

Вирус Эпштейна–Барр у детей, больных классической лимфомой Ходжкина

И.В.Ботезату, Т.Т.Валиев, Т.Е.Душенькина, К.В.Смирнова, Р.С.Равшанова, Д.М.Максимович, А.В.Лихтенштейн, В.Э.Гурцевич[✉], А.В.Попа, Н.Б.Сенюта

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н.Блохина» Минздрава России.

115478, Россия, Москва, Каширское ш., д. 23

[✉]vlad-88@yandex.ru

Классическая лимфома Ходжкина (КЛХ) – одно из многочисленных злокачественных новообразований, ассоциированных с вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ). Показано, что ВЭБ-позитивные случаи КЛХ распределяются неравномерно среди случаев этого заболевания. На частоту ВЭБ-позитивных случаев КЛХ оказывают влияние демографическая характеристика изучаемой популяции и другие факторы. Россия относится к географическим регионам с низкой заболеваемостью этой формой опухоли. Цель исследования заключалась в изучении гуморального ответа к ВЭБ и уровней вирусной ДНК в плазме крови детей, больных КЛХ, и выяснении значимости обоих маркеров вируса для диагностики и оценки клинических проявлений болезни.

Исследования показали, что уровень инфицированности ВЭБ у детей, больных КЛХ, практически не отличается от такового у здоровых детей, однако активность гуморального ответа оказалась существенно ниже. Изучение состава форменных элементов лейкоцитарного ростка, ответственных за клеточный и гуморальный иммунитет, не позволило объяснить наблюдаемый феномен. В частности, число циркулирующих в крови лейкоцитов у больных до лечения соответствовало нормальным показателям, но оказалось ниже нормальных значений после лечения. И напротив, процентное содержание лимфоцитов у больных до лечения оказалось ниже нормальных значений, но достигло нормальных показателей после лечения. Процентное содержание нейтрофилов и моноцитов у детей до и после лечения практически соответствовало таковым у здоровых лиц. Полученные данные позволяют предположить, что ослабленный гуморальный ответ у детей, больных КЛХ, не связан с измененным составом форменных элементов лейкоцитарного ростка, а обусловлен их сниженной функциональной активностью. Поиск копий ДНК вируса в плазме и смывах полости рта позволил обнаружить их лишь у нескольких больных до проведения терапии и констатировать их полное отсутствие после лечения. Динамическое наблюдение за концентрацией ДНК ВЭБ в плазме крови и гуморальным ответом к ВЭБ у 3 больных показало повышенное содержание числа копий вирусной ДНК до лечения и их снижение до нулевых значений после успешно проведенной терапии. Титры антител при этом оставались на прежнем уровне и не отражали клинического состояния больных. Проведенное исследование позволяет предположить, что повышенная концентрация вирусной ДНК, обнаруженная в плазме больных КЛХ, может стать важным маркером, позволяющим косвенно оценить степень минимальной остаточной болезни и вероятность рецидива заболевания.

Ключевые слова: вирус Эпштейна–Барр, классическая лимфома Ходжкина у детей, гуморальный ответ к ВЭБ, форменные элементы лейкоцитарного ростка (лейкоциты, лимфоциты, нейтрофилы, моноциты), вирусная ДНК в плазме крови больных.

Для цитирования: Ботезату И.В., Валиев Т.Т., Душенькина Т.Е. и др. Вирус Эпштейна–Барр у детей, больных классической лимфомой Ходжкина. Современная Онкология. 2018; 20 (1): 23–28.

Original article

Epstein–Barr virus in children with classical Hodgkin's lymphoma

I.V.Botezatu, T.T.Valiev, T.E.Dushenkina, K.V.Smirnova, R.S.Ravshanova, D.M.Maksimovich, A.V.Likhtenstein, V.E.Gurtsevich[✉], A.V.Popov, N.B.Senyuta

N.N.Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation.

115478, Russian Federation, Moscow, Kashirskoe sh., d. 23

[✉]vlad-88@yandex.ru

Abstract

Classical Hodgkin's lymphoma (cHL) is one of the many malignant tumors associated with the Epstein-Barr virus (EBV). It is shown that EBV-positive cases of cHL are distributed with different frequencies among all cases of the disease. The frequency of EBV-positive cases of cHL is influenced by the demographic characteristics of the studied population and other factors. Russia belongs to geographical regions with a low incidence of this form of tumor. The aim of the study was to estimate the humoral response to EBV and the level of viral DNA in the blood plasma of children with cHL and to evaluate the significance of both EBV markers for clinical manifestations of the disease.

The data obtained have shown that the level of EBV persistence in children with cHL practically does not differ from that in healthy children, however, the activity of the humoral response to EBV was significantly lower. The study of the composition of the elements of the leukocyte germ, responsible for cellular and humoral immunity, did not make it possible to explain the observed phenomenon.

In particular, the number of circulating leukocytes in the patients' blood before the treatment corresponded to normal values, but it turned out to be below the normal values after the treatment. Conversely, the percentage of lymphocytes in patients before treatment turned out to be lower than normal values, but it reached normal values after the treatment. The percentage of neutrophils and monocytes in patients before and after the treatment was almost the same as in healthy individuals. The data obtained suggest that the reduced humoral response in patients with cHL is not associated with the altered composition of the leukocyte germ cells, but due to their reduced functional activity. The search for copies of virus DNA in plasma and oral cavity swabs made it possible to detect them only in some patients before the therapy and to state their complete absence after the treatment. Dynamic observation of the EBV DNA concentration in blood plasma and humoral response to EBV in 3 patients showed increased values viral DNA copies before treatment, and their decrease to zero after successful therapy, while antibody titers remained at the same level and did not reflected the clinical state of patients. It can be assumed that the increased concentration of plasma viral DNA detected in cHL patients can become a marker that allows indirectly estimating the degree of minimal residual disease and the probability of recurrence of the disease.

Key words: Epstein–Barr virus, classical Hodgkin's lymphoma in children, humoral response to EBV, formed elements of leukocyte germ (leukocytes, lymphocytes, neutrophils, monocytes), viral DNA in the blood plasma of patients.

For citation: Botezatu I.V., Valiev T.T., Dushenkina T.E. et al. Epstein-Barr virus in children with classical Hodgkin' lymphoma. Journal of Modern Oncology. 2018; 20 (1): 23–28.

Введение

Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) – гамма-герпесвирус 4-го типа с удивительной взаимоисключающей судьбой: быть убиквитарным в человеческой популяции или стать этиологическим агентом для целого ряда доброкачественных или злокачественных заболеваний.

Известно, что более 95% взрослого населения планеты инфицированы ВЭБ. После первичного заражения в организме человека устанавливается персистентная вирусная инфекция с резервуаром в В-клетках памяти [1]. Хотя ВЭБ является чрезвычайно эффективным трансформирующим агентом, его функционирование в организме находится под жестким иммунологическим контролем, и как первичное инфицирование, так и хроническая инфекция обычно протекают бессимптомно [2].

Способность ВЭБ вызывать широкий спектр новообразований связана с его латентной инфекцией. В трансформированных вирусом *in vitro* В-клетках экспрессируются 6 ядерных антигенов ВЭБ (EBNA1, 2, 3а, 3б, 3с и LP) и 3 латентных мембранных белка (LMP1, LMP2А и LMP2В), кодируемых соответствующими генами латентной инфекции [3]. Кроме того, в латентно инфицированных клетках транскрибируются некодирующие вирусные РНК. К ним относятся два небольших неполоиденированных транскрипта, EBЕR, и более 40 вирусных микроРНК, расположенных внутри интрона BART (BamHI-A righttight transcripts) или вокруг кодирующей области гена BHRF1 [4, 5]. Экспрессию полного набора латентных генов относят к III типу латенции, сопровождающую трансформацию В-клеток [3]. Экспрессия вирусных генов в ВЭБ-положительных лимфомах, возникающих на фоне иммуносупрессии, также часто реализуется по III типу латенции, но при других злокачественных новообразованиях характер экспрессии вирусных генов более ограничен [6].

Среди доброкачественных новообразований, вызываемых ВЭБ, известны инфекционный мононуклеоз и волосатая лейкоплакия полости рта. К числу злокачественных лимфопролиферативных заболеваний, в возникновении которых ВЭБ играет роль этиологического фактора, относятся целый ряд неходжкинских лимфом, возникающих на фоне иммунодефицитных состояний разного генеза, например, у лиц, инфицированных ВИЧ, больных СПИДом, лимфомой Беркитта, перенесших трансплантацию органов, подвергшихся массивному химиотерапевтическому воздействию (онкологические больные) и т.д. Роль ВЭБ в патогенезе лимфолиферативных заболеваний трудно переоценить. Неслучайно в классификации опухолей кроветворной и лимфоидной ткани Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) 2016 г. выделены ассоциированные с ВЭБ варианты диффузной В-крупноклеточной и MALT-лимфом. ВЭБ также является этиологическим агентом и для некоторых опухолей эпителиального происхождения, таких как рак сосислотки и определенные варианты рака желудка.

Лимфома Ходжкина (ЛХ) – еще одно новообразование, ассоциированное с ВЭБ. Однако значение этого вируса в возникновении классической ЛХ (кЛХ) по-прежнему далеко от понимания. В пользу этиологической роли ВЭБ указывают повышенный риск заболеть кЛХ у лиц, переболевших инфекционным мононуклеозом [7], повышенные титры антител к ВЭБ до возникновения заболевания [8], а также моноклональность вирусного генома в опухолевых клетках, клетках Ходжкина–Рид–Штернберга (Х-Р/Ш) [9]. Последнее свидетельствует о том, что мутация возникла в одной исходно инфицированной клетке, и в результате клональной экспансии потомков этой клетки сформировалась опухоль. Роль ВЭБ в патогенезе кЛХ подтверждена также методами гибридизации ДНК в Саузерн-блоттинге, а также гибридизацией *in situ* [9], доказавшими наличие латентной ВЭБ-инфекции в опухолевой ткани у части этих больных.

Кроме того, анализы на РНК-транскрипты ВЭБ (ЕВЕР) и иммуногистохимическое тестирование на латентный мембранный белок-1 (LMP-1) представили прямые доказательства присутствия ВЭБ в клетках Х-Р/Ш или вариантах этих клеток у 40–50% больных кЛХ [10, 11].

Функциональные исследования генома ВЭБ и кодируемых им белков LMP1 и LMP2А подтверждают важную роль вируса в выживании клеток Х-Р/Ш, их транскрипционном перепрограммировании и уклонении от иммунного надзора. В частности, показано, что экспрессия LMP2А в В-клетках приводит к снижению регуляции В-клеточных специфических генов и индукции генов, связанных с пролиферацией и ингибированием апоптоза, созданию профиля экспрессии генов, аналогичного профилю, наблюдаемому в клеточных линиях, полученных от больных кЛХ [12]. Постоянная активация гена NOTCH1 под воздействием LMP2А и последующее ингибирование E2А и подавление регуляторной функции ЕВF, двух транскрипционных факторов, регулирующих развитие В-клеток, по-видимому, оказывает влияние как на сигналинг выживания этих клеток, так и на регуляцию транскрипции [13].

LMP1 представляет собой интегральный мембранный белок ВЭБ, который взаимодействует с рядом сигнальных путей, активирующих нуклеарный фактор каппа-би (NF-κB), Jun N-концевую киназу (JNK/STAP) и митоген-активированную протеинкиназу р38 MAPK, P13-K/Akt [14, 15]. Кроме того, он индуцирует поверхностные клеточные молекулы адгезии и гены активации [16], активирует антиапоптотические белки (BCL-2, A20) [17] и стимулирует продукцию цитокинов [18]. Таким образом, LMP1 имитирует конститутивно активную молекулу CD40, хотя обеспечивает более сильный и устойчивый сигнал [19]. Активация сигнального пути NF-κB, событие, характерное как для ВЭБ-положительных, так и ВЭБ-отрицательных клеток кЛХ, приводит к усилению антиапоптотических генов и, как считается, играет ключевую роль в выживании этих клеток [20].

Однако ВЭБ ассоциируется лишь с определенной долей случаев кЛХ. Хотя большинство лиц инфицированных этим вирусом, только 1/50 из 1 млн циркулирующих в кровотоке здорового человека В-клеток содержит генетическую информацию ВЭБ [21]. Но если бы ВЭБ находился в качестве вируса-пассажира в В-клетке, которая впоследствии оказалась трансформированной с помощью других механизмов, то случаи кЛХ, ассоциированные с ВЭБ, были бы редким явлением [22]. К факторам риска, влияющим на возникновение ВЭБ-ассоциированных случаев кЛХ, относят гуморальный и клеточный ответы на ВЭБ-инфекцию. Оказалось, что у лиц с ВЭБ-положительной кЛХ за несколько лет до возникновения болезни имели место повышенные титры антител к вирусным капсидным (ВКА) и ранним антигенам (РА) вируса, а соотношение анти-EBNA1/анти-EBNA2-антител было 1,0 и менее по сравнению с соответствующим значением у контрольных лиц [23]. При этом отмечено, что если соотношение антител к указанным ядерным белкам 1,0 и менее сохраняется более чем 2 года после инфекционного мононуклеоза, то это указывает на дефект контроля организма за персистенцией вируса [24] и на возможность возникновения кЛХ, ассоциированной с ВЭБ [25].

Ассоциация обнаружена и между риском возникновения кЛХ и аллелями HLA, а также однонуклеотидными полиморфизмами (SNP) в этом регионе. Хотя некоторые SNP, вероятно, связаны со всеми кЛХ, независимо от их ВЭБ-статуса, тип HLA-ассоциаций у ВЭБ-положительных и ВЭБ-негативных кЛХ значительно отличается [26–29]. Аллели генов HLA, как I, так и II класса, связаны с ВЭБ-положительной кЛХ, тогда как ВЭБ-негативная кЛХ в значительной степени ассоциирована с аллелями II класса [27, 28].

Литературные данные свидетельствуют о том, что ВЭБ-положительные случаи кЛХ не распределяются равномерно

среди всех случаев КЛХ. На частоту ВЭБ-положительных и ВЭБ-негативных случаев КЛХ оказывает существенное влияние демографическая характеристика изучаемой популяции [30, 31]. У детей раннего возраста (менее 10 лет) и лиц преклонного возраста (старше 50 лет) КЛХ чаще всего ассоциирована с ВЭБ, чем у подростков и молодых людей (15–34 года) [31, 32]. Среди случаев КЛХ, ассоциированных с ВЭБ, преобладают мужчины в отношении приблизительно 2:1, тогда как среди ВЭБ-негативных случаев мужчины и женщины представлены более равномерно [30]. В развивающихся странах, где детские КЛХ встречаются чаще, более высокая доля случаев болезни связана с ВЭБ [30, 31]. По данным международных канцер-регистров заболеваемость детей в возрасте до 15 лет КЛХ составляет 5,5–6,5 случая на 100 тыс. детского населения. В России заболеваемость детского населения в возрастной группе до 4 лет составляет 2,4 случая на 100 тыс., в возрасте 5–9 лет – 6,2, в возрасте 10–14 лет – 10,2 случая на 100 тыс. детского населения, и в группе от 15 до 17 лет – 20,7 случая на 100 тыс. населения [33]. Целью настоящей работы стали изучение характера экспрессии ВЭБ у детей, больных классической формой ЛХ в России, и оценка гуморального ответа к ВЭБ и вирусной нагрузки в плазме крови больных в качестве клинических маркеров болезни.

Материалы и методы Группы больных и контрольных лиц

В исследование вошли 18 больных КЛХ, наблюдавшихся в отделении химиотерапии гемобластозов НИИ детской онкологии и гематологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина» Минздрава России. Соотношение больных мужского и женского пола равнялось 1,57:1, средний возраст составил 14,8 года. Все случаи КЛХ были верифицированы в соответствии с классификацией ВОЗ 2008 г. [24]. Во всех 18 случаях был диагностирован вариант – нодулярный склероз 1-го типа (КЛХ-NS-I). У всех больных диагностированы распространенные стадии заболевания: II стадия с массивным поражением лимфатических узлов, преимущественно средостения – [9 (50%), III [3 (16,7%)] и IV стадии [6 (33,3%)].

Из 18 пациентов, включенных в исследование, у 16 (88,9%) диагноз был установлен впервые, и лечение проводилось по протоколу НИИ ДОГ-ЛХ 2007, основу которого составляет схема полихимиотерапии BEACOPPesc ± лучевая терапия.

Двое (11,1%) больных были включены в исследование в рецидиве заболевания. Терапия проводилась по схеме ViGePP (а в одном случае с включением анти-CD30 моноклонального антитела брентуксимаба ведотина).

Все пациенты живы к моменту окончания терапии без признаков опухоли (время наблюдения за больными 26,3±9,2 мес).

У всех больных до лечения, в процессе его проведения, после окончания и в дальнейшем при наблюдении анализировали содержание таких клеточных элементов крови, как лейкоциты, лимфоциты, нейтрофилы и моноциты, которые реагируют в организме на внешние и внутренние воздействия и в известной мере отражают иммунный статус больных. Контрольную группу составили 35 здоровых детей в возрасте 10–14 лет и 27 юношей и девушек в возрасте 15–19 лет. Данное исследование, в которое вошли больные КЛХ и здоровые лица с их согласия в результате случайной выборки, было одобрено Комитетом по этике при НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина.

Серологический тест на антитела к ВЭБ

Для тестирования плазмы крови на наличие ВЭБ-специфических антител использовали непрямую реакцию иммунофлуоресценции, в которой использовали клеточную линию Р3HR1, продуцирующую вирус и синтезирующую его ВКА, и вирус не продуцирующую клеточную линию Raji, синтезирующую после обработки индукторами РА вируса. Для усиления экспрессии вирусных антигенов клеточную линию Raji обрабатывали ТРА (12-О-тетрадеканойл-форбол-13-ацетат) в концентрации 20 нг/мл в сочетании с бутиратом Na в дозе 3 мМ/мл в течение 3–5 дней, а клеточную линию Р3HR1 обрабатывали одним ТРА в течение 3–6 дней

в той же дозе. Клеточные линии культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% эмбриональной сыворотки Gibco, при 37°C и 5% CO₂. Приготовленные таким образом культуры клеток наносили на предметные стекла, фиксировали и использовали в качестве антигенных препаратов, на которые наслаивали тестируемые образцы плазмы. Для визуализации реакции использовали конъюгированные FITC козы антитела против иммуноглобулина (Ig)G и IgA человека (Jackson Immune Research Laboratories, Inc.). При определении титров антител применяли 2-кратные разведения тестируемых и контрольных образцов плазмы. Реакцию оценивали с помощью флуоресцентного микроскопа фирмы «Nikon» (Германия). Присутствие антител к вирусу определяли по ярко-зеленому свечению клеток на фоне неокрашенных. Титром антител считали то последнее разведение плазмы, с которым обнаруживали не менее 5% специфически флуоресцирующих клеток (при четких позитивном и негативном контролях). В каждой группе обследуемых лиц подсчитывали средние геометрические значения (СГЗ) титров антител.

Определение числа копий вирусной ДНК

Число копий ДНК ВЭБ в образцах плазмы крови и букальных смывах определяли посредством полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). Для построения калибровочных кривых использовали ДНК диплоидных клеток Namalwa, содержащих 2 интегрированных вирусных генома; при этом исходили из соотношения 3,3 пг геномной ДНК – 1 копия вирусной ДНК. Для ПЦР-РВ использовали праймеры к фрагменту размером 76 пар нуклеотидов в области BamHI-W ДНК ВЭБ (GenBank accession number V01555): sense primer – W-44F (5'-CCCAACACTCCACCACACC); antisense primer – W-119R (5'-TCTTAGGAGCTGTCCGAGGG); флуоресцентный зонд W-67T (5'-FAM-CACACACTACACACAC-CCACCCGTCTC-RTQ1). В качестве контроля способности ДНК плазмы букальных смывов служить матрицей в ПЦР использовали уникальный ген K-RAS, как описано ранее [35]. Реакцию вели в 96-луночных планшетах на приборе CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США) в 50 мкл реакционной смеси («Синтол», Россия), содержащей 0,3 мкМ каждого из праймеров, 25 нМ флуоресцентного зонда, 4 мМ MgCl₂, 200 мМ каждого дНТФ, 1 ед. Taq-полимеразы, 10 мкл раствора ДНК в буфере TE (соответствует 50 мкл плазмы). В каждый анализ включали 2 негативных контроля (образцы, не содержащие ДНК). Условия ПЦР: денатурация 5 мин при температуре 95°C; 40 циклов 15 с при температуре 95°C и 30 с при температуре 56,5°C. Данные ПЦР-РВ анализировали при помощи программы Bio-Rad CFX manager.

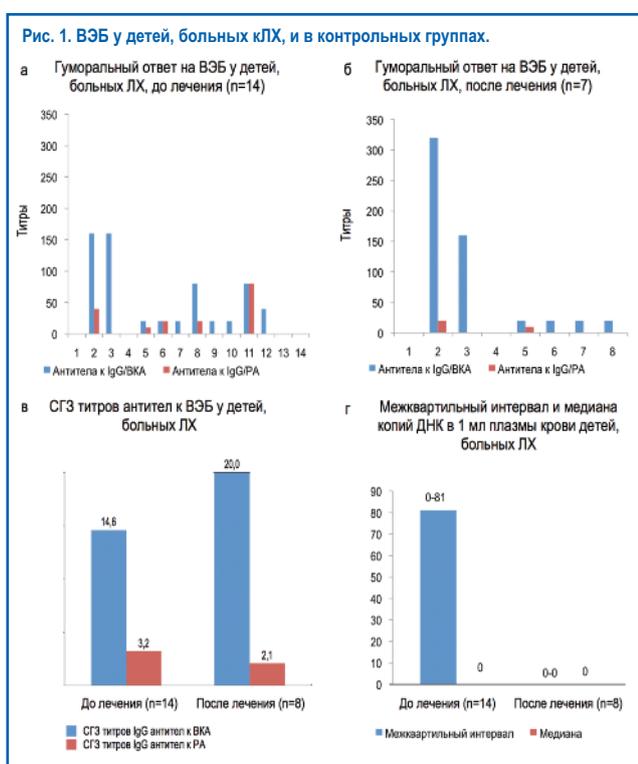
Статистический анализ

Точный тест Фишера был использован для сравнения достоверности различий между процентным содержанием вариантов LMP1 в биологических образцах двух сравниваемых групп. Значения $p < 0,05$ указывали на наличие существенных различий.

Результаты и обсуждение

Исследования показали, что процентное содержание серопозитивных лиц, т.е. лиц, содержащих IgG-антитела к ВКА (IgG/ВКА), у больных детей до и после терапии и здоровых детей в возрасте 10–14 и 15–19 лет существенно не отличалось (85,7% и 75,0% против 85,7% и 100% соответственно); табл. 1. Однако СГЗ этих титров в обеих группах больных детей были существенно ниже, чем у здоровых детей в возрасте 10–14 и 15–19 лет (14,6 и 20,0 против 111,0 и 100,0 соответственно; $p < 0,05$). Примерно такую же картину наблюдали и при изучении в сравниваемых группах частоты IgG-антител к РА (IgG/РА). Процентное содержание антител указанной специфичности в крови больных до и после проведенной терапии (35,7 и 25,0%) было близким к их содержанию в крови здоровых детей (17,1 и 25,0%), в то время как их СГЗ значительно и статистически достоверно отличались (3,2 и 1,9 против 10,0 и 16,0; $p < 0,05$). Важно отметить, что СГЗ титров IgG/ВКА и IgG/РА в группах больных детей до и после лечения были на одинаково низком уровне, и различие между ними было статистически недостоверным.

Таблица 1. ВЭБ у детей, больных КЛХ, и в контрольных группах									
Число наблюдений	Возраст-годы (среднее арифметическое)	IgG/ВКА		IgG/РА		Копии ДНК ВЭБ/мл			
		ВКА СГЗ	поз (%)	РА СГЗ	поз (%)	Плазма крови		Букальный смыв	
						поз (%)	Медиана (МКИ)	поз (%)	Медиана (МКИ)
Дети, больные КЛХ									
<i>(I) До проведения терапии</i>									
14	12–18 (14,8)	14,6	85,7	3,2	35,7	3/9 (33,3)	0 (0–81)	6/10 (60,0)	0,2 (0–0,8)
<i>(II) После проведения терапии (ремиссия)</i>									
8	12–16 (14,8)	20,0	75,0	1,9	25,0	1/9 (11,1)	0 (0–0)	0/6 (0,0)	0 (0–0)
Здоровые лица разных возрастных групп									
35	10–14	111,0	85,7	10,0	17,1	-	-	-	-
27	15–19	100,0	100,0	16,0	25,0	-	-	-	-
60	20–22	-	-	-	-	-	-	43,3 (26/60)	0,03 (0,02–0,05)
Примечание. Поз (%) – процент позитивных случаев из числа наблюдаемых/изучаемых.									



Индивидуальные значения титров ВЭБ-специфических антител у каждого больного до и после лечения, а также показатели СГЗ соответствующих титров антител в двух сравниваемых группах отображены на рис. 1, а, б. Из рис. 1, а следует, что за исключением отдельных случаев, сохранивших нормальный уровень гуморального ответа к ВЭБ, у большинства больных до лечения обнаружены низкие титры вирус-специфических антител. Более того, из 14 больных детей, обследованных до лечения, IgG/ВКА и РА не были выявлены в 4 (28,6%) и 9 (64,3%) случаях соответственно. Аналогичную картину наблюдали и в группе больных в состоянии ремиссии после проведенного лечения (рис. 1, б). Лишь у двух больных титры IgG/ВКА были в пределах нормы (1:320 и 1:160 соответственно), в то время как остальные представители этой группы демонстрировали низкую серологическую активность к вирусу. О низком уровне серологического ответа к ВЭБ свидетельствуют и показатели СГЗ титров IgG-антител к обоим антигенам вируса у больных до и после лечения, которые оказались примерно в 5 раз ниже соответствующих показателей у здоровых детей (см. табл. 1, рис. 1, в). Таким образом, низкие титры антител к ВЭБ у детей, больных КЛХ, не предполагают возможности использования у них серологических маркеров вируса для диагно-

стики и/или оценки эффективности терапии. Такой вывод подтверждают и результаты динамического наблюдения за 3 больными (рис. 2). Из рис. 2 видно, что титры IgG/ВКА-антител у больных до лечения и в состоянии ремиссии после проведения 4 курсов полихимиотерапии оставались на прежнем уровне. Невысокие титры IgG/РА-антител (1:40) были выявлены только у больного детской лимфомой Ходжкина (ДХЛ)-03 до лечения, которые снизились до 1:20 после проведенной терапии, а у больных ДХЛ-15 и ДХЛ-4 они не определялись ни до, ни после лечения.

Результаты изучения вирусной нагрузки в плазме крови больных до и после лечения представлены в табл. 1 и рис. 1, г. Так, в плазме крови больных, обследованных до лечения, ДНК ВЭБ была выявлена в 33,3% (3/9) случаев, а медиана чисел копий ДНК равнялась 0 (межквартильный интервал – МКИ=0–81). В этой же группе больных содержание вирусной ДНК в смывах полости рта составило 60% (6/10), а медиана чисел их копий равнялась 0,2 (МКИ=0–0,8), что соответствует аналогичным показателям в группе здоровых лиц в возрасте 20–22 лет (M=0,03; МКИ=0,02–0,05). В то же время у больных в состоянии ремиссии после проведенного лечения копии вирусной ДНК ни в одном случае, ни в плазме, ни в смывах полости рта, обнаружены не были (см. табл. 1, рис. 1, г). Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что для детей, больных КЛХ, характерно существенное угнетение гуморального ответа к ВЭБ, о чем свидетельствуют низкие показатели СГЗ титров ВЭБ-специфических антител до и после лечения.

При этом концентрация вирусной ДНК, обнаруженная у некоторых больных в плазме и смывах полости рта до лечения, после лечения снижалась до нулевых значений. Примером могут служить результаты динамического наблюдения за двумя вирусными маркерами у 3 больных (см. рис. 2). Титры IgG/ВКА-антител у этих больных до и после лечения, как это было упомянуто выше, не отражали клиническое течение болезни. В то же время индивидуальные значения ДНК ВЭБ, выявленные у каждого больного при поступлении в клинику, в состоянии ремиссии после проведения лечения снизились до нулевых значений.

Как известно, клеточные элементы крови играют главную роль в специфической и неспецифической защите организма от внешних и внутренних патогенных агентов, а также участвуют в купировании разных патологических процессов. Лимфоциты, функционально подразделяемые на В-, Т- и НК-клетки, ответственны также за гуморальный и клеточный иммунитет. Исходя из этого, представлялось важным выяснить, зависит ли уровень экспрессии ВЭБ у детей, больных КЛХ, от количественного содержания форменных элементов крови, осуществляющих иммунную защиту организма и подверженных у этих больных воздействиям патологического процесса и химиотерапии.

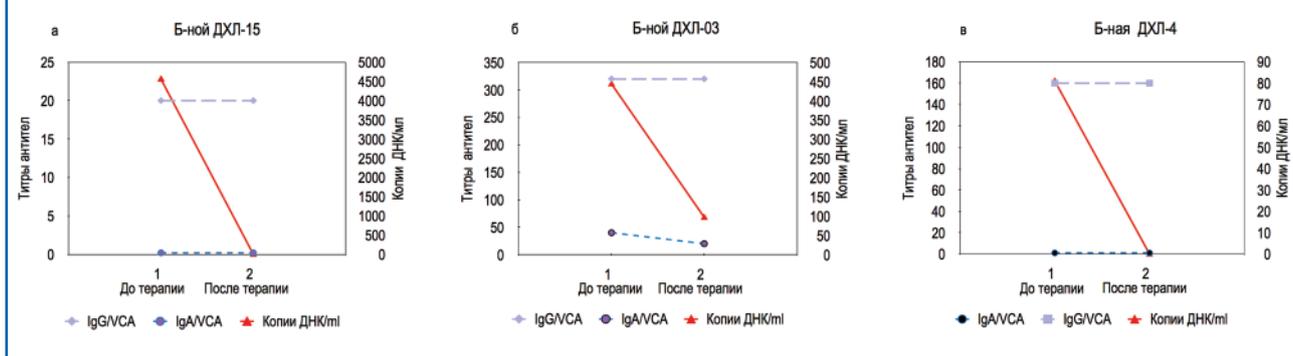
Для решения поставленной задачи мы сравнили содержание лейкоцитов, лимфоцитов, нейтрофилов и моноцитов в крови изучаемых больных до лечения и после его проведе-

Таблица 2. Форменные элементы лейкоцитарного роста у детей, больных КЛХ*, до и после лечения в состоянии ремиссии и соответствующие показатели у здоровых детей

Лейкоциты ($\times 10^9$)				Лимфоциты (%)					
Больные дети				Здоровые** дети	Больные дети				Здоровые дети
до лечения (n=10)		после лечения (n=8)			до лечения (n=10)		после лечения (n=8)		
Медиана	МКИ	Медиана	МКИ	Медиана	МКИ	Медиана	МКИ		
8,9	5,5–11,2	2,6	1,6–3,4	6–7	13,3	8,2–22,1	21,1	17,5–28,2	22–35
Нейтрофилы (%)				Моноциты (%)					
Больные дети				Здоровые дети	Больные дети				Здоровые дети
до лечения (n=10)		после лечения (n=8)			до лечения (n=10)		после лечения (n=8)		
Медиана	МКИ	Медиана	МКИ	Медиана	МКИ	Медиана	МКИ		
79,1	68,8–84,3	61,2	50,3–66,6	55–72	5,5	2,6–6,2	5,9	5,4–13,6	2–8

*Возраст детей, больных КЛХ, – 12–18 лет (среднее значение 14,8 года); **нормальные показатели у детей старше 12 лет.
Примечание. n= число изученных случаев.

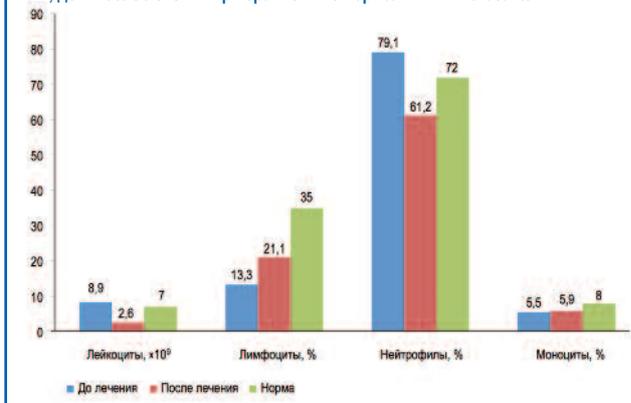
Рис. 2. ВЭБ-специфические маркеры (титры гуморальных антител и концентрации вирусной ДНК) у детей, больных КЛХ, до и после лечения.



ния в состоянии ремиссии. Контролем служили соответствующие показатели у здоровых детей примерно такого же возраста. Результаты представлены в табл. 2 и на рис. 3, из которых следует, что медиана чисел циркулирующих в крови лейкоцитов ($\times 10^9/\text{л}$) у больных детей до лечения – 8,9 (МКИ=5,5–11,2) даже несколько превышала соответствующий показатель у здоровых детей того же возраста (6–7), но после проведенной терапии снизилась более чем в 3 раза, до 2,6 (МКИ=1,6–3,4).

Различие между значениями медиан в сравниваемых группах больных детей статистически достоверно, $p=0,0016$. Напротив, медиана процентного содержания лимфоцитов у больных детей до лечения 13,3 (МКИ=8,2–22,1) оказалась в 1,6 раза ниже, чем таковая у детей после лечения, 21,1 (МКИ=17,5–28,2), и приблизительно в 2 раза ниже, чем соответствующий показатель у здоровых детей (22–35). Тем не менее различие между значениями медиан в 2 группах больных детей оказалось статистически недостоверным, $p=0,14$. Значения медиан процентного содержания нейтрофилов и моноцитов в группах детей до и после проведенного лечения было в пределах показателей у здоровых лиц (см. табл. 2). Хотя медиана процентного содержания нейтрофилов до лечения (79,1; МКИ=68,8–84,3) статистически достоверно отличалась от соответствующего показателя у больных после лечения [61,2 (МКИ=50,3–66,6; $p=0,035$)]. Полученные данные позволяют предположить, что изменение количественного содержания лейкоцитов и лимфоцитов у больных до или после проведенной терапии не оказывает у больных детей существенного влияния на уровень экспрессии ВЭБ, поскольку даже их нормальное содержание сопровождалось низкими титрами ВЭБ-специфических антител. Причина существенно ослабленного гуморального ответа на антигены вируса у детей, больных КЛХ, возможно, объясняется отсутствием ассоциации болезни у этих больных с ВЭБ. В то же время вирусная нагрузка в виде копий ДНК ВЭБ, обнаруженная в плазме крови отдельных больных до лечения, в случае успешно проведенной терапии снижается до нулевых значений, и этот маркер, по-видимому, может быть использован в клинической практике при оценке эффективности лечения.

Рис. 3. Медианы значений форменных элементов крови у детей, больных КЛХ, до и после лечения при сравнении с нормальными показателями.



При анализе собственных и литературных данных возникает вопрос, играет ли ВЭБ вообще какую-либо роль в патогенезе этого заболевания, или у этих больных он является «вирусом-пассажем». Согласно наблюдениям некоторых исследователей иммунная селекция, постоянно происходящая в организме человека, может привести к утрате вирусной эписомы из трансформированной вирусом клетки, как это доказано в случае не ассоциированных с вирусом вариантов лимфомы Беркитта, регистрируемой у населения экономически развитых стран. В этом случае вирусу отводится роль «беглеца», выполнившего трансформацию клеток и исчезнувшего (hit-and-run). Нельзя исключить, что принцип взаимодействия ВЭБ с клетками-мишенями по принципу hit-and-run имеет место и в патогенезе случаев КЛХ, не ассоциированных с вирусом, хотя приводятся аргументированные доказательства, отрицающие такую возможность [36]. Дальнейшие молекулярные исследования ВЭБ-негативных форм КЛХ, доминирующих в России, должны приблизить нас к пониманию патогенеза этой опухоли. При этом представляется важным выяснить, какое значение для патологи-

ческого процесса играет ДНК ВЭБ, обнаруживаемая в плазме крови больных до и после проведения лечения. Является ли эта группа больных более чувствительной или более резистентной к проводимой терапии, отличается ли длительностью ремиссии и лучшим или худшим прогнозом, и возможно ли использовать вирусную нагрузку в плазме крови для мониторинга больных. Если подтвердится факт роли ВЭБ в реализации патогенеза у больных ВЭБ-негативными формами КЛХ, то терапевтическое воздействие у этих боль-

ных может быть направлено либо непосредственно на вирус, либо на критические стадии молекулярного пути, через который вирус осуществляет лимфомагенез. В этом случае концентрация вирусной ДНК в плазме может стать критерием, позволяющим оценить степень минимальной остаточной болезни и вероятность рецидива заболевания.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что конфликт интересов отсутствует.

Литература/References

- Rickinson AB, Lane PJ. Epstein-Barr virus: Co-opting B-cell memory and migration. *Curr Biol* 2000; 10: R120–R123.
- Abbott RJ, Pachnio A, Pedrosa-Pacheco I et al. Asymptomatic Primary Infection with Epstein-Barr Virus: Observations on Young Adult Cases. *J Virol* 2017; 91 (21): e00382–17.
- Kang MS, Kieff E. Epstein-Barr virus latent genes. *Exp Mol Med* 2015; 47 (1): e131.
- Gallo A, Vella S, Miele M et al. Global profiling of viral and cellular non-coding RNAs in Epstein-Barr virus-induced lymphoblastoid cell lines and released exosome cargos. *Cancer Lett* 2017; 388: 334–43.
- Piedade D, Azevedo-Pereira JM. The Role of microRNAs in the Pathogenesis of Herpesvirus Infection. *Viruses* 2016; 8 (6). pii: E156. DOI: 10.3390/v8060156
- Young LS, Murray PG. Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene* 2003; 22: 5108–21.
- Alexander FE, Jarrett RF, Laurence D et al. Risk factors for Hodgkin's disease by Epstein-Barr virus (EBV) status: prior infection by EBV and other. *Br J Cancer* 2000; 82: 1117–21.
- Mueller N, Evans A, Harris NL et al. Hodgkin's disease and Epstein-Barr virus. Altered antibody pattern before diagnosis. *N Engl J Med* 1989; 320: 689–95.
- Anagnostopoulos I, Herbst H, Niedobitek G et al. Demonstration of monoclonal EBV genomes in Hodgkin's disease and Ki-1-positive anaplastic large cell lymphoma by combined Southern blot and in situ hybridization. *Blood* 1989; 74: 810–6.
- Tanyildiz HG, Yildiz I, Bassullu N et al. The Role of Epstein-Barr Virus LMP-1 Immunohistochemical Staining in Childhood Hodgkin Lymphoma. *Iran J Pediatr* 2015; 25: e2359.
- Iwakiri D, Takada K. Role of EBERS in the pathogenesis of EBV infection. *Adv Cancer Res* 2010; 107: 119–36.
- Vockeroth M, Wei W, Nagy E et al. Suppression of the LMP2A target gene, EGR-1, protects Hodgkin's lymphoma cells from entry to the EBV lytic cycle. *J Pathol* 2013; 230: 399–409.
- Anderson LJ, Longnecker R. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A exploits Notch1 to alter B-cell identity in vivo. *Blood* 2009; 113: 108–16.
- Soni V, Cabir-McFarland E, Kieff E. LMP1 TRAFficking activates growth and survival pathways. *Adv Exp Med Biol* 2007; 597: 173–87.
- Eliopoulos AG, Young LS. LMP1 structure and signal transduction. *Semin Cancer Biol* 2001; 11: 435–44.
- Wang F, Gregory C, Sample C et al. Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) and nuclear proteins 2 and 3C are effectors of phenotypic changes in B lymphocytes: EBNA-2 and LMP1 cooperatively induce CD23. *J Virol* 1990; 64: 2309–18.
- Henderson S, Rowe M, Gregory C et al. Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell* 1991; 65: 1107–15.
- Laberty CD, Hu HM, Opirari AW et al. The Epstein-Barr virus LMP1 gene product induces A20 zinc finger protein expression by activating nuclear factor kappa B. *J Biol Chem* 1992; 267: 24157–60.
- Uchida J, Yasui T, Takaoka-Shibchigo Y et al. Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses. *Science* 1999; 286: 300–3.
- Schwarzer R, Dorken B, Jundt F. Notch is an essential upstream regulator of NF-kappaB and is relevant for survival of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Leukemia* 2012; 26: 806–13.
- Khan G, Miyasbita EM, Yang B et al. Is EBV persistence in vivo a model for B cell homeostasis? *Immunity* 1996; 5: 173–9.
- Alexander FE, McKimmey PA, Williams J et al. Epidemiological evidence for the 'two-disease hypothesis' in Hodgkin's disease. *Int J Epidemiol* 1991; 20: 354–61.
- Levin LI, Chang ET, Ambinder RF et al. Atypical prediagnosis Epstein-Barr virus serology restricted to EBV-positive Hodgkin lymphoma. *Blood* 2012; 120: 3750–5.
- Henle W, Henle G, Andersson J et al. Antibody responses to Epstein-Barr virus-determined nuclear antigen (EBNA)-1 and EBNA-2 in acute and chronic Epstein-Barr virus infection. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1987; 84: 570–4.
- Chang ET, Zheng T, Lennette ET et al. Heterogeneity of risk factors and antibody profiles in Epstein-Barr virus genome-positive and -negative Hodgkin lymphoma. *J Infect Dis* 2004; 189: 2271–81.
- Diepstra A, Niens M, Vellenga E et al. Association with HLA class I in Epstein-Barr-virus-positive and with HLA class III in Epstein-Barr-virus-negative Hodgkin's lymphoma. *Lancet* 2005; 365: 2216–24.
- Huang X, Kushekkar K, Nolte I et al. HLA associations in classical Hodgkin lymphoma: EBV status matters. *PLoS One* 2012; 7: e39986.
- Niens M, Jarrett RF, Hepkema B et al. HLA-A*02 is associated with a reduced risk and HLA-A*01 with an increased risk of developing EBV+ Hodgkin lymphoma. *Blood* 2007; 110: 3310–5.
- Urayama KY, Jarrett RF, Hjalgrim H et al. Genome-wide association study of classical Hodgkin lymphoma and Epstein-Barr virus status-defined subgroups. *J Natl Cancer Inst* 2012; 104: 240–53.
- Glaser SL, Lin RJ, Stewart SL et al. Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease: epidemiologic characteristics in international data. *Int J Cancer* 1997; 70: 375–82.
- Jarrett AF, Armstrong AA, Alexander E. Epidemiology of EBV and Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 1996; 7 (4): 5–10.
- Jarrett RF, Gallagher A, Jones DB et al. Detection of Epstein-Barr virus genomes in Hodgkin's disease: relation to age. *J Clin Pathol* 1991; 44: 844–8.
- Детская онкология. Национальное руководство. Под ред. МД. Алиева, В.Г. Полякова, Г.Л. Менткевича, С.А. Майковой. М.: Издательская группа РОНЦ, 2012. / *Detskaja onkologija. Natsional'noe rukovodstvo. Pod red. MD. Alieva, V.G. Poliakova, G.L. Mentkevicha, S.A. Maiakovoj. M.: Izdatel'skaja grupa RONTs, 2012. [in Russian]*
- Stein H, Delsol G, Pileri SA et al. Classical Hodgkin lymphoma, introduction. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al (eds) WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. IARC, Lyon, 2008.
- Botezatu IV, Kondratova VN, Shelepov VP et al. DNA melting analysis: application of the "open tube" format for detection of mutant KRAS. *Anal Biochem* 2011; 419: 302–8.
- Gallagher A, Perry J, Freeland J et al. Hodgkin lymphoma and Epstein-Barr virus (EBV): no evidence to support hit-and-run mechanism in cases classified as non-EBV-associated. *Int J Cancer* 2003; 104: 624–30.

Сведения об авторах

- Ботезату Ирина Викторовна** – канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. биохимии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина»
Валиев Тимур Теймуразович – канд. мед. наук, ст. науч. сотр. отд. химиотерапии гемобластозов ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина»
Душенькина Татьяна Егоровна – лаб.-исследователь лаб. вирусного канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина»
Смирнова Ксения Валерьевна – канд. биол. наук, зав. лаб. вирусного канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина»
Равшанова Рано Саидовна – канд. мед. наук, ст. науч. сотр. отд. химиотерапии гемобластозов ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина»
Максимович Дмитрий Михайлович – канд. матем. наук, ст. науч. сотр. отд. эпидемиологии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина»
Лихтенштейн Анатолий Владимирович – д-р. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. биохимии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина»
Гурцевич Владимир Эдуардович – д-р. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. вирусного канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина». E-mail: vlad-88@yandex.ru
Попа Александр Валентинович – д-р. мед. наук, зав. отд. химиотерапии гемобластозов ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина»
Сенюта Наталья Борисовна – канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. вирусного канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина»