 2,2$ , то при заднем он был -  $37,8 \pm 1,9\%$  ( $P < 0,05$ ).

Следовательно, у больных с микстувейтами выявлено значительное подавление фагоцитарной активности нейтрофилов с параллельным резким увеличением числа натуральных киллеров, несущих CD16<sup>+</sup> - Fc-рецепторы незрелых натуральных киллеров. Полученные данные могут свидетельствовать о срыве их генерации в зрелые формы клеток и снижении их киллерной активности, что, наряду со срывом Т-клеточной иммунорегуляции содействует развитию хронической формы офтальмопатии.

Число лимфоцитов, экспрессирующих CD25<sup>+</sup> рецепторы ранней активации, было снижено во всех обследованных группах больных независимо от локализации увеита и этиологического фактора (табл. 2). Это, возможно, объясняет нарушение регуляции в работе клеточного и гуморального звена иммунитета вследствие подавления межклеточных взаимодействий, опосредованных снижением лиганд-ре-

цептор взаимосвязей между активированными Т-, В-лимфоцитами и моноцитами и IL-2.

Экспрессия другого маркера ранней активации CD38<sup>+</sup> лимфоцитов была повышена при заднем смешанном увеите ( $23,3 \pm 2,1\%$ ) и при переднем герпесвирусном увеите ( $23,0 \pm 2,0\%$ ) по сравнению с контролем ( $P < 0,05$ ).

Анализ маркеров поздней активации лимфоцитов показал их повышение в обеих группах больных. Так, число клеток с маркерами к апоптозу CD95<sup>+</sup> было повышено в 1,5 раза у больных с задним смешанным увеитом по сравнению с группой здоровых доноров ( $P < 0,05$ ). У больных с увеитами герпетического происхождения также выявлена повышенная готовность к апоптозу ( $P < 0,05$ ). Причем в этой группе больных отмечены достоверные различия в экспрессии CD95<sup>+</sup> рецепторов в зависимости от локализации процесса, при заднем увеите число таких клеток значимо превалировало и составило  $26,0 \pm 2,1\%$  против  $21,8 \pm 1,7\%$  - переднем при увеите, соответственно ( $P < 0,05$ ). Важно отметить усиление экспрессии рецепторов к апоптозу при смешанном увеите задней локализации по сравнению с аналогичной группой с моноинфекцией ( $P < 0,05$ ). Полученные данные, возможно, являются результатом нарушения естественной реализации программируемой клеточной гибели, опосредуемой вирусной агрессией.

Экспрессия HLA-DR у больных с передними увеитами была повышена при заднем и переднем микстувейте относительно значений в контроле ( $P < 0,05$ ). Не обнаружено статистически достоверных отличий числа HLA-DR<sup>+</sup> клеток при сравнении показателей групп с различной локализацией увеита.

При герпетической вирусной офтальмопатии обнаружено также увеличение маркеров HLA-DR, что имело статистически значимые различия с контролем ( $P < 0,05$ ). При этом, число HLA-DR позитивных лимфоцитов выявлялось в одинаковом проценте случаев, как при смешанном, так и при моноинфекционном увеите.

Следовательно, у больных со смешанной и моноинфекцией глаз выявлены подавленная экспрессия CD25<sup>+</sup> рецепторов к IL-2, повышенное число активированных CD38<sup>+</sup> лимфоцитов, усиленная экспрес-

Табл.2. ЭКСПРЕССИЯ АКТИВАЦИОННЫХ МОЛЕКУЛ ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМИ УВЕИТАМИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЭТИОЛОГИЧЕСКОГО ФАКТОРА (M±m, %)

№№ пп	Иммунофенотип лимфоцитов	ВПГ+ЦМВ		ВПГ		Группа сравнения	Контроль (здоровые)
		Передний увеит	Задний увеит	Передний увеит	Задний увеит		
1.	CD25 <sup>+</sup>	22,8±1,9*	19,9±1,7*	19,0±1,7* *	21,8±1,9*	20,2±1,8@	26,7±1,7
2.	CD38 <sup>+</sup>	22,1±1,9	23,3±2,1*	23,0±2,0*	21,8±1,5	24,1±1,7@	19,1±1,5
3.	CD95 <sup>+</sup>	24,3±1,5*&	26,0±1,7*&#	21,8±1,7*&#	26,0±2,1*&^	17,4±1,4	16,9±1,3
4.	HLA-DR <sup>+</sup>	24,4±1,9*	24,6±2,1*	23,0±1,6*	23,6±2,0*	22,1±1,6	19,8±1,6

Достоверные различия при  $p < 0,05$ : \* - с контролем; & - с группой сравнения; ^ - при сравнении групп с различной локализацией процесса (передний и задний увеит); # - между группой больных с ВПГ и группой с ВПГ+ЦМВ; @ - между группами сравнения и контроля.

сия поздних маркеров активации: апоптоза - CD95<sup>+</sup> и HLA-DR<sup>+</sup> клеток.

У половины больных с увеитом смешанного генеза уровень IFN $\alpha$  в сыворотке крови выявлялась в пределах нормативных значений, лишь у 11,2% больных его синтез был незначительно повышен (в пределах 56 - 80 пг/мл), в то время как у 39,5% он не обнаруживался (табл. 3). В слезной жидкости IFN $\alpha$  несколько возрастал при заднем увеите, что не имело достоверных различий с контролем. В этой группе пациентов повышенный уровень IFN $\alpha$  - до 150 пг/мл был выявлен у 14,3% обследованных, у большей части больных концентрация его в слезе соответствовала нормальным, у 13,2% IFN $\alpha$  не обнаруживался. Обращают на себя внимание значительные вариации колебаний IFN $\alpha$  как в крови, так и в слезной жидкости: от 0 до 93 пг/мл и от 0 до 213 пг/мл, соответственно. При заднем герпетическом увеите в сыворотке обнаружено достоверно сниженный уровень IFN $\alpha$  в среднем на группу больных по сравнению с контролем (P<0,05). У 73,1% пациентов этой группы искомым цитокин не был обнаружен. В слезной жидкости больных с моновирусным увеитом IFN $\alpha$  выявлялся в среднем в 52,1% случаев с интервалом индивидуальных колебаний от 23 до 98 пг/мл.

Процент выявляемости провоспалительного TNF $\alpha$  в слезной жидкости был выше при заднем увеите смешанного и герпесвирусного генеза по сравнению с контролем. Среднее значение экспрессии TNF $\alpha$  при микстуевите составило - 96,3 $\pm$ 21,5 пг/мл, при моноуевите - 71,0 $\pm$ 16,5 пг/мл против 26,9 $\pm$ 7,3 пг/мл в контроле (P<0,05). Не обнаружено различий в продукции TNF $\alpha$  у пациентов в зависимости от этиологического фактора заболевания. Колебания экспрессии этих молекул были значительными в слезной жидкости в группах с различной этиологией.

Следовательно, при увеитах смешанной и моновирусной этиологии IFN $\alpha$  выявляется в низких концентрациях, либо не выявляется совсем, при этом, обнаружена повышенная продукция TNF $\alpha$  только в слезной жидкости с задней локализацией процесса.

Корреляционный анализ выявил статистически значимую взаимосвязь между экспрессией HLA-DR<sup>+</sup>

и CD3<sup>+</sup> маркеров лимфоцитов (r= -0,57, p<0,01); между содержанием CD95<sup>+</sup> и HLA-DR<sup>+</sup> клеток (r=0,44, p<0,05), а также между числом лимфоцитов с CD95<sup>+</sup>рецепторами и уровнем TNF $\alpha$  (r=0,65, p<0,01). Это свидетельствует о высокой степени напряженности клеточных и гуморальных составляющих иммунной системы в период хронической персистенции вирусов семейства Herpesviridae у больных с эндогенными увеитами.

Таким образом, при инфекции глаз, вызванных микстинфекцией вирусами семейства Herpesviridae, протекающих хронически, отмечался рост числа клеток, экспрессирующих индуцибельные молекулы активации CD95<sup>+</sup> и HLA-DR<sup>+</sup>. Очевидно, хроническая вирусная инфекция глаз сопровождается нарушением регуляции рецептор-зависимого апоптоза иммунокомпетентных клеток, опосредованного TNF $\alpha$ .

Увеличение содержания активационных маркеров, концентрации TNF $\alpha$  в сыворотке крови отражает усиление воспалительного процесса и служит прогностическим признаком утяжеления увеита.

Не исключено, что широкое распространение вируса простого герпеса среди популяции приводит к относительной адаптации к нему иммунной системы, что проявилось в относительно меньшей степени иммунодисбаланса у больных с моноувеитами.

## Обсуждение

При развитии врожденной или приобретенной иммунодепрессии, включающей резкое угнетение функций натуральных киллеров (NK), вирусы выходят в жидкую среду и разносятся током крови в различные органы. Вирионы ЦМВ адсорбируются на клеточных мембранах и проникают в цитоплазму путем пиноцитоза или виропексиса, индуцируя цитомегалический метаморфоз клеток. ЦМВ, находясь в лейкоцитах крови (лимфоцитах, моноцитах), не только хорошо защищен от воздействия циркулирующих противцитомегаловирусных антител, но и способен к дальнейшей репродукции [7, 15, 20]. Большое значение в противовирусной защите орга-

Табл.3. ЭКСПРЕССИЯ МОЛЕКУЛ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМИ УВЕИТАМИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЭТИОЛОГИЧЕСКОГО ФАКТОРА (M $\pm$ m, пг/мл)

№№ пп	Исследованные цитокины	ВПГ+ЦМВ		ВПГ		Группа сравнения	Контроль (здоровые)
		Передний увеит	задний увеит	Передний увеит	Задний увеит		
1.	IFN $\alpha$ , слезная жидкость	47,3 $\pm$ 9,8	78,4 $\pm$ 13,5	54,1 $\pm$ 10,0	60,1 $\pm$ 10,5	62,2 $\pm$ 9,8	56,7 $\pm$ 7,9
2.	IFN $\alpha$ , кровь	18,9 $\pm$ 6,9	19,5 $\pm$ 6,9	24,9 $\pm$ 7,5	10,6 $\pm$ 4,8 *	20,1 $\pm$ 1,7	32,1 $\pm$ 1,5
3.	TNF $\alpha$ , слезная жидкость	34,5 $\pm$ 7,8	96,3 $\pm$ 21,5*	40,0 $\pm$ 9,5	71,0 $\pm$ 16,5*	31,4 $\pm$ 8,4	26,9 $\pm$ 7,3
4.	TNF $\alpha$ , кровь	7,4 $\pm$ 2,1	6,7 $\pm$ 1,9	3,1 $\pm$ 0,9	6,5 $\pm$ 1,8	5,1 $\pm$ 1,6	7,8 $\pm$ 2,1

Достоверные различия при p<0,05: \* - с контролем; & - с группой сравнения; ^ - при сравнении групп с различной локализацией процесса (передний и задний увеит); # - между группой больных с ВПГ и группой с ВПГ+ЦМВ; @ - между группами сравнения и контроля.

низма придается системе интерферонов. Так, по данным разных авторов, для хронических вирусных инфекций (герпес, гепатит В), а также заболеваний невирусной природы, характерно выраженное подавление интерфероногенеза [9, 12]. При этом, как показали и наши исследования, более значительно продукция  $IFN\alpha$  подавлена у больных с тяжелым течением хронического заболевания.

При герпесвирусной инфекции происходит не только снижение интерферонообразования, но и подавление функциональной активности натуральных киллеров. Вместе с тем отмечается компенсаторное повышение количества натуральных киллеров, что, на наш взгляд может быть связано со снижением их функциональной активности и согласуется с исследованиями Борисовой А.М. и Пинегина Б.В. [1]. Не исключено, что это обусловлено срывом генерации незрелых натуральных киллеров ( $CD16^+$ ) в зрелые формы. С другой стороны, решающее влияние на герпетическую инфекцию оказывает специфический клеточный иммунитет, опосредованный Т-лимфоцитами [4, 8]. Состояние клеточного иммунитета в значительной степени определяет характер течения герпетической инфекции, частоту и интенсивность рецидивов.

Механизмы иммунопатологии при герпетической инфекции разнообразны и включают как ответ на персистирующий антиген, так и неадекватную регуляцию вирусспецифического иммунного ответа. Среди иммунопатологических состояний выделяют реакции, индуцированные иммуноглобулинами, иммунопатологию, вызванную иммунными комплексами и Т-лимфоцитами [3, 7]. По мнению большинства исследователей, основная роль в развитии и исходе заболевания принадлежит дисбалансу Т-клеточного звена иммунной системы [18, 24]. В условиях ослабленного иммунологического контроля не только становится невозможной полная элиминация внутриклеточно расположенного вируса, но и создаются благоприятные условия для распространения вируса от клетки по межклеточным мостикам или экстрацеллюлярным путем. Так, по данным Розановой Е.Б. у больных с цитомегаловирусной и герпетической инфекциями глаз отмечено снижение бласт-трансформации Т-лимфоцитов под влиянием ФГА, соответственно у 44 и 32% больных, что свидетельствует о снижении функциональной активности Т-системы лимфоцитов [9]. При этом специфические иммунные реакции, направленные против вируса, сочетаются с появлением противотканевых антител, которые могут иметь патогенетическое значение [15, 22, 24].

Цитокины считаются наиболее многочисленной группой биологически активных веществ, влияние которых, в частности, на процесс гибели клетки в последние годы интенсивно изучается и в настоящее время не вызывает сомнения [5, 10, 19]. При

формировании хронического воспаления для обеспечения собственного выживания вирусы должны избегать элиминирующего действия иммунной системы. Одним из таких механизмов является вирусиндуцированная модуляция апоптоза иммунокомпетентных клеток. Дефект апоптоза является одной из причин сохранения жизнеспособности инфицированных вирусом клеток, что приводит к хронизации процесса, с одной стороны и обуславливает недостаточную эффективность терапии, с другой [13]. Известно, что TNF альфа подает «сигнал смерти» через рецептор TNFR-1 ( $CD120a$  или  $p55$ ) и Fas antigen (Apo-1,  $CD95^+$ ), инициирующие взаимодействие смертельных доменов рецептора с адаптерными протеинами FADD (FasR-associated death domain) и TRADD (TNFR-associated death domain) и каспазой-8 [13].

Герпесвирусный и цитомегаловирусный увеиты в наших исследованиях сопровождались достоверным увеличением  $CD95^+$  и  $HLA-DR^+$ -лимфоцитов в крови. Причем, глубокие формы поражения роговицы цитомегаловирусом по сравнению с поверхностными, характеризовались более высокими значениями рецепторов апоптоза  $CD95^+$  и лиганда к ним -  $TNF\alpha$ . Повышенный уровень экспрессии  $CD8^+$  лимфоцитов в наших исследованиях, с параллельным усилением экспрессии  $CD95$  и  $HLA-DR$  молекул и  $TNF\alpha$  могут отражать цитотоксическую реакцию, направленную против зараженных вирусом клеток, а также против аутологических клеток, не несущих вирусных антигенов, когда иммунная реакция направлена против молекул I класса МНС. Следует учесть, что киллерная акция реализуется  $CD8^+$ -позитивными клетками как путем цитолиза с использованием перфоринового механизма, так и путем апоптоза через активацию Fas-Apo1 и bcl-рецепторов на поверхности мишеневых клеток. Эти данные, очевидно, отражают наличие аутоиммунного компонента, сопровождающего хроническую вирусную персистенцию у больных увеитом и согласуются с результатами исследований, где были выявлены четко выраженные признаки клеточной сенсibilизации к специфическому антигену в РБТЛ [12]. Так, по данным Теплинской Л.Е. при эндогенном увеите обнаруживаются срывы иммунологической толерантности, признаки аутоагрессии и, как следствие, появление системных органоспецифических аутоантител к ДНК, ядрам клеток (антинуклеарный фактор), избыточное накопление циркулирующих иммунных комплексов [11].

При развитии клинической картины увеита складывается ситуация, когда на поверхности профессиональных АПК концентрируется основная масса индуцирующего увеит аутоантигена - масса, достаточная для активации покоящихся аутореактивных Т-лимфоцитов, специфических в отношении индуцирующих детерминант [17, 18].

Одной из причин активации покоящихся, но потенциально аутореактивных клонов Т-лимфоцитов может стать дисбаланс или дефекты в цитокиновой сети, ибо известно, что воспалительная реакция, в том числе аутоиммунный ответ, в значительной степени детерминируется соотношением альфа-интерферона, провоспалительных и других цитокинов [14, 15].

Таким образом, при увеитах герпесвирусной, и особенно сочетанной с цитомегаловирусной этиологии отмечаются выраженные системные и местные девиации в иммунной системе, что, очевидно, имеет патогенетическое значение, поскольку выраженность клинико-воспалительных проявлений прямо коррелирует со степенью диспропорций в экспрессии маркерных рецепторов активации, корецепторов, лигандов к ним и цитокинов - Th1 пути иммунного ответа.

## Список литературы

1. Борисова А.М., Пинегин Б.В. Роль системы естественной цитотоксичности в иммунопатогенезе рецидивирующей герпетической инфекции и влияние иммуномодуляторов на клинико-иммунологический статус // Иммунология.- №6.-1991.- С.60-62.
2. Быковская Г.Н. Особенности иммунопатологических проявлений при односторонних и двусторонних увеитах // Съезд офтальмологов России, 7-й: Тез. Докл.-М., 2000.-Ч.2.-С.138-139.
3. Каспаров А.А. Офтальмогерпес.-М.:Медицина.-1994.-224.
4. Кацнельсон Л.А., Танковский В.Э. Увеиты (клиника, лечение). - Изд. 2-е, переработанное и дополненное. - М., 4-й филиал Воениздата, 2003. - 290 с.
5. Кетлинская О.С. Провоспалительные цитокины в патогенезе офтальмогерпеса //Автореф. дисс... канд. мед. наук. - С-П, 1995. - 22 с.
6. Коломиец А.Г., Коломиец Н.Д. Новые герпес-вирусы человека и вызываемая ими патология // Клин. мед. -1997. - т. 75. - №1. - С. 10 -14.
7. Майчук Ю.Ф. Новое в эпидемиологии и фармакотерапии глазных инфекций // Клин. офтальмология. — 2000. — Т.1, №2. — С. 48—51.
8. Панова И.Е. Клинико-иммунологические особенности микст-поражений глаз //Актуальные проблемы инфекционной патологии глаз: Материалы науч.-практ.конференции.-Уфа.-14октября.-1999г.- С.48-49.
9. Розанова Е.Б. Иммунологическая диагностика ЦМВ и герпетической инфекций у больных с патологией сетчатки и увеального тракта: Авт.д.к.м.н.-М., 1983.
10. Слепова О.С., Герасименко В.А., Макаров П.В., Кушнир В.Н., Захарова Г.Ю., Быковская Г.Н., Вартамян И.Р., Садрисламова Л.Ф. Сравнительное исследование роли цитокинов при разных формах глазных заболеваний Сообщение 1. Фактор некроза опухоли альфа // Вестн. офтальм. - 1998. Т.114, №3.- С. 28-32
11. Теплинская Л.Е. Современный взгляд на проблему увеитов // Актуальные вопросы офтальмологии. - М., 2000.- С.32-39.
12. Шевчук Н.Е. Особенности иммунного ответа при вирусных и хламидийных офтальмоинфекциях: Авт. к.б.н.-Уфа, 2002, 22с.
13. Ярилин А.А. Апоптоз: природа феномена и его роль в норме и при патологии/ Под ред.Б.Б.Мороза.- М.: Медицина, 2001.- с.13-56.
14. Forrester J.V. Autoimmunity and autoimmune disease of the eye. Dev. Ophthalmol. Vol. 30: 167-186, 1999.
15. Forrester J.V., McMenamin P.O. Immunopathogenic mechanisms in intraocular inflammation. /Chem. Immunol. Vol. 73: 159-185, 1999.
16. Friedman H.M. Immune evasion by herpes simplex virus type 1, strategies for virus survival. Trans Am Clin Climatol Assoc.- 2003.- 114: 103-112.
17. Friedman, H.M., Wang, L., Pangburn, M.K., Lambris, J.D., and Lubinski, J. Novel mechanism of antibody-independent complement neutralization of herpes simplex virus Type 1. J Immunol.- 2000.-165: 45284536.
18. Hoekzema R., Kijlstra A. Cytokines and the Eye // 5th Int. symp. on the Immunology and Immunopathology of the Eye. - Japan, Tokyo, 1999 - P. 40.
19. Hoekzema R., Murray P.I., Kijlstra A. Cytokines and intraocular inflammation //Curr. Eye. Res. - 1990. - Vol. 9. - P. 207-211.
20. Huemer, H.P., Larcher, C., van Drunen Little-van den Hurk, S., and Babiuk, L.A. Species selective interaction of alphaherpesvirinae with the unspecific immune system of the host. Arch Virol. - 1993.- 130: 353364.
21. Lightman S., Chan C.C. Immune mechanisms in choroid-retinal inflammation in man // Eye. - 1990. - № 4. - P. 345-353.
22. Taylor AW. Immune privilege, T - cell tolerance, and tissue -restricted autoimmunity // Hum Immunol.- 1997.- Feb; 52 (2): 138 - 43.
23. Yanitschke K., Reimer K., Pustowoit B., Gerike E. // Toxoplasmosis, Cytomegalovirus infection, Rubella. 1994, Sovin, Biomedica. P. 55-79.
24. Zhang X., Jiang S., Manczak M., Sugden B., Adamus G. Phenotypes of T cells infiltrating the eyes in autoimmune anterior uveitis associated with EAE. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. Vol. 43 (№. 5): 1499-1508, 2002.

поступила в редакцию 10.05.2005  
принята к печати 22.09.2005