Клиническая онкогематология. 2018;11(2):160–6

Clinical oncohematology. 2018;11(2):160–6

ЛИМФОИДНЫЕ ОПУХОЛИ

LYMPHOID TUMORS

Вирус Эпштейна—Барр у больных классической лимфомой Ходжкина

Epstein-Barr Virus in Patients with Classical Hodgkin's Lymphoma

В.Э. Гурцевич, Е.А. Демина, Н.Б. Сенюта, И.В. Ботезату, К.В. Смирнова, Т.Е. Душенькина, Д.М. Максимович, У.В. Парамонова, И.С. Монин, А.В. Лихтенштейн

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Каширское ш., д. 24, Москва, Российская Федерация, 115478

VE Gurtsevitch, EA Demina, NB Senyuta, IV Botezatu, KV Smirnova, TE Dushen'kina, DM Maksimovich, UV Paramonova, IS Monin, AV Lichtenshtein

NN Blokhin National Medical Cancer Research Center, 24 Kashirskoye sh., Moscow, Russian Federation, 115478

РЕФЕРАТ

Обоснование. Тесная связь между вирусом Эпштейна—Барр (ВЭБ) и классической лимфомой Ходжкина (кЛХ) установлена примерно у $^1/_3$ больных. ВЭБ-положительные случаи этой лимфомы характеризуются повышенными титрами ВЭБ-специфических антител, часто возникающими задолго до появления симптомов опухоли, а также высокой концентрацией ДНК ВЭБ в плазме больных. Эти вирусные маркеры, как правило, коррелируют с клиническими проявлениями болезни и эффектом проведенной терапии. Однако у больных с ВЭБ-отрицательными вариантами кЛХ оценка клинической значимости гуморального ответа на ВЭБ и концентрации ДНК ВЭБ в плазме не проводилась.
Цель. Поиск возможной диагностической и прогностической значимости маркеров ВЭБ у больных с ВЭБ-отрицательными вариантами кЛХ.
Методы. В исследование включено 13 больных кЛХ, наблюдавшихся в отделении химиотерапии гемобластозов НИИ клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Соотношение мужчин и женщин 1:1,3, средний возраст составил 26,4 года. У всех больных до лечения, в процессе его проведения, после его окончания и в период наблюдения анализировали количество лейкоцитов и лимфоцитов крови. Контрольную группу, в которой анализу подвергнуты те же показатели, составили 40 здоровых лиц (средний возраст 41,1 года, соотношение мужчин и женщин 1,5:1). В исследовании использовались серологический тест на антитела к ВЭБ и количественное определение числа копий вирусной ДНК в плазме крови.
Результаты. Полученные данные свидетельствуют о низком уровне гуморального ответа к ВЭБ у изучаемых больных, часто еще более снижающемся после нескольких курсов полихимиотерапии, что коррелировало со снижением абсолютного числа лейкоцитов и лимфоцитов крови. В отличие от титров вирусспецифических антител, не отражающих эффективность противоопухолевой терапии, концентрация ДНК ВЭБ в плазме у 2 пациентов снизилась до 0 после достижения ремиссии.
Заключение. Ограниченное число наблюдений, тем не менее, позволяет предположить, что показатели вирусной нагрузки в плазме больных ВЭБ-отрицательными вариантами кЛХ могут оказаться полезным маркером, отражающим эффективность противоопухолевого воздействия. Необходимы дополнительные исследования для внесения ясности в изучаемую проблему.

ABSTRACT

Background. A close relationship between Epstein-Barr virus (EBV) and classical Hodgkin's lymphoma (cHL) has been established in approximately 1/3 patients. EBV-positive lymphomas are characterized by increased level of EBV specific antibodies emerging long before tumor symptoms, as well as a high plasma EBV DNA concentration. These viral markers normally correlate with clinical manifestations and the outcome of treatment performed. In patients with EBV-negative lymphomas, however, there has been no attempt to assess the clinical significance of either humoral response to EBV or EBV DNA concentration in plasma.
Aim. To evaluate diagnostic and prognostic significance of EBV markers in patients with EBV-negative lymphomas.
Methods. The clinical trial included 13 cHL-patients admitted at the Department of chemotherapy of hemoblastoses of NN Blokhin National Medical Cancer Research Center. The male to female ratio was 1:1.3, the median age was 26.4 years. Leukocyte and lymphocyte counts were evaluated in all the patients before, during, and after treatment as well as throughout the follow-up period. The same indicators were analysed in the control group which contained 40 healthy persons (with the median age of 41.1 years, male to female ratio 1.5:1). The study was based on serologic test for EBV antibodies and quantitative analysis of the viral DNA copy number in plasma.
Results. The obtained data show a low immunie response to EBV and its diminishment after several polychemotherapy treatment cycles, correlating with decreased leukocyte and lymphocyte levels. As opposed to levels of virus-specific antibodies which do not reflect the efficacy of anticancer therapy, plasma EBV DNA concentration in 2 patients decreased to 0 after remission had been achieved.
Conclusion. Although the number of observations is limited, one could suggest that viral load values in plasma of patients with EBV-negative lymphomas can prove to be a useful marker of anticancer therapeutic effect. Additional studies of these markers are required.

© 2018 практическая медицина

Ключевые слова: вирус Эпштейна—Барр (ВЭБ), классическая лимфома Ходжкина, ДНК ВЭБ, ВЭБ-отрицательная классическая лимфома Ходжкина, титр вирусспецифических антител.

Keywords: Epstein-Barr virus (EBV), classical Hodgkin's lymphoma, EBV DNA, EBV-negative classical Hodgkin's lymphoma, level of virus-specific antibodies.

Получено: 13 ноября 2017 г.
Принято в печать: 8 февраля 2018 г.

Received: November 13, 2017
Accepted: February 8, 2018

Для переписки: Владимир Эдуардович Гурцевич, д-р мед. наук, профессор, Каширское ш., д. 24, Москва, Российская Федерация, 115478; тел.: 8(499)324-25-64; e-mail: gurtsevitch-vlad-88@yandex.ru

For correspondence: Prof. Vladimir Eduardovich Gurtsevitch, MD, PhD, 24 Kashirskoye sh., Moscow, Russian Federation, 115478; Tel.: 8(499)324-25-64; e-mail: gurtsevitch-vlad-88@yandex.ru

Для цитирования: Гурцевич В.Э., Демина Е.А. Сенюта Н.Б. и др. Вирус Эпштейна—Барр у больных классической лимфомой Ходжкина. Клиническая онкогематология. 2018;11(2):160–6.

DOI: 10.21320/2500-2139-2018-11-2-160-166

For citation: Gurtsevitch VE, Demina EA, Senyuta NB, et al. Epstein-Barr Virus in Patients with Classical Hodgkin's Lymphoma. Clinical oncohematology. 2018;11(2):160–6.

DOI: 10.21320/2500-2139-2018-11-2-160-166

ВВЕДЕНИЕ

Значение вируса Эпштейна—Барр (ВЭБ) в возникновении классической лимфомы Ходжкина (кЛХ) по-прежнему далеко от понимания. В пользу этиологической роли вируса имеется несколько доказательств. Среди них можно отметить повышенный риск кЛХ у лиц, переболевших инфекционным мононуклеозом [1], повышенные титры антител к ВЭБ до возникновения кЛХ [2], а также моноклональность вирусного генома в клетках Ходжкина и Березовского—Рид—Штернберга (Х/Б-Р-Ш), которые являются субстратом опухоли [3]. Последнее свидетельствует о том, что мутация возникла в одной исходно инфицированной клетке, в результате клональной экспансии потомков которой сформировалась опухоль. Роль ВЭБ в патогенезе кЛХ подтверждена методами гибридизации ДНК в Саузернблоттинге, а также гибридизацией *in situ* [3], доказавшими наличие латентной ВЭБ-инфекции в опухолевой ткани у части больных кЛХ. Кроме того, анализы на РНК-транскрипты ВЭБ (EBER) и иммуногистохимическое тестирование на латентный мембранный белок-1 (LMP-1) представили прямые доказательства присутствия ВЭБ в клетках Х/Б-Р-Ш или в вариантах этих клеток у 40–50 % больных кЛХ [4, 5].

Молекулярные исследования позволили разделить всех больных кЛХ на ВЭБ-положительных и ВЭБ-отрицательных. Отличительные эпидемиологические особенности этих двух подтипов кЛХ, учитывающие вариабельность их распределения по возрасту, полу, этническому и гистологическому вариантам, в совокупности с результатами молекулярных исследований подтверждают патогенетическую роль ВЭБ при ряде случаев кЛХ и позволяют выявить дополнительные факторы риска [1]. При этом детальная эпидемиологическая характеристика ВЭБ-ассоциированной кЛХ ограничена. В некоторых исследованиях сообщается, что ВЭБ-положительные случаи кЛХ чаще встречаются у мужчин, в других — при одном из четырех гистологических подтипов (лимфоидном истощении), в третьих — у детей и пожилых людей, среди латиноамериканского населения, в экономически менее развитых странах и т. д. [6, 7]. Эти данные, часто основанные на изучении небольшого числа наблюдений среди населения с различными рисками развития кЛХ, широко варьируют и нередко вступают в противоречие друг с другом.

Однако роль вируса и его судьба при ВЭБ-отрицательных формах кЛХ, к сожалению, до сих пор мало привлекали внимание исследователей. Между тем ВЭБ в организме больных кЛХ, как правило, присутствует и остается неизвестным, влияет ли он на патогенез опухоли и ее течение. Что делает вирус в организме больных с ВЭБ-отрицательными формами кЛХ, остается большой загадкой. В литературе неоднократно высказывалось предположение о том, что ВЭБ этиологически связан со всеми случаями кЛХ [8, 9]. Такую возможность исключить нельзя, хотя имеющиеся данные показывают, что этот тезис не может быть распространен на все ВЭБ-отрицательные случаи кЛХ, поскольку не всегда подтверждается инфицированность ВЭБ [10, 11]. Отсутствуют также доказательства наличия в ВЭБ-отрицательных биоптатах кЛХ сохранившихся фрагментов интегрированных геномов вируса [11, 12].

Другие вирусные агенты, по-видимому, также могут участвовать в патогенезе ВЭБ-отрицательных случаев кЛХ. Это должны быть вирусы, которые широко распространены в популяции и заражают человека еще в раннем детском возрасте. Одним из них может быть *Transfusion Transmitted Virus* (TTV) [13], который, как и другие представители семейства *Anelloviridae*, увеличивает риск хромосомных аномалий [14]. Необходимо, однако, дальнейшее накопление информации об этих чрезвычайно распространенных и геномно-разнообразных представителях аннеловирусного семейства, чтобы оценить их возможное участие в возникновении кЛХ. Широкое распространение у человека получили и некоторые представители семейств герпесвирусов и полиомавирусов. Многочисленные попытки, направленные на доказательство причастности к возникновению кЛХ герпесвируса 6-го типа (HHV-6) и некоторых представителей полиомавирусов (PyV), оказались безуспешными.

Методы секвенирования следующего поколения открыли новые возможности для молекулярно-биологических исследований и позволили, в частности,

выявить несколько новых вирусов [15, 16]. Один из этих методов, цифровое вычитание транскриптомы [15], использованный при обнаружении вируса саркомы Меркеля (MCV), в настоящее время применяется и для изучения кЛХ. Исследования современными методами геномной последовательности клеток Х/Б-Р-Ш, вероятно, позволят окончательно решить вопрос о вирусном происхождении кЛХ.

В последние годы измерение концентраций ДНК ВЭБ в плазме больных с ВЭБ-ассоциированными формами рака носоглотки стало эффективным методом, используемым клиницистами не только для диагностики этого новообразования, идентификации остаточной, клинически скрытой опухоли, но и для оценки эффективности проведенной терапии [17, 18].

Определение уровней ДНК ВЭБ в плазме больных с ВЭБ-ассоциированными лимфомами также оказалось весьма информативным. Концентрация ДНК ВЭБ в плазме коррелировала с клиническим течением болезни. У больных в состоянии ремиссии вирусная ДНК в плазме не выявлялась, но при резистентном течении опухоли оставалась на определяемом уровне [19]. Появились также сообщения, указывающие на динамику вирусной нагрузки и в плазме больных кЛХ. По данным S. Hohaus и соавт., обнаружение ДНК ВЭБ в плазме имеет высокую специфичность (90 %) и относительно низкую чувствительность (65 %) [20]. При этом концентрация вирусной ДНК, согласно полученным этими авторами результатам, была более высокой у пациентов на поздней стадии болезни и в старшей возрастной группе при наличии В-симптомов. Присутствие ВЭБ в клетках Х/Б-Р-Ш и высокое число копий вирусной ДНК в плазме этих больных сочетались с повышенной частотой инфильтрирующих опухоль макрофагов CD68. Кроме того, нагрузка вирусной ДНК коррелировала с уровнем циркулирующей бесклеточной ДНК и интерлейкина-6, но имела обратную зависимость от количества лимфоцитов и титров антител к EBNA1 [20]. В работе Y.L. Kasamon и соавт. показано, что в плазме EBER-ISH-позитивных больных кЛХ число копий ДНК ВЭБ, обнаруживаемых до начала лечения, снижалось в 50 раз или совсем не определялось в течение 1-го месяца после проведенной терапии. При этом снижение вирусной нагрузки в плазме этих больных коррелировало с продолжительностью ремиссии [21]. Аналогичные результаты при изучении кЛХ были получены J.A. Kanakry и соавт., что позволило авторам предложить использовать концентрацию вирусной ДНК в качестве маркера клинического статуса кЛХ, а также выявлять больных, резистентных к терапии [22]. К этим же выводам приходят и другие исследователи [20, 23]. Их наблюдения свидетельствуют о том, что уровень ДНК ВЭБ, исходно обнаруживаемый в плазме больных с ВЭБ-ассоциированными формами кЛХ, становится неопределяемым после успешно проведенной терапии и существенно повышается при рецидивах болезни. Таким образом, плазменная ДНК ВЭБ может использоваться в качестве биомаркера опухолевого процесса. Она может служить индикатором активности болезни и неблагоприятного прогноза.

Однако у больных с вариантами кЛХ, не ассоциированными с ВЭБ, наиболее часто встречающимися в европейских странах, включая Россию, оценка клинической значимости гуморального ответа на ВЭБ и концентрации ДНК ВЭБ в плазме не проводилась. Остается неизвестным, можно ли указанные вирусные маркеры при этой форме опухоли использовать в качестве диагностических и смогут ли они отражать эффект проведенной терапии. Исходя из сказанного, целью настоящей работы стала оценка возможного клинического применения маркеров ВЭБ у больных с ВЭБ-отрицательными формами кЛХ. В частности, представляло интерес выяснить, имеют ли при этой форме опухоли диагностическую ценность титры антител к ВЭБ и вирусная нагрузка в плазме больных, а также способны ли они отражать клинические проявления болезни.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Участники исследования

В исследование включено 13 больных кЛХ, наблюдавшихся в отделении химиотерапии гемобластозов НИИ клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Соотношение мужчин и женщин 1:1,3, средний возраст составил 26,4 года. Все случаи кЛХ были верифицированы гистологически, а 12 — иммуногистохимически в соответствии с классификацией ВОЗ 2008 г. [24]. У 8 больных был диагностирован вариант с нодулярным склерозом I типа, у 2 — с нодулярным склерозом II типа, по 1 пациенту — со смешанноклеточным вариантом и вариантом, богатым лимфоцитами. Вариант кЛХ не уточнен у 1 больного. У всех пациентов имели место распространенные стадии заболевания: II стадия с массивным поражением лимфатических узлов, преимущественно средостения, III и IVстадии. Все больные получали в первой линии интенсивную программу химиотерапии: 6 циклов по схеме EACOPP-14 ± лучевая терапия. У всех больных достигнута ремиссия. Рецидив установлен только у 1 больной через 12 мес. полной ремиссии. Серологический тест на антитела к ВЭБ выполнен до лечения у 7 больных, после окончания химиотерапии — у 4, а в 2 случаях — до и после противоопухолевого лечения.

У всех больных до лечения, в процессе его проведения, после его окончания и в период наблюдения анализировали количество лейкоцитов и лимфоцитов крови, которые реагируют в организме на внешние и внутренние воздействия и в известной мере отражают иммунный статус больных. Контрольную группу, в которой анализу подвергнуты те же показатели, составили 80 здоровых лиц, доноров крови (средний возраст 42,3 года, соотношение мужчин и женщин 1,4:1). Данное исследование, в которое вошли больные кЛХ и здоровые лица с их согласия в результате случайной выборки, было одобрено комитетом по этике при ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Серологический тест на антитела к ВЭБ

Для тестирования плазмы на наличие ВЭБ-специфических антител использовали непрямую ре-

акцию иммунофлюоресценции, в которой применяли клеточную линию P3HR1, продуцирующую вирус и синтезирующую его капсидный антиген (ВКА), а также не продуцирующую вирус клеточную линию Raji, синтезирующую после обработки индукторами ранний антиген (РА) вируса. Для усиления экспрессии вирусных антигенов клеточную линию Raji обрабатывали ТРА (12-О-тетрадеканоил-форбол-13-ацетат) в концентрации 20 нг/мл в сочетании с натрия бутиратом в дозе 3 мкмоль/мл в течение 3–5 дней. Клеточную линию P3HR1 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 температуре 37 °С и 5 % углекислого газа. Приготовленные таким образом пулы клеток в виде отдельных капель наносили на предметные стекла, фиксировали и использовали в качестве антигенных препаратов, на которые наслаивали тестируемые образцы плазмы. Для визуализации реакции использовали конъюгированные FITC козьи антитела против IgG 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 флюоресцентного микроскопа компании NIKON (Германия). Присутствие антител к вирусу определяли по ярко-зеленому свечению клеток на фоне неокрашенных. Титром антител считали то последнее разведение плазмы, в котором обнаруживали не менее 5 % специфически флюоресцирующих клеток (при четких положительном и отрицательном контролях). В каждой группе обследуемых лиц подсчитывали средние геометрические значения (СГЗ) титров антител.

Количественное определение числа копий вирусной ДНК

Число копий ДНК ВЭБ в образцах плазмы и буккальных смывов определяли методом 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 [22].

Для ПЦР-РВ использовали праймеры к фрагменту размером 76 пар нуклеотидов в области BamHI-W ДНК ВЭБ (GenBank № V01555): смысловой праймер W-44F (5'-CCCAACACTCCACCACACC), антисмысловой праймер W-119R (5'-TCTTAGGAGCTGTCCGAGGG), флюоресцентный зонд W-67T (5'-FAM-CACACACTACA CACACCCACCCGTCTC-RTQ1) [25]. В качестве контроля способности ДНК плазмы и буккальных смывов служить матрицей в ПЦР использовали уникальный ген *K-RAS*, как описано ранее [26]. Реакцию проводили в 96-луночных планшетах на приборе CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США) в 50 мкл реакционной смеси («Синтол», Россия), содержащей 0,3 мкмоль каждого из праймеров, 25 нмоль флюоресцентного зонда, 4 ммоль магния хлорида, 200 ммоль каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 1 ед. Taq-полимеразы, 10 мкл раствора ДНК в буфере ТЕ (соответствует 50 мкл плазмы). В каждый анализ включали 2 негативных контроля (образцы, не содержащие ДНК). Условия ПЦР: денатурация в течение 5 мин при температуре 95 °С; 40 циклов по 15 с при температуре 95 °С и 30 с при температуре 56,5 °С. Данные ПЦР-РВ анализировали с помощью программы Bio-Rad CFX manager.

Статистический анализ

Точный тест Фишера был использован для сравнения статистически значимых различий между процентным содержанием вариантов LMP-1 в биологических образцах двух сравниваемых групп. Значение $p < 0,05$ указывало на наличие статистически значимых различий.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе мы не ставили перед собой задачу выяснить частоту ВЭБ-положительных и ВЭБ-отрицательных случаев кЛХ у больных, включенных в исследование. Исходя из крайне низких титров IgG-антител к ВКА и РА вируса у изучаемых больных, мы предположили, что все случаи кЛХ относятся к формам болезни, не ассоциированным с ВЭБ. Такая возможность подкрепляется фактом доминирования у этих больных гистологического варианта нодулярного склероза (69 %), по литературным данным, редко связанного с ВЭБ.

Известно, что после заражения ВЭБ (как правило, в детском возрасте) вирус в организме человека присутствует пожизненно. При этом уровень репликации вируса в организме здорового человека строго контролируется его иммунной системой. Иммуносупрессия приводит к активному размножению вируса и усилению гуморального ответа на антигены вируса, и наоборот, восстановление иммунокомпетентности сопровождается подавлением вирусной активности до исходного уровня и падением титров вирусспецифических антител. Задача настоящего исследования состояла в изучении характера экспрессии ВЭБ у больных кЛХ, предположительно не связанной с ВЭБ, и в поиске возможной корреляции между гуморальным ответом на вирус, уровнем вирусной ДНК в плазме и клиническими проявлениями болезни. Полученные данные представлены в табл. 1.

Из данных табл. 1 видно, что до лечения средние геометрические значения (СГЗ) титров антител IgG к ВКА и РА вируса у больных были очень близки к таковым в группе доноров, статистически значимого различия между ними не выявлено ($p > 0,05$). СГЗ для антител к ВКА были равны 54,4 и 42,3, к РА — 9,4 и 9,0 соответственно. Было близким в этих группах и число лиц, имеющих антитела IgG/ВКА (100 и 95 % соответственно; $p > 0,05$). Однако содержание антител IgG/РА у больных кЛХ до и после лечения было выше, чем в группе доноров (66,7 и 50,0 % *vs* 30,0 % соответственно), что может быть связано с усилением репликации вируса на фоне ослабленного болезнью иммунитета. Интересно отметить, что у больных кЛХ, находящихся в ремиссии после проведенного лечения, несмотря на исходно низкий уровень гуморального ответа на ВЭБ, показатели СГЗ титров IgG-антител по сравнению с таковыми у больных до

Таблица 1. Инфицированность вирусом Эпштейна—Барр у больных лимфомой Ходжкина и здоровых лиц

Число пациентов	Диапазон (САЗ) возраста, лет	Клинический статус	IgG/ВКА		IgG/РА		Медиана (МКИ) ДНК ВЭБ, копии/1 мл плазмы
			СГЗ	Положительные случаи, %	СГЗ	Положительные случаи, %	
Больные кЛХ до лечения							
9	17–34 (26,4)	Первичные	54,4	100,0	9,4	66,7	97,5 (0–273,5)
Больные кЛХ после лечения							
6	18–44 (27,7)	Ремиссия	16,5	66,7	5,0	50,0	0 (0–0)
Здоровые лица							
80	25–34 (29,4)	Доноры	42,3	95,0	9,0	30,0	0 (0–0,191)

IgG/ВКА и IgG/РА — антитела класса G к вирусному капсидному и раннему антигенам ВЭБ; ВЭБ — вирус Эпштейна—Барр; кЛХ — классическая лимфома Ходжкина; МКИ — межквартильный интервал; САЗ — среднее арифметическое значение; СГЗ — среднее геометрическое значение.

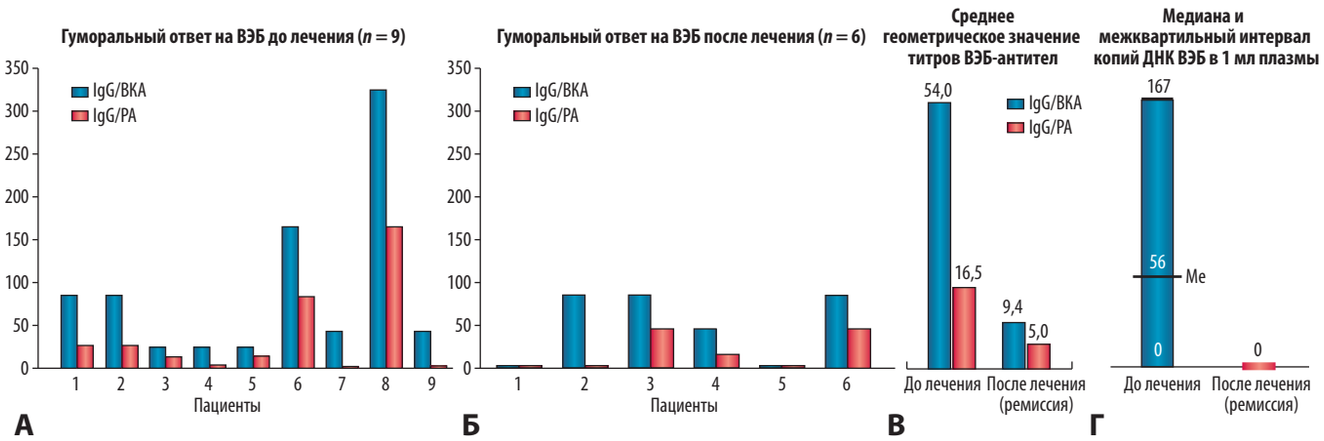

Рис. 1. (*А–Г*) Показатели ВЭБ у больных классической лимфомой Ходжкина до и после лечения
ВКА — вирусный капсидный антиген; ВЭБ — вирус Эпштейна—Барр; Me — медиана; РА — ранний антиген.

Fig. 1. (*A–Г*) EBV values in patients with classical Hodgkin's lymphoma before and after therapy
ВКА — viral capsid antigen; ВЭБ — Epstein-Barr virus; Me — Mediana; PA — early antigen.

лечения были значительно ниже: к ВКА — в 3,3 раза (16,5 *vs* 54,4), к РА — в 1,9 раза (5,0 *vs* 9,4). Однако статистически значимых различий в распределении значений не обнаружено. 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–В*).

Особый интерес представляют результаты изучения вирусной нагрузки в плазме больных. Так, в группе обследованных до лечения вирусная ДНК была выявлена в 55,6 % (5/9) случаев, а медиана числа копий ДНК ВЭБ составила 56 (межквартильный интервал [МКИ] 0–167). В то же время у больных в состоянии ремиссии, наступившей после проведенного лечения, вирусная ДНК ни в одном случае не обнаружена (0 %, 0 из 5; МКИ 0–0) (рис. 1, *Г*). Таким образом, между показателями, характеризующими распределение значений копий ДНК ВЭБ в плазме больных до и после лечения, были выявлены статистически значимые различия (p = 0,035). Мы предположили, что снижение гуморального ответа к ВЭБ у больных в состоянии ремиссии, а также отсутствие вирусной ДНК в плазме этих больных после лечения могли быть следствием подавления репликации вируса в циркулирующих В-клетках.

Чтобы внести ясность в этот вопрос, мы сопоставили число лейкоцитов и лимфоцитов у больных ЛХ до и после лечения. Как известно, лейкоциты играют главную роль в специфической и неспецифической защите организма от внешних и внутренних патогенных агентов, а также участвуют в купировании различных патологических процессов. Лимфоциты же, функционально подразделяемые на В-, Т- и NK-клетки, ответственны за гуморальный и клеточный иммунитет. Результаты проведенного анализа представлены на рис. 2 (*А, Б*).

Действительно, медиана числа циркулирующих в крови лейкоцитов у больных после лечения была практически в 2 раза ниже, чем до лечения, при статистически значимом различии: 6780 после лечения (МКИ 5280–8110) *vs* 11 479 (МКИ 7370–14 340) до лечения (p = 0,001). Различия обнаружены, хотя и оказались статистически незначимы, в сравниваемых группах и при оценке процентного содержания лимфоцитов в крови (рис. 2, *В, Г*). Медианы их значений также отличались в 1,4 раза и были равны 13,7 % (МКИ 12,4–19,4 %) до лечения и 10 % (МКИ 7,9–14,0 %) после проведенной терапии. Полученные данные позволяют предположить, что существенное снижение титров IgG-антител к ВКА и РА ВЭБ и вирусной нагрузки в плазме больных с наступлением стойкой ремиссии, скорее всего, связано с уменьшением пула содержащих вирус лимфоцитов.

Характер экспрессии ВЭБ у больных кЛХ, не связанной с вирусом, не предполагает возможности использовать серологические маркеры вируса (титры антител IgG/ВКА и IgG/РА) для диагностики и/или

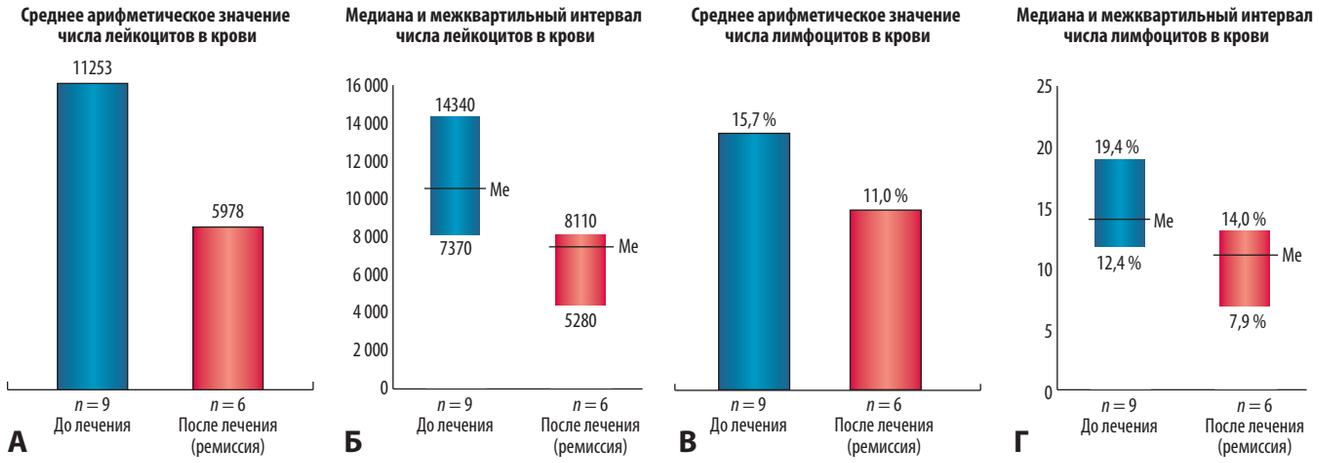

Рис. 2. Показатели (*А*, *Б*) лейкоцитов и (*В*, *Г*) лимфоцитов в крови больных классической лимфомой Ходжкина до и после лечения
Me — медиана.

Fig. 2. Leukocyte (*А*, *Б*) and lymphocyte (*В*, *Г*) counts in blood of patients with classical Hodgkin's lymphoma before and after therapy
Me — Mediana.

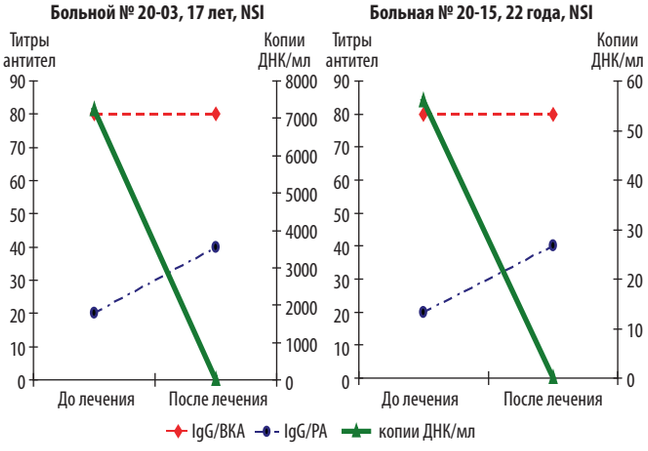

Рис. 3. Показатели концентрации ДНК ВЭБ в плазме у 2 больных (*А* и *Б*) классической лимфомой Ходжкина в динамике
ВКА — вирусный капсидный антиген; РА — ранний антиген.

Fig. 3. Changes in EBV DNA plasma levels in 2 patients (*А* and *Б*) with classical Hodgkin's lymphoma
ВКА — viral capsid antigen; PA — early antigen.

оценки эффективности терапии у этих больных. Такой вывод подтверждают и результаты динамического наблюдения за 2 больными (рис. 3).

На рис. 3, *А* видно, что в случае пациента № 20-03 титры антител IgG/ВКА до лечения и в состоянии ремиссии после 4 курсов полихимиотерапии остались на прежнем уровне (1:80), а титры IgG/РА даже несколько выросли. В то же время вирусная нагрузка в 1 мл плазмы у этого больного резко снизилась с 7222 копий ДНК ВЭБ до 0. При этом число лейкоцитов в крови уменьшилось в 1,7 раза (с 11 489 до 6780), а содержание лимфоцитов — в 1,4 раза (с 13,1 до 9,1 %), что подтверждает наличие зависимости между числом клеточных элементов крови и уровнем вирусной нагрузки в плазме больного. Аналогичное поведение вирусных маркеров наблюдали и у второй пациентки (№ 20-15; см. рис. 3, *Б*). Титры антител IgG/ВКА и IgG/РА до и после лечения у больной в состоянии ремиссии после аналогичных 4 курсов полихимиотерапии остались практически на прежнем уровне, а число копий вирусной ДНК в 1 мл плазмы снизилось с 53 до 0. Число лейкоцитов в крови больной снизилось в 3,1 раза (с 9370 до 3190), а содержание лимфоцитов — в 2,1 раза (с 19,3 до 7,5 %). Таким образом, проведенное исследование показало, что у больных кЛХ, не связанной с ВЭБ, гуморальный ответ на антитела к вирусу существенно не повышен и не отражает их клиническое состояние. Напротив, создается впечатление, что вирусная нагрузка в плазме крови этих больных коррелирует с эффектом проведенной терапии, поэтому данный маркер может использоваться в клинической практике.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате анализа собственных и литературных данных возникает вопрос, играет ли ВЭБ вообще какую-либо роль в патогенезе кЛХ или у этих больных он является «вирусом-пассажиром». Согласно наблюдению S.K. Srinivas и соавт. [27], иммунная селекция, постоянно происходящая в организме, может привести к утрате вирусной эписомы из трансформированной вирусом клетки, как это происходит в случае не связанных с вирусом вариантов лимфомы Беркитта у населения экономически развитых стран, когда вирусу отводится роль выполнившего трансформирующую функцию «беглеца» («hit-and-run») [27, 28]. Можно предположить, что принцип взаимодействия ВЭБ с клетками-мишенями по принципу «hit-and-run» имеет место и в патогенезе не ассоциированных с вирусом случаев ЛХ. Дальнейшие молекулярные исследования ВЭБ-отрицательных форм кЛХ должны приблизить нас к пониманию патогенеза этой опухоли. В частности, представляется важным выяснить, какое значение для патологического процесса играет ДНК ВЭБ, обнаруживаемая в плазме больных, до проведения лечения. Необходимо понять, является ли эта группа больных более чувствительной или более резистентной к проводимой терапии, отличается ли длительностью ремиссии и лучшим или худшим прогнозом. Если подтвердится факт негативной роли ВЭБ в реализации

патогенеза у пациентов с ВЭБ-отрицательными формами болезни, то терапевтическое воздействие у этих больных может быть направлено либо непосредственно на вирус, либо на критические стадии молекулярного пути, через который вирус участвует в лимфомогенезе. Тогда концентрация вирусной ДНК в плазме может стать критерием, позволяющим оценить степень минимальной остаточной болезни и вероятность рецидива заболевания.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов. Е.А. Демина, член редакционной коллегии журнала «Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика», не участвовала в рецензировании статьи.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа частично поддержана Российским фондом фундаментальных исследований, грант № 18-015-00505а.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн: В.Э. Гурцевич, А.В. Лихтенштейн.
Сбор и обработка данных: Н.Б. Сенюта, И.В. Ботезату, К.В. Смирнова, Т.Е. Душенькина, Д.М. Максимович.
Предоставление материалов исследования: Е.А. Демина, У.В. Парамонова, И.С. Монин.
Анализ и интерпретация данных: В.Э. Гурцевич, Е.А. Демина.
Подготовка рукописи: В.Э. Гурцевич, Е.А. Демина, А.В. Лихтенштейн.
Окончательное одобрение рукописи: все авторы.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Alexander FE, Jarrett RF, Lawrence D, et al. Risk factors for Hodgkin's disease by Epstein-Barr virus (EBV) status: prior infection by EBV and other agents. Br J Cancer. 2000;82(5):1117–21.
2. 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(11):689–95. doi: 10.1056/nejm198903163201103.
3. 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(2):810–6.
4. 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(6):e2359. doi: 10.5812/ijp.2359.
5. Iwakiri D, Takada K. Role of EBERs in the pathogenesis of EBV infection. Adv Cancer Res. 2010;107:119–36. doi: 10.1016/s0065-230x(10)07004-1.
6. 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(4):375–82. doi: 10.1002/(sici)1097-0215(19970207)70:4<375::aid-ijc1>3.3.co;2-l.
7. Jarrett AF, Armstrong AA, Alexander E. Epidemiology of EBV and Hodgkin's lymphoma. Ann Oncol. 1996;7(Suppl 4):s5–s10. doi: 10.1093/annonc/7.suppl_4.s5.
8. Ambinder RF. Gammaherpesviruses and "Hit-and-Run" oncogenesis. Am J Pathol. 2000;156(1):1–3. doi: 10.1016/s0002-9440(10)64697-4.
9. Meij P, Vervoort MB, Bloemena E, et al. Antibody responses to Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein-1 (LMP1) and expression of LMP1 in juvenile Hodgkin's disease. J Med Virol. 2002;68(3):370–7. doi: 10.1002/jmv.10213.
10. 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(12):2271–81. doi: 10.1086/420886.
11. 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(5):624–30. doi: 10.1002/ijc.10979.
12. Staratschek-Jox A, Kotkowski S, Belge G, et al. Detection of Epstein-Barr virus in Hodgkin-Reed-Sternberg cells: no evidence for the persistence of integrated viral fragments in Latent membrane protein-1 (LMP-1)-negative classical Hodgkin's disease. Am J Pathol. 2000;156(1):209–16. doi: 10.1016/s0002-9440(10)64721-9.
13. zur Hausen H, de Villiers EM. Virus target cell conditioning model to explain some epidemiologic characteristics of childhood leukemias and lymphomas. Int J Cancer. 2005;115(1):1–5. doi: 10.1002/ijc.20905.
14. Jelcic I, Hotz-Wagenblatt A, Hunziker A, et al. Isolation of multiple TT virus genotypes from spleen biopsy tissue from a Hodgkin's disease patient: genome reorganization and diversity in the hypervariable region. J Virol. 2004;78(14):7498–507. doi: 10.1128/jvi.78.14.7498-7507.2004.
15. Feng H, Shuda M, Chang Y, et al. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. Science. 2008;319(5866):1096–100. doi: 10.1126/science.1152586.
16. Volter C, Hausen H, Alber D, et al. Screening human tumor samples with a broad-spectrum polymerase chain reaction method for the detection of polyomaviruses. Virology. 1997;237(2):389–96. doi: 10.1006/viro.1997.8772.
17. Lo YM, Leung SF, Chan LY, et al. Kinetics of plasma Epstein-Barr virus DNA during radiation therapy for nasopharyngeal carcinoma. Cancer Res. 2000;60(9):2351–5.
18. Wang WY, Twu CW, Chen HH, et al. Plasma EBV DNA clearance rate as a novel prognostic marker for metastatic/recurrent nasopharyngeal carcinoma. Clin Cancer Res. 2010;16(3):1016–24. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-09-2796.
19. Au WY. Quantification of circulating Epstein-Barr virus (EBV) DNA in the diagnosis and monitoring of natural killer cell and EBV-positive lymphomas in immunocompetent patients. Blood. 2004;104(1):243–9. doi: 10.1182/blood-2003-12-4197.
20. Hohaus S, Santangelo R, Giachelia M, et al. The viral load of Epstein-Barr virus (EBV) DNA in peripheral blood predicts for biological and clinical characteristics in Hodgkin lymphoma. Clin Cancer Res. 2011;17(9):2885–92. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-10-3327.
21. Kasamon YL, Jacene HA, Gocke CD, et al. Phase 2 study of rituximab-ABVD in classical Hodgkin lymphoma. Blood. 2012;119(18):4129–32. doi: 10.1182/blood-2012-01-402792.
22. Kanakry JA, Li H, Gellert LL, et al. Plasma Epstein-Barr virus DNA predicts outcome in advanced Hodgkin lymphoma: correlative analysis from a large North American cooperative group trial. Blood. 2013;121(18):3547–53. doi: 10.1182/blood-2012-09-454694.
23. Dinand V, Sachdeva A, Datta S, et al. Plasma Epstein Barr Virus (EBV) DNA as a Biomarker for EBV associated Hodgkin lymphoma. Indian Pediatr. 2015;52(8):681–5. doi: 10.1007/s13312-015-0696-9.
24. 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. 4th edition. Lyon: IARC Press; 2008.
25. Lo YM, Chan LY, Chan AT, et al. Quantitative and temporal correlation between circulating cell-free Epstein-Barr virus DNA and tumor recurrence in nasopharyngeal carcinoma. Cancer Res. 1999;59(21):5452–5.
26. 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(2):302–8. doi: 10.1016/j.ab.2011.08.015.
27. Srinivas SK, Sample JT, Sixbey JW. Spontaneous loss of viral episomes accompanying Epstein-Barr virus reactivation in a Burkitt's lymphoma cell line. J Infect Dis. 1998;177(6):1705–9. doi: 10.1086/517427.
28. Razzouk BI, Srinivas S, Sample CE, et al. Epstein-Barr Virus DNA recombination and loss in sporadic Burkitt's lymphoma. J Infect Dis. 1996;173(3):529–35. doi: 10.1093/infdis/173.3.529.