

ОСОБЕННОСТИ ПРОДУКЦИИ IgG-АНТИТЕЛ К ИНДИВИДУАЛЬНЫМ БЕЛКАМ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ГЛАЗ (ВОЗРАСТНОЙ МАКУЛЯРНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИИ И ЦЕНТРАЛЬНОЙ СЕРОЗНОЙ ХОРИОРЕТИНОПАТИИ)

В.В. Нероев¹, Г.И. Кричевская¹, Г.И. Алаторцева², М.В. Рябина¹, А.П. Сарыгина¹, Л.Н. Нестеренко², В.В. Доценко², Л.Н. Лухверчик²

¹ ФГБУ НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца Минздрава России, Москва, Россия

² ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

Резюме. Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) и центральная серозная хориоретинопатия (ЦСХ) — заболевания заднего отрезка глаза, нередко приводящие к снижению зрительных функций. Их патогенез во многом неясен. Среди факторов риска развития хронического воспаления рассматривают различные микроорганизмы, в частности *Cytomegalovirus*. Цель исследования — анализ гуморального ответа на индивидуальные белки *CMV* у пациентов с ВМД и ЦСХ в условиях хронической *CMV*-инфекции и ее реактивации. **Материалы и методы.** Обследовано 104 пациента, серопозитивных к *CMV*: 75 — с ВМД и 29 — с ЦСХ. В иммуноферментном анализе определяли IgM- и IgG-антитела к поздним вирусным антигенам, а также IgG-антитела к основному неструктурному предраннему антигену *CMV* (IE). В линейном иммуноанализе определяли IgG-антитела к индивидуальным антигенам *CMV*: основному неструктурному предраннему белку (IE), ДНК-связывающему фосфопротеину pp52, фосфопротеинам текумента pp150, pp65, pp28. Использовали рекомбинантные антигены IE, p52, p150, p65, p28, содержащие иммунодоминантные белковые фрагменты вирусных антигенов. Учитывали положительные (интенсивность окрашивания линии — 2+) и сильно положительные результаты (интенсивность окрашивания линии — 3+). **Результаты.** У пациентов с хронической *CMV*-инфекцией частота выявления антител к индивидуальным антигенам в обеих группах была сопоставима. Уровень серопозитивности к p150 и p65 был существенно выше, чем к p52 и p28. У пациентов с ВМД, в отличие от пациентов с ЦСХ, достоверно преобладал умеренно положительный ответ (2+) на все исследуемые антигены. При реактивации хронической *CMV*-инфекции у больных с ВМД повышался уровень серопозитивности ко всем антигенам, увеличивалось число случаев с интенсивно положительным ответом на отдельные антигены, но по-прежнему преобладал умеренно положительный ответ. В группе с ЦСХ реактивация хронической *CMV*-инфекции отмечена всего у 6 пациентов, что не позволяет провести сравнительный анализ между этими двумя группами. **Заключение.** Основное различие между пациентами с ВМД и ЦСХ, хронически

Адрес для переписки:

Кричевская Галина Исааковна
105062, Россия, Москва, ул. Садовая-Черногрозская, 14/19,
ФГБУ НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца
Минздрава России.
Тел.: 8 (495) 624-57-13 (служебн.), 8 985 191-92-34 (моб.).
E-mail: gkri@yandex.ru

Contacts:

Galina I. Krichevskaya
105062, Russian Federation, Moscow, Sadovaya-
Chernogryazskaya str., 14/19., Helmholtz National Medical Research
Center of Eye Diseases.
Phone: +7 (495) 624-57-13 (office), +7 985 191-92-34 (mobile).
E-mail: gkri@yandex.ru

Для цитирования:

Нероев В.В., Кричевская Г.И., Алаторцева Г.И., Рябина М.В., Сарыгина А.П., Нестеренко Л.Н., Доценко В.В., Лухверчик Л.Н. Особенности продукции IgG-антител к индивидуальным белкам цитомегаловируса при различных заболеваниях глаз (возрастной макулярной дегенерации и центральной серозной хориоретинопатии) // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 3. С. 530–538. doi: 10.15789/2220-7619-FOI-1424

Citation:

Neroev V.V., Krichevskaya G.I., Alatorceva G.I., Ryabina M.V., Sarygina A.P., Nesterenko L.N., Dotsenko V.V., Likhverchik L.N. Features of IgG-antibodies production to individual Cytomegalovirus proteins in various eye diseases (age-related macular degeneration and central serous chorioretinopathy) // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 3, pp. 530–538. doi: 10.15789/2220-7619-FOI-1424

инфицированными *CMV*, состояло не в частоте выявления антител к разным рекомбинантным антигенам, а в интенсивности иммунного ответа: у пациентов с ВМД, в отличие от больных с ЦСХ, превалировала умеренная продукция (2+) антител. Существенное различие касалось уровня антител к p150: при ВМД преобладал умеренный антителый ответ (2+), а при ЦСХ — интенсивно положительный (3+) ($p < 0,05$). Возможно, умеренно выраженный синтез антител к исследованным рекомбинантным антигенам *CMV* у пациентов с ВМД отражает слабую экспрессию вирусных антигенов в условиях хронической инфекции, в результате чего длительно поддерживается антигенная стимуляция, приводящая к продолжительному воспалению.

Ключевые слова: цитомегаловирус, вирусные белки, антитела, линейный иммуноанализ, возрастная макулярная дегенерация, центральная серозная хориоретинопатия.

FEATURES OF IgG-ANTIBODIES PRODUCTION TO INDIVIDUAL CYTOMEGALOVIRUS PROTEINS IN VARIOUS EYE DISEASES (AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION AND CENTRAL SEROUS CHORIORETINOPATHY)

Neroev V.V.^a, Krichevskaya G.I.^a, Alatortseva G.I.^b, Ryabina M.V.^a, Sarygina A.P.^a, Nesterenko L.N.^b, Dotsenko V.V.^b, Lkhverchik L.N.^b

^a Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

^b I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Abstract. Age-related macular degeneration (AMD) and central serous chorioretinopathy (CSC) are diseases targeting the posterior segment of the eye that often lead to lowered visual functions. Pathogenesis of such disorders largely remains unclear. Among the risk factors of developing chronic inflammation, various microorganisms are considered, particularly *Cytomegalovirus (CMV)*. The study was aimed at analyzing the humoral response to individual viral proteins during chronic and reactivated *CMV* infection in AMD and CSC patients. **Materials and methods.** 104 *CMV*-seropositive patients were enrolled in the study including 75 AMD and 29 CSC subjects. IgM- and IgG-antibodies specific to *CMV* late viral antigens as well as IgG antibodies against the main non-structural immediate early (IE) antigen were evaluated by ELISA. IgG antibodies to individual *CMV* phosphoproteins such as the main non-structural immediate early protein (IE), the DNA-binding phosphoprotein pp52, and the tegument phosphoproteins (pp150, pp65, and pp28) were assessed by using Line-Immunoassay: recombinant antigens containing immunodominant protein fragments derived from viral antigens (p52, p150, p65, p28) were used. Positive (bands 2+) and strongly positive (bands 3+) data were only used for analysis. **Results.** It was shown that in both groups patients with chronic *CMV* infection had comparable rate of detected antibodies specific to individual antigens. The level of seropositivity to *CMV* p150 and p65 was significantly higher than that to *CMV* p52 and p28 ($p < 0.05$). Patients with AMD compared to patients with CSC had significantly higher moderate positive response (2+) to all the antigens examined. Upon reactivation of chronic *CMV* infection in AMD patients, the level of seropositivity to all antigens was increased, the number of cases with an intensely positive response to individual antigens was elevated, but patients with moderate positive response still prevailed. However, reactivation of chronic *CMV* infection was observed only in 6 CSC patients, allowing to perform no comparative analysis between these two groups. **Conclusion.** The main difference between *CMV*-chronically infected patients with AMD and CSC was not found at the level of seropositivity to individual *CMV* recombinant antigens, but rather in magnitude of antibody production so that AMD patients in comparison to CSC patients displayed moderate antibody production (bands 2+). A marked difference was related to the level of antibodies against *CMV* p150: AMD patients showed moderate antibody response (bands 2+), whereas CSC subjects dominated with strong positive response (bands 3+) ($p < 0.05$). It seems that moderate antibody production to recombinant *CMV* antigens examined in AMD patients occurs due to a weak expression of such viral antigens during chronic infection, resulting in long-term maintenance of antigenic stimulation leading to prolonged inflammation.

Key words: *CMV*, viral proteins, antibodies, line-immunoassay, age-related macular degeneration, central serious chorioretinopathy.

Введение

Cytomegalovirus (CMV, Human betaherpesvirus 5) длительное время ассоциировали в основном с внутриутробной офтальмопатологией и тяжелыми ретинитами у пациентов с выраженным иммунодефицитом. Усовершенствование методов лабораторной диагностики расширило представления о клинических проявлениях *CMV* — заболеваниях глаз. Установлена этиологическая роль этого вируса при некоторых воспалитель-

ных заболеваниях переднего и заднего отрезка глаза не только у иммунокомпрометированных, но и у иммунокомпетентных людей. В настоящее время обсуждается роль *CMV*, наряду с другими микроорганизмами, при возрастной макулярной дегенерации (ВМД) и центральной серозной хориоретинопатии (ЦСХ) [1, 2, 13].

ВМД — тяжелое инвалидизирующее заболевание, одна из главных причин потери зрения у лиц старшего возраста. После 50 лет ее удельный вес в структуре глазной патологии

неуклонно растет [1, 2, 5, 6]. Напротив, ЦСХ долгое время считалась болезнью преимущественно молодых мужчин. В последние годы появились сообщения об увеличении доли женщин в структуре заболеваемости ЦСХ, расширении возрастных рамок возникновения ЦСХ, развитии хронических форм заболевания со значительным и необратимым снижением зрительных функций [7, 8].

Для ВМД и ЦСХ характерно поражение сосудов хориоидеи (при ВМД отмечается истончение сосудистой оболочки, а при ЦСХ ее утолщение), пигментного эпителия сетчатки, а при ВМД — еще и фоторецепторов. Патогенез ВМД и ЦСХ сложен и во многом неясен. Однако в настоящее время известно, что при ЦСХ главную роль играет воспаление, а при ВМД воспалительные изменения сочетаются с дегенеративными изменениями, связанными с возрастом [8, 10]. Полагают, что хроническое воспаление, вызванное инфекциями, может быть одним из факторов риска, способствующих возникновению и прогрессированию ВМД и ЦСХ. Получены данные о роли вирусов герпеса человека, в частности *Herpes simplex viruses* и *CMV*, в развитии ВМД и ЦСХ [1, 2, 9, 12]. В большинстве случаев заключение о возможном влиянии *CMV* на возникновение и прогрессирование ВМД и ЦСХ основано на выявлении у пациентов повышенных титров гуморальных специфических антител [5, 13]. Первичная *CMV*-инфекция характеризуется появлением IgM-антител, низкоавидных IgG-антител, антител к предраннему антигену вируса, на смену которым приходят высокоавидные IgG-антитела к поздним вирусным антигенам (маркеры хронической инфекции).

Современная серодиагностика *CMV*-инфекции направлена в большинстве случаев на выявление противовирусных IgG- и IgM-антител без уточнения их антигенной специфичности. Раннее инфицирование и пожизненная персистенция вируса в организме хозяина обуславливает высокую серопозитивность популяции к *CMV* (IgG-антитела к поздним структурным белкам *CMV* определяются у 85–95% населения всего земного шара), причем при рецидиве глазного заболевания их титр меняется незначительно либо вообще не меняется. По нашим данным, рецидивы *CMV*-заболеваний глаз очень редко сопровождаются появлением IgM- или IgG-низкоавидных антител, для них более характерна продукция IgG-антител к предраннему неструктурному (IE) антигену ЦМВ.

CMV — наиболее крупный герпесвирус, в его состав входит большое количество белков [11, 12, 16, 17]. Как и все вирусы герпеса человека, он имеет сложное строение. Двухцепочечная ДНК упакована в белковую оболочку (капсид), при выходе из инфицированной клетки вирион по-

крывается суперкапсидом — наружной липопротеиновой оболочкой, содержащей некоторые компоненты клетки-хозяина. Между капсидом и наружной оболочкой (суперкапсидом) расположен аморфный белковый слой, называемый тегументом (tegument) или матриксом. Вирусные белки представлены в разных слоях вириона, они все принимают участие в репродукции *CMV*, однако в настоящее время основное внимание к себе привлекают белки тегумента, в частности p65, p150 и p28. Эти белки вовлечены во все стадии жизненного цикла *CMV*: внедрение вируса в клетку-хозяина, экспрессию вирусных генов, уклонение от иммунного надзора, сборку вириона и выход вирусных частиц из клетки [12, 17]. В частности, именно с p65 связывают способность *CMV* ускользать как от врожденного, так и приобретенного иммунного ответа хозяина, что обеспечивает его пожизненную персистенцию в организме человека [11, 16, 17].

Показано, что состав экспрессируемых вирусных белков отличается на разных стадиях *CMV*-инфекции (ЦМВИ). Исследование антител к индивидуальным антигенам ЦМВ позволяет уточнить фазу инфекции (первичную, хроническую, латентную), что нашло применение в клинической практике [3, 14].

Однако не ясно, имеется ли взаимосвязь между экспрессией отдельных белков *CMV* и особенностями клинической симптоматики заболеваний глаз.

Цель данного исследования — изучение гуморального иммунного ответа на различные высокоспецифичные рекомбинантные белки *CMV* у пациентов с ВМД и ЦСХ в условиях хронической инфекции и ее реактивации.

Материалы и методы

Под наблюдением находилось 2 группы пациентов: 1 группа — 80 человек с ВМД (возраст — 43–85 лет, ср. возраст — 70, 7 лет), 2 группа — 33 человека с ЦСХ (возраст — 28–64 года, ср. возраст — 42 года). Всем больным проведено тщательное офтальмологическое обследование.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Кровь из локтевой вены брали при первом обращении пациентов в институт. В сыворотках крови определяли IgG- и IgM-антитела к *CMV* без уточнения их антигенной специфичности. Использовали наборы реагентов «ВектоЦМВ-IgM» и «ВектоЦМВ-IgG» («Вектор-Бест», Россия). Реактивацию хронической ЦМВИ диагностировали по наличию в сыворотке крови IgG-антител к основному предраннему неструктурному антигену ЦМВ (тест-система «БиоСет-актив-ЦМВ», «Биосервис», Россия). ИФА осуществляли на автоматическом анализаторе «Лазурит» (США) в соответствии с ин-

струкциями производителя. Результаты учитывали по разнице оптической плотности (ОП) сыворотки пациента и контрольной отрицательной сыворотки (ДОП).

Линейный иммуноанализ (ЛИА). Одновременно с ИФА сыворотки исследовали методом линейного иммуноанализа. Определяли IgG-антитела к индивидуальным рекомбинантным антигенам (АГ) ЦМВ, полученным в НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова: основному неструктурному предраннему белку IE (IE), неструктурному предраннему ДНК-связывающему белку p52 (p52), белкам тегумента: p150, p65, p28. Белки тегумента *CMV* являются фосфопротеинами (pp). Полученные в бактериальной системе экспрессии рекомбинантные АГ содержали только высокоспецифичные для ЦМВ иммунодоминантные белковые фрагменты вирусных антигенов (p).

Рекомбинантные АГ IE, p65, p150, p28, p52 сорбировали на полосках (стрипах) нитроцеллюлозной мембраны в виде индивидуальных линий. Отрицательным контрольным антигеном служила β -галактозидаза *E. coli*, контролем правильности проведения реакции — иммунная сыворотка к IgG человека. Комплекс «антитело—рекомбинантный АГ» детектировали с помощью пероксидазного конъюгата моноклональных антител мыши к IgG человека, конъюгированных с пероксидазой хрена.

Результаты ЛИА учитывали визуально по появлению и степени окрашивания линий в области нанесения отдельных антигенов в реакции с сывороткой крови каждого пациента в сопоставлении с контрольными положительными и отрицательными антигенами. Содержание специфических антител к рекомбинантным полипептидам *CMV* в исследуемых сыворотках оценивали полуколичественно и выражали в условных единицах, «плюсах»: отсутствие линии — отрицательный результат (–), очень слабое окрашивание — сомнительный результат (\pm), слабое окрашивание — слабоположительный результат (1+), умеренное окрашивание — положительный результат (2+), интенсивное окрашивание — сильноположительный результат (3+) [3].

Статистическая обработка осуществлялась с помощью программы Biostat, с использованием критерия Пирсона (χ^2) и точного критерия Фишера. Определяли частоту выявления признака (%), среднее значение (M), стандартное отклонение от среднего (Σ).

Результаты

Определение IgG-, IgM-антител к CMV и IgG-антител к предраннему антигену CMV в ИФА. Серонегативными к ЦМВ и исключенными из дальнейшего исследования оказались 9 па-

циентов (5 с ВМД и 4 с ЦСХ). У 104 пациентов (75 с ВМД, 29 с ЦСХ) в сыворотке крови обнаружены IgG-антитела к *CMV* и не выявлены IgM-антитела, что свидетельствовало о наличии хронической ЦМВИ (ХЦМВИ). Среднее значение Δ ОП IgG-антител у пациентов с ВМД составляло $2,7 \pm 0,62$, с ЦСХ — $2,7 \pm 0,56$ ($p > 0,05$).

IgG-антитела к предраннему IE-антигену выявлены в ИФА у 31 из 75 (41,3%) обследованных с ВМД и 6 из 29 (20,7%) с ЦСХ. При ВМД наличие маркеров реактивации ХЦМВИ отмечено в 2 раза чаще, чем при ЦСХ, однако разница статистически не достоверна ($p = 0,07$). Не обнаружено также существенных различий в средних показателях Δ ОП IgG-антител к предраннему IE антигену: ВМД — $1,6 \pm 0,75$, ЦСХ — $2,4 \pm 0,8$ ($p > 0,05$). По результатам ИФА в каждой группе выделили 2 подгруппы: а) пациенты с ХЦМВИ без серологических маркеров реактивации (1а, 2а); б) пациенты с серологическими маркерами реактивации ХЦМВИ (1б, 2б).

Особенности продукции антител к антигенам CMV в условиях хронической инфекции (группы 1а, 2а). Оценка диагностической значимости слабоположительных линий (1+) неоднозначна, поэтому при анализе результатов ЛИА мы учитывали только явно положительные результаты (интенсивность окраски 2+ и 3+). У подавляющего большинства пациентов с ВМД и ЦСХ в ЛИА выявлены антитела (интенсивность 2+ и 3+) к p150 и p65, реже — к p28 и p52. Уровень серопозитивности к индивидуальным антигенам ЦМВ в обеих группах существенно не различался ($p > 0,05$), хотя антитела к p150, p65 и p28 при ЦСХ обнаруживались несколько чаще, чем при ВМД (табл. 1, рис. 1А, 2А).

У пациентов с ВМД и ЦСХ четко положительные результаты (линии 2+ и 3+) обнаружены в ЛИА к рекомбинантным АГ p150 у 79 и 87% ($p > 0,05$), p65 у 72 и 83% ($p > 0,05$), p28 у 52 и 47% ($p > 0,05$) и к p52 у 47 и 43% ($p > 0,05$) обследованных соответственно (табл. 1; рис. 1А, 2А). Антитела к рекомбинантному АГ IE в ЛИА не обнаруживались (табл. 1, рис. 1А, 2А).

В обеих группах больных в условиях ХЦМВИ IgG-антитела (2+ и 3+) к белку p150 встречались достоверно чаще, чем к p52 и p28 ($p < 0,05$). Существенных различий в частоте выявления IgG-антител к p150 и p65 не обнаружено ($p > 0,05$) (табл. 1, рис. 1А, 2А).

У пациентов с ВМД, серопозитивных к белкам p150, p65, p52 и p28, на все исследованные рекомбинантные АГ существенно чаще выявлен умеренно положительный ответ (2+). При ЦСХ, напротив, умеренно положительный ответ (2+) достоверно преобладал только на антиген p65 ($p < 0,05$), а на p150 чаще отмечен интенсивно положительный ответ (линии 3+) ($p < 0,05$) (табл. 1, рис. 1А, 2А).

Таблица 1. Частота выявления (%) IgG-антител (линии 2+ и 3+) к рекомбинантным антигенам CMV у пациентов с ВМД и ЦСХ, хронически инфицированных CMV (линейный иммуноанализ)

Table 1. Detection rate (%) of IgG-antibodies (bands 2+ and 3+) to CMV recombinant antigens in chronically CMV-infected AMD and CSC patients (Line Immunoassay)

Интенсивность окраски полос Intensity of band staining	Всего обследовано (n) Total examined (n)		IE n (%)		p150 n (%)		p52 n (%)		p65 n (%)		p28 n (%)		
	ВМД AMD	ЦСХ CSC	ВМД AMD	ЦСХ CSC	ВМД AMD	ЦСХ CSC	ВМД AMD	ЦСХ CSC	ВМД AMD	ЦСХ CSC	ВМД AMD	ЦСХ CSC	
3+	44	23	0	0	9 (20)	12 (52)	5 (11)	4 (17)	5 (11)	3 (13)	4 (9)	5 (22)	
2+			0	0	26 (59)	8 (35)	16 (36)	6 (26)	27 (61)	16 (70)	19 (43)	8 (35)	
P					< 0,001			< 0,006		< 0,001	< 0,001	< 0,001	
2+и 3+			0	0	35 (79)	20 (87)	21 (47)	10 (43)	32 (72)	19 (83)	23 (52)	13 (57)	

Примечания. n (%) — число пациентов (%), серопозитивных к данному рекомбинантному антигену; p — статистически значимые различия в частоте выявления линий с интенсивностью окрашивания 2+ и 3+ к данному рекомбинантному антигену.

Notes. n (%) — number (%) of patients seropositive for specific recombinant antigen; p — statistically significant difference in rate of detected bands with 2+ and 3+ staining intensity to specific recombinant antigen.

Особенности продукции антител к индивидуальным антигенам CMV в условиях реактивации хронической инфекции (группы 1Б, 2Б). При реактивации CMV у пациентов с ВМД по сравнению с больными с ХЦМВИ повышается частота выявления антител (линии 2+ и 3+) ко всем исследованным рекомбинантным АГ. В целом достоверное увеличение серопозитивных лиц установлено для рекомбинантных АГ IE — 84% и 0 ($p < 0,05$); p52 — 81 и 47% ($p < 0,05$); p65 — 97 и 72% ($p < 0,05$); недостоверное для p150 — 94 и 79% ($p > 0,05$) и p28 — 74 и 52% ($p > 0,05$) соответственно.

Хотя у больных с ВМД при реактивации ХЦМВИ (табл. 2, рис. 2Б) по-прежнему преоб-

ладает умеренно положительный ответ на все антигены (2+), число пациентов с интенсивным ответом (3+), по сравнению с ХЦМВИ, возрастает, и существенные различия сохраняются только для рекомбинантных АГ IE, p52 и p65 ($p < 0,05$) (табл. 2, рис. 1Б, 2Б).

При реактивации ХЦМВИ у пациентов с ЦСХ (2б) выявлялся преимущественно высокий уровень антител (линии 3+) к рекомбинантным АГ IE, p150, p52, p28, а к рекомбинантному АГ p65 одинаково часто встречались линии с интенсивностью окраски как 2+, так и 3+. Учитывая ограниченное число наблюдений в этой группе (6 пациентов), отмеченная тенденция требует дальнейшего подтверждения.

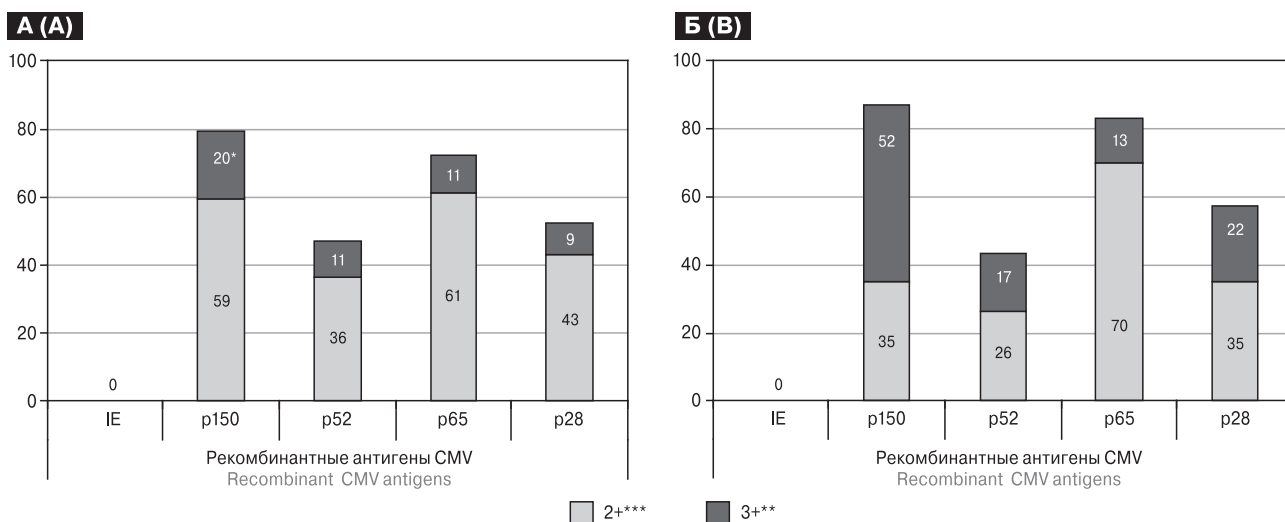
**Рисунок 1. Частота выявления (%) IgG-антител (линии 2+ и 3+) к рекомбинантным антигенам CMV у пациентов с ВМД (1а) и ЦСХ (2а), хронически инфицированных CMV (линейный иммуноанализ)**

Figure 1. Detection rate (%) of IgG antibodies (bands 2+ and 3+) to CMV recombinant antigens in patients with AMD (1a) and CSC (2a), chronically infected with CMV (Line Immunoassay)

Примечания. * — частота выявления антител, %; ** — линии с интенсивностью окраски 3+; *** — линии с интенсивностью окраски 2+.

Notes. * — detection rate of IgG — antibodies, %; ** — bands with 3+ staining intensity; *** — bands with 2+ staining intensity.

Таблица 2. Частота выявления (%) IgG-антител (линии 2+ и 3+) к рекомбинантным антигенам CMV у пациентов с ЦСХ и ВМД с серологическими маркерами реактивации хронической CMV-инфекции (линейный иммуноанализ)

Table 2. Detection rate (%) of IgG-antibodies (bands 2+ and 3+) to CMV recombinant antigens in CMV-infected AMD and CSC patients with serological reactivation markers (Line Immunoassay)

Интенсивность полос Intensity of band staining	Всего обследовано (n) Total examined (n)		IE n (%)		p150 n (%)		p52 n (%)		p65 n (%)		p28 n (%)	
	ВМД AMD	ЦСХ CSC	ВМД AMD	ЦСХ CSC	ВМД AMD	ЦСХ CSC	ВМД AMD	ЦСХ CSC	ВМД AMD	ЦСХ CSC	ВМД AMD	ЦСХ CSC
3+	31	6	4 (13)	2	11 (36)	4	8 (26)	4	11 (36)	3	9 (29)	2
2+			22 (71)	1	18 (58)	0	17 (55)	1	19 (61)	3	14 (45)	0
p			< 0,001				< 0,020		< 0,043			
2+ и 3+			26 (84)	3	29 (94)	4	25 (81)	5	30 (97)	6	23 (74)	2

Примечания. n (%) — число пациентов, серопозитивных к данному рекомбинантному антигену; p — статистически значимые различия в частоте выявления линий с интенсивностью окрашивания 2+ и 3+ к данному рекомбинантному антигену.

Notes. n (%) — number (%) of patients seropositive for specific recombinant antigen; p — statistically significant difference in rate of detected bands with 2+ and 3+ staining intensity to specific recombinant antigen.

Обсуждение

В настоящее время изучается роль индивидуальных белков герпесвирусов не только в стадии активной вирусной инфекции, но и при хронической форме. Показано, что при инфекции, вызванной вирусом Эпштейна–Барр, некоторые белки вируса длительно персистируют после купирования острой фазы инфекции, о чем свидетельствует продолжительный синтез антител к раннему антигену (ЕА).

В состав вириона CMV входит большое количество белков, каждый из которых играет опре-

деленную роль в его репликации. Экспрессия генов CMV, как и других герпесвирусов, регулируется по принципу каскада: синтез предранних белков «включает» процесс репликации и индуцирует экспрессию генов, кодирующих ранние и поздние белки.

Хорошо изучена динамика синтеза антител к индивидуальным белкам CMV при первичной инфекции и реактивации хронической, что часто используется в клинической практике для определения стадии инфекции. В то же время не ясно, связана ли клиническая симптоматика CMV-ассоциированных заболеваний с особенностями

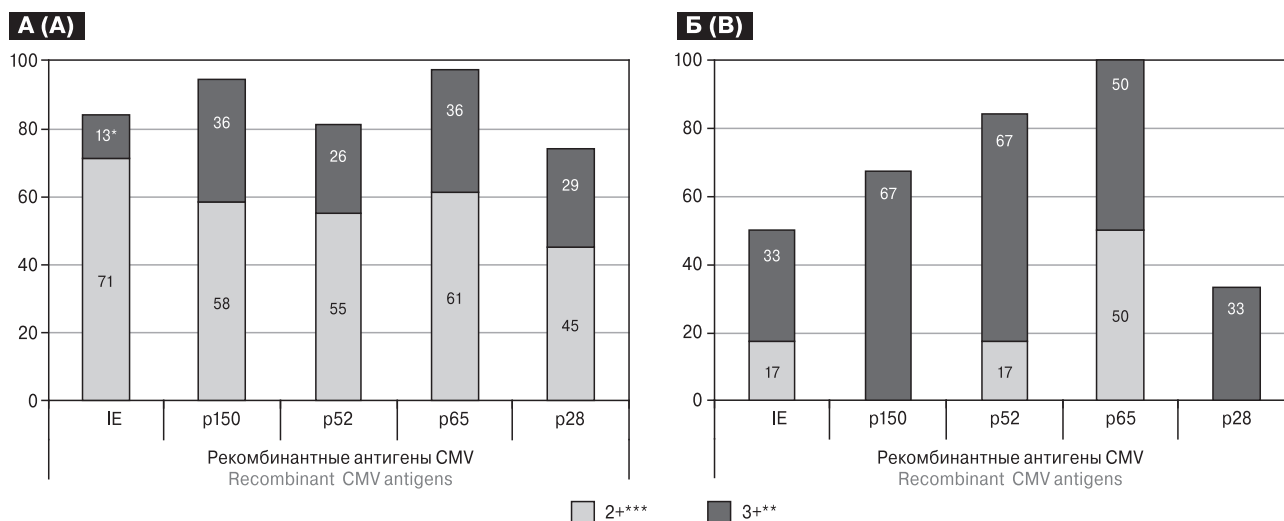


Рисунок 2. Частота выявления (%) IgG-антител (линии 2+ и 3+) к рекомбинантным антигенам CMV у пациентов с ВМД (1а) и ЦСХ (2а) с серологическими маркерами реактивации хронической CMV-инфекции (линейный иммуноанализ)

Figure 2. Detection rate (%) of IgG antibodies (bands 2+ and 3+) to CMV recombinant antigens in patients with AMD (1a) and CSC (2a) and serological markers of reactivated chronic CMV-infection (Line Immunoassay)

Примечания. * — частота выявления антител в %; ** — линии с интенсивностью окраски 3+; *** — линии с интенсивностью окраски 2+.

Notes. * — Detection rate of IgG — antibodies, %; ** — bands with 3+ staining intensity; *** — bands with 2+ staining intensity.

экспрессии индивидуальных вирусных антигенов. С целью изучения такой взаимозависимости были обследованы 2 группы серопозитивных к ЦМВ пациентов с тяжелыми заболеваниями заднего отрезка глаза: с ВМД и ЦСХ.

С помощью ЛИА определяли IgG-антитела к индивидуальным антигенам *СМV*, используя рекомбинантные антигены IE, p150, p65, p52, p28.

IE — предранний белок, маркер активной литической инфекции. Экспрессия предранних генов запускает процесс репликации вируса и приводит к экспрессии генов, кодирующих ранние и поздние белки. У обследованных нами пациентов с ВМД и ЦСХ IgG-антитела к этому антигену в ЛИА выявлялись только у серопозитивных в ИФА пациентов. В группе с ВМД и реактивацией ХЦМВИ преобладали пациенты с умеренно положительным синтезом антител (линии 2+) ($p < 0,05$), что отражало, по-видимому, слабую репликацию вируса, недостаточную для возникновения характерных для активной ЦМВИ изменений в сетчатке.

Малочисленность пациентов с ЦСХ и реактивацией ХЦМВИ (6 человек) не позволяет провести в этой группе сравнительный анализ интенсивности синтеза антител к разным белкам, включая IE. Необходимы дальнейшие наблюдения.

Фосфопротеин pp65 является мажорным белком тегумента. Антитела к рекомбинантному АГ p65 выявлены у большинства пациентов с ВМД как в условиях ХЦМВИ (72%), так и при ее реактивации (97%). У пациентов с ЦСХ, хронически инфицированных *СМV*, антитела к p65 обнаружены в 83% случаев, а при реактивации — у всех обследованных. При ХЦМВИ как при ВМД, так и при ЦСХ достоверно преобладает умеренный уровень антител к рекомбинантному АГ p65, что, по-видимому, обеспечивает выполнение его основной функции — ускользание вируса от иммунного ответа хозяина.

Отмеченное при реактивации ХЦМВИ увеличение числа серопозитивных к p65 пациентов в обеих группах также, вероятно, связано с необходимостью обеспечить вирусу условия для репликации у иммунокомпетентных лиц [10, 11, 17].

Высокоиммуногенный фосфопротеин pp150 относят к капсидным белкам тегумента из-за его тесной связи с капсидом. Среди белков тегумента по количеству он занимает второе место после pp65. Этот белок необходим для продуктивной репликации вируса, поддержания стабильности капсидов, упаковки капсидов в вирусные частицы и направления их к месту «одевания» в наружную оболочку.

В условиях хронической ЦМВИ наиболее выраженные различия у пациентов с ВМД и ЦСХ обнаружены нами в уровне антител к рекомби-

нантному АГ p150. Уровень серопозитивности к рекомбинантному АГ p150 у пациентов обеих групп достоверно не различался (хотя и был выше при ЦСХ) и составлял в группе с ВМД 79%, а ЦСХ — 87% обследованных. Полученные результаты согласуются с литературными данными о наличии антител к этому белку у большинства людей с острой и ХЦМВИ [9]. Однако в группе с ЦСХ преобладал интенсивный положительный ответ, а в группе ВМД — умеренно положительный ($p < 0,05$).

Разницу в интенсивности антителообразования к белку pp150 можно было бы объяснить возрастным снижением иммунного ответа у пациентов с ВМД, которые в среднем старше пациентов с ЦСХ на 20 лет. Недаром ВМД относят к заболеваниям, связанным со старением. Однако полученные нами результаты ИФА противоречат подобному заключению: средние показатели противовирусных IgG-антител к поздним антигенам и предраннему антигену *СМV* в этих двух группах обследованных существенно не отличались.

Возможно, у пациентов с ВМД, хронически инфицированных ЦМВ, по сравнению с больными с ЦСХ, увеличивается образование неинфекционных покрытых оболочкой вирусоподобных частиц (non-infectious enveloped particles), вызывающих длительное, но более слабое, чем инфекционные вирионы, воспаление и менее интенсивный синтез антител к pp150 [11, 16, 17].

В наших исследованиях в группе с ВМД и реактивацией ХЦМВИ повышалось число пациентов с интенсивным уровнем антител к рекомбинантному АГ p150, хотя сохранялась тенденция к преобладанию умеренно положительного ответа. Малочисленность группы больных с ЦСХ и реактивацией ХЦМВИ не позволяет провести сравнительный анализ с группой пациентов с ВМД.

Фосфопротеин pp28 — высокоиммуногенный белок тегумента, функции которого во многом сходны с функциями pp150. Однако предполагается, что белок pp28 в большей степени ответствен за выход вируса из клетки. Среди пациентов с ВМД и реактивацией ХЦМВИ отмечено увеличение числа лиц с антителами к рекомбинантному АГ p28 с 57 до 74% ($p < 0,05$), что согласуется с современными представлениями о важной роли белков тегумента в усилении экспрессии предранних генов ЦМВ, необходимых для запуска продуктивной инфекции, а также о роли pp28 в выходе инфекционных вирионов из клетки [11, 15].

Фосфопротеин pp52 — ДНК-связывающий белок *СМV*. Отмечено достоверное повышение числа пациентов с наличием IgG-антител к рекомбинантному АГ p52 при реактивации ВМД

по сравнению с показателями группы больных с ХЦМВИ ($p < 0,05$). Полученные результаты согласуются с данными Nulens E. и соавт. о взаимозависимости выявления IgG-антител к pp52 и присутствия IgM-антител к ЦМВ [13, 17].

Таким образом, в условиях ХЦМВИ пациенты с ВМД отличались от больных с ЦСХ не специфической направленностью и частотой положительного антительного ответа на индивидуальные белки *CMV*, а его интенсивностью. У пациентов с ВМД преобладает умеренно положительный ответ на все исследованные антигены: линии с интенсивностью окрашивания 2+ встречаются достоверно чаще по сравнению с линиями 3+ ($p < 0,05$), а при ЦСХ умеренно положительный ответ (2+) существенно чаще встречается только на белок pp65. Наиболее

выраженные отличия выявлены для рекомбинантного АГ р150: при ЦСХ достоверно преобладает интенсивный положительный ответ ($p < 0,05$), а при ВМД — умеренно положительный (табл. 1, рис. 1А, 2А).

Возможно, умеренно выраженный уровень антител к исследованным рекомбинантным АГ ЦМВ у пациентов с ВМД отражает слабую экспрессию вирусных антигенов в условиях хронической инфекции, в результате чего длительно поддерживается антигенная стимуляция, приводящая к продолжительному воспалению. Необходимы дальнейшие наблюдения для оценки влияния экспрессии отдельных антигенов ЦМВ на развитие хронического воспаления и для уточнения роли такого воспаления в патогенезе ВМД.

Список литературы/References

1. Алексеев И.Б., Нам Ю.А., Непесова О.М. Патогенетические особенности развития дистрофических процессов сетчатки при миопии и возрастной макулярной дегенерации // Российский офтальмологический журнал. 2017. Т. 10, № 4. С. 90–96. [Aleksseev I.B., Nam Ju.A., Nepesova O.M. Pathogenetic issues of retinal dystrophies associated with myopia and age-related macular degeneration. *Rossiiskii oftal'mologicheskii zhurnal = Russian Ophthalmological Journal*, 2017, vol. 10, no. 4, pp. 90–96. doi: 10.21516/2072-0076-2017-10-4-90-96 (In Russ.)]
2. Игнат'ев С.А., Алексеев И.Б., Чернакова Г.М., Клещева Е.А., Нам Ю.А. Возрастная макулярная дегенерация и цитомегаловирус: дискуссионные аспекты патогенеза // Российский офтальмологический журнал. 2015. Т. 8, № 4. С. 71–78. [Ignat'ev S.A., Aleksseev I.B., Chernakova G.M., Kleshheva E.A., Nam Ju.A. Age-related macular degeneration and the cytomegalovirus: controversial issues of pathogenesis. *Rossiiskii oftal'mologicheskii zhurnal = Russian Ophthalmological Journal*, 2015, vol. 8, no. 4, pp. 71–78 (In Russ.)]
3. Марданлы С.С., Арсеньева В.А., Захаров М.В., Марданлы С.Г., Амелина Е.А., Ротанов С.В. Применение линейного иммуноблоттинга для скрининга антител класса G и M к основным возбудителям TORCH-инфекций // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2015. Т. 3, № 82. С. 59–65. [Mardanly S.S., Arsen'eva V.A., Zaharov M.V., Mardanly S.G., Amelina E.A., Rotanov S.V. The linear immunoblotting for screening antibodies of class G and M to the immunodominant pathogens of TORCH. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2015, vol. 14, no. 3, pp. 59–65. doi: 10.31631/2073-3046-2015-14-3-59-65 (In Russ.)]
4. Мирзабекова К.А. Центральная серозная хориоретинопатия — современные подходы к лечению // Вестник офтальмологии. 2012. № 6. С. 62–64. [Mirzabekova K.A. Central serous chorioretinopathy — uptodate treatment options. *Vestnik oftal'mologii = Herald of Ophthalmology*, 2012, no. 6, pp. 62–64. (In Russ.)]
5. Мухамедьянова А.Ш., Азнабаев Р.А., Азнабаева Л.Ф. Клинические и иммунологические факторы возникновения и течения возрастной макулярной дегенерации // Вестник офтальмологии. 2014. Т. 130, № 3. С. 9–12. [Mukhamedyayanova A.Sh., Aznabaev R.A., Aznabaeva L.F. Clinical and immunological factors of the onset and development of age-related macular degeneration. *Vestnik oftal'mologii = Herald of Ophthalmology*, 2014, vol. 130, no. 3, pp. 9–12. (In Russ.)]
6. Нероев В.В. Российское наблюдательное эпидемиологическое неинвертеционное исследование пациентов с влажной формой макулярной дегенерации // Российский офтальмологический журнал. 2011. Т. 4, № 2. С. 4–9. [Neroev V.V. Russia's nationwide epidemiological noninvasive study of patients with wet age-related macular degeneration. *Rossiiskii oftal'mologicheskii zhurnal = Russian Ophthalmological Journal*, 2011, vol. 4, no. 2, pp. 4–9. (In Russ.)]
7. Нероев В.В., Рябина М.В., Цапенко И.В., Зуева М.В., Чиковани К.Р. Клинико-функциональные особенности различных форм центральной серозной хориоретинопатии // Российский офтальмологический журнал. 2011. Т. 4, № 1. С. 52–57. [Neroev V.V., Ryabina I.V., Tsapenko M.V., Zueva K.R. Chikovani Clinical and functional features of various forms of central serous chorioretinopathy. *Rossiiskii oftal'mologicheskii zhurnal = Russian Ophthalmological Journal*, 2011, vol. 4, no. 1, pp. 52–57. (In Russ.)]
8. Нероев В.В., Цапенко И.В., Зуева М.В., Рябина М.В., Чиковани К.Р. Морфофункциональные изменения сетчатки и ретинального пигментного эпителия у больных центральной серозной хориоретинопатией на фоне длительной системной стероидной терапии // Российский офтальмологический журнал. 2012. Т. 5, № 3. С. 34–38. [Neroev V.V., Tsapenko I.V., Zueva M.V., Ryabina M.V., Chikovani K.R. Structural and functional changes of the retina and retinal pigment epithelium in patients with central serous chorioretinopathy receiving prolonged systemic steroid therapy. *Rossiiskii oftal'mologicheskii zhurnal = Russian Ophthalmological Journal*, 2012, vol. 5, no. 3, pp. 34–38. (In Russ.)]
9. Никитина А.В., Помелова В.Г., Соколова М.В., Осин Н.С., Марданлы С.Г. Выбор антигенов для определения иммуноглобулина G к цитомегаловирусу на основе технологии ФОСФАН // Клиническая лабораторная диагностика. 2015. Т. 60, № 10. С. 36–39. [Nikitina A.V., Pomelova V.G., Sokolova M.V., Osin N.S., Mardanly S.G. The selection of antigens for detecting of immunoglobulin G to cytomegalovirus on the basis of FOSFAN technology. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2015, vol. 60, no. 10, pp. 36–39. (In Russ.)]

10. Слепова О.С., Еремеева Е.А., Рябина М.В., Сорожкина Е.С. Роль инфекции в патогенезе возрастной макулярной дегенерации // Вестник офтальмологии. 2015. Т. 131, № 4. С. 56–59. [Slepova O.S., Ereemeeva E.A., Ryabina M.V., Sorozhkina E.S. Role of infection in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Vestnik oftalmologii = The Russian Annals of Ophthalmology*, 2015, vol. 131, no. 4, pp. 56–59. (In Russ.)] doi: 10.17116/ofialma2015131456-59
11. Biolatti M., Dell’Oste V., De Andrea M., Landolfo S. The human cytomegalovirus tegument protein pp65(pUL83): a key player in innate immune evasion. *New Microbiologica*, 2018, vol. 41, no. 2, pp. 87–94.
12. Kalejta R.F. Tegument proteins of human cytomegalovirus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2008, vol. 72, no. 2, pp. 249–265. doi: 10.1128/VVBR.00040-07
13. Miller D.M., Espinosa-Heidmann D.G., Legra J., Dubovy S.R., Süner I.J., Sedmak D.D., Dix R.D., Cousins S.W. The association of prior cytomegalovirus infection with neovascular age-related macular degeneration. *Am. J. Ophthalmol.*, 2004, vol. 138, no. 3, pp. 323–28. doi: 10.1016/j.ajo.2004.03.018
14. Nulens E., Bodéus M., Bonelli F., Soleti A., Goubau P. Reactivity to p52 and CM2 recombinant proteins in primary human cytomegalovirus infection with a microparticle agglutination assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2000, vol. 7, no. 4, pp. 536–539. doi: 10.1128/cdli.7.4.536-539.2000
15. Pepperl S., Münster J., Mach M., Harris J.R., Plachter B. Dense bodies of human cytomegalovirus induce both humoral and cellular immune responses in the absence of viral gene expression. *J. Virol.*, 2000, vol. 74, no. 13, pp. 6132–6146. doi: 10.1128/jvi.74.13.6132-6146.2000
16. Smith R.M., Kosuri S., Kerry J.A. Role of human cytomegalovirus tegument proteins in virion assembly. *Viruses*, 2014, vol. 6, no. 2, pp. 582–605. doi: 10.3390/v6020582
17. Tomtishen J.P. 3rd. Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28). *Virol. J.*, 2012, vol. 9: 22. doi: 10.1186/1743-422X-9-22
18. Varnum S.M., Streblov D.N., Monroe M.E., Smith P., Auberry K.J., Pasa-Tolic L., Wang D., Camp D.G. 2nd, Rodland K., Wiley S., Britt W., Shenk T., Smith R.D., Nelson J.A. Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J. Virol.*, 2004, vol. 78, no. 20, pp. 10960–10966. doi: 10.1128/JVI.78.20.10960-10966.2004

Авторы:

Нероев В.В., академик РАН, д.м.н., профессор, директор ФГБУ НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца Минздрава России, Москва, Россия;

Кричевская Г.И., к.м.н., ведущий научный сотрудник отдела иммунологии и вирусологии ФГБУ НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца Минздрава России, Москва, Россия;

Алаторцева Г.И., к.б.н., зав. лабораторией клонирования вирусных геномов ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

Рябина М.В., к.м.н., старший научный сотрудник отдела патологии сетчатки и зрительного нерва ФГБУ НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца Минздрава России, Москва, Россия;

Сарыгина А.П., младший научный сотрудник отдела патологии сетчатки и зрительного нерва ФГБУ НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца Минздрава России, Москва, Россия;

Нестеренко Л.Н., к.х.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клонирования вирусных геномов ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

Доценко В.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клонирования вирусных геномов ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

Лухверчик Л.Н., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клонирования вирусных геномов ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия.

Authors:

Neroev V.V., RAS Full Member, PhD, MD (Medicine), Director of the Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation;

Krichevskaya G.I., PhD (Medicine), Leading Researcher, Department of Immunology and Virology, Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation;

Alatortseva G.I., PhD (Biology), Head of the Laboratory for Cloning Viral Genomes, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Ryabina M.V., PhD (Medicine), Senior Researcher, Department of Retinal and Optic Nerve Pathology, Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation;

Sarygina A.P., Junior Researcher, Department of Retinal and Optic Nerve Pathology, Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation;

Nesterenko L.N., PhD (Chemistry), Leading Researcher, Laboratory for Cloning Viral Genomes, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Dotsenko V.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory for Cloning Viral Genomes, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Lukhverchik L.N., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory for Cloning Viral Genomes, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation.