

**ИНФИЦИРОВАННОСТЬ ОПУХОЛИ ВИРУСАМИ ГЕРПЕСА
ЧЕЛОВЕКА И ОСОБЕННОСТИ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА
ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С
УВЕАЛЬНОЙ МЕЛАНОМОЙ**

Светлова Е. В. ¹,

Балацкая Н. В. ¹,

Куликова И. Г. ¹,

Саакян С. В. ¹,

Свирина И. В. ¹,

Андрюшин А. Е. ¹,

Мякошина Е. Б. ¹

¹ ФГБУ НМИЦ ГБ им. Гельмгольца МЗ РФ.

**TUMOR INFECTION WITH HUMAN HERPES VIRUSES AND FEATURES
OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTE SUBSET COMPOSITION IN
PATIENTS WITH UVEAL MELANOMA**

Svetlova E. V. ^a,

Balatskaya N. V. ^a,

Kulikova I. G. ^a,

Saakyan S. V. ^a,

Svirina I. V. ^a,

Andryushin A. E. ^a,

Myakoshina E. B. ^a

^a Helmholtz Scientific Medical Research Center for Ophthalmic Diseases.

Резюме

Введение. Роль вирусов группы герпеса (HHV) в развитии глазной онкопатологии в настоящее время остается одним из малоизученных вопросов. Важным фактором, способствующим неопластической прогрессии, является ослабление системы иммунологического надзора и, в частности, нарушения в количественном и качественном составе основных субпопуляций лимфоцитов периферической крови. *Цель:* определение и анализ субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у пациентов с УМ в зависимости от инфицированности материала опухолей вирусами герпеса человека (HHV). *Материалы и методы.* Биоматериал 99 пациентов с опухолями увеального тракта обследован методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) на наличие ДНК вирусов герпеса 1 и 2 типов (HSV-1,2), вируса Варицелла Зостер (VZV), цитомегаловируса (CMV), вируса Эпштейна – Барр (EBV), вирусов герпеса человека 6 и 8 типов (HHV-6, HHV-8). Всего исследована 231 тест-проба (ткань опухоли (n=99), кровь (n=132)). Для постановки ПЦР-РВ использовали коммерческие тест-системы ЗАО «Вектор-Бест». Всем пациентам провели исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови методом лазерной цитофлуориметрии на проточном цитометре BD FACS Canto II. В группу контроля вошли 33 здоровых донора. Статистическая обработка данных выполнена в программах «Biostatd», «Excel» (t - критерий Стьюдента, уровень статистической значимости: $p < 0,05$) *Результаты.* ДНК HHV обнаружена в материале опухоли 11,3 % пациентов (n=11): в 72,7 % случаев EBV, в 18,2% - HHV-6. В 1 случае (при АПЭС) выявлено сочетанное инфицирование EBV и HHV-6. По результатам ПЦР обследования в зависимости от инфицированности опухоли пациентов распределили на 2 группы: 1-я - HHV «+» и 2 - я - HHV «-». У пациентов HHV «+» группы обнаружили статистически значимое повышение общего количества Т-клеток (CD3+) и снижение НК-клеток в сравнении с пациентами без ДНК

возбудителя в ткани опухоли и группой контроля. Индивидуальный анализ частоты сдвигов от нормы показал, что в группе HHV «+» в 3 раза чаще встречаются пациенты с повышенными значениями относительного количества CD3+ лимфоцитов, в 2 раза чаще абсолютного количества CD3+CD4+CD8+ клеток, в 2,3 раза чаще с увеличением соотношения CD4+/CD8+. *Заключение.* Полученные данные позволяют предположить участие вирусов в поддержании иммунологической резистентности у пациентов с опухолями.

Ключевые слова: вирусы группы герпеса, увеальная меланома, полимеразная цепная реакция, субпопуляции лимфоцитов, кровь, ткань опухоли.

Abstract

Introduction. Currently, a role for human herpes viruses (HHV) in development of ocular oncopathology remains one of the poorly explored issues. An important factor contributing to neoplastic progression is impaired immunosurveillance particularly alterations in quantitative and qualitative composition of the hallmark peripheral blood lymphocyte subsets. *Purpose:* to determine and analyze peripheral blood lymphocyte subset composition in patients with uveal melanoma (UM) assessing human herpes viruses (HHV) infection in tumor material. *Materials and Methods.* Biomaterial from 99 patients with uveal tract tumors was examined by real-time polymerase chain reaction (rt-PCR) for DNA presence coupled to herpes virus type 1 and 2 (HSV-1,2), varicella zoster virus (VZV), cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr virus (EBV), human herpes virus types 6 and 8 (HHV-6, HHV-8). A total of 231 test samples (tumor tissue (n=99), blood (n=132)) were examined. Commercial test-systems of Vector-Best CJSC were used for rt-PCR staging. Peripheral blood lymphocyte subset composition in all patients was studied by laser cytofluorometry on BD FACSCanto II flow cytometer. The control group included 33 healthy donors. Statistical data processing was performed using “Biostatd”, “Excel” (t - Student's t-test, level of statistical significance: $p < 0.05$) software. *Results.* HHV DNA was detected in the tumor material from 11.3% of patients (n=11): in 72.7% of cases EBV, in 18.2% — HHV-6. Co-infection with EBV and HHV-6 was detected in 1 case (retinal pigment epithelium adenocarcinoma). According to the PCR data, patients were divided into 2 groups based on tumor infectivity: Group 1 — HHV “+” and Group 2 — HHV “-”. Patients from HHV “+” group had significantly increased and decreased total T-cell (CD3+) and NK-cell count, respectively, compared with patients lacking HHV DNA in tumor tissue and control group. Individual analysis of frequencies deviating from normal range showed that HHV “+” group had 3-fold more often increased percentage of CD3+ lymphocytes, 2-fold more often absolute count of CD3+CD4+CD8+ cells, 2.3-fold more often rise in CD4+/CD8+ ratio. *Conclusion.*

The obtained data suggest that viruses may be involved in maintaining immunological resistance in tumor patients.

Keywords: herpes group viruses, uveal melanoma, polymerase chain reaction, lymphocyte subpopulations, blood, tumor tissue.

1 Введение

2 Вирусы группы герпеса (HHV) – ДНК-содержащие вирусы, способные
3 интегрироваться в геном клетки хозяина, вызывать пожизненную латентную
4 инфекцию и реактивироваться в условиях ослабленного иммунитета. HHV-γ,
5 обладают высоким онкогенным потенциалом, участвуют в росте и
6 прогрессировании злокачественных опухолей различной локализации.

7 Так, роль вируса Epstein-Barr virus (EBV) в развитии лимфом Беркитта,
8 Ходжкина, НК-/Т-клеточной лимфомы назального типа, а также рака желудка
9 и носоглотки подтверждена многочисленными исследованиями [28,19].
10 Показано, что Human herpesvirus 8 (HHV-8) является причиной ряда
11 лимфопролиферативных заболеваний, саркомы Капоши, карциномы гортани
12 и аденокарциномы (АК) предстательной железы [38, 29, 13]. Эффекты HHV α
13 и β подгрупп (Herpes simplex virus (HSV-1, HSV-2), Cytomegalovirus (CMV),
14 Human herpesvirus (HHV) 6 и др.), связанные с малигнизацией, продолжают
15 активно изучаться.

16 Роль HHV в развитии глазной онкопатологии в настоящее время
17 остается одним из малоизученных вопросов. В доступной литературе найдены
18 единичные публикации, в которых приведены описания опухолей
19 конъюнктивы и первичных витреоретинальных неходжкинских лимфом,
20 ассоциированных с EBV [36, 6, 26]. Случай обнаружения геномов CMV и EBV
21 в сочетании с Chlamydia trachomatis в материале пациента с увеальной
22 меланомой представлен также в работе С.В. Саакян и соавт. [4].

23 Ежегодно в России фиксируется более 1000 случаев (на 100 тыс.
24 населения) офтальмоонкологических заболеваний, среди которых наиболее
25 распространенным является увеальная меланома (УМ) [3]. УМ происходит из
26 меланоцитов сосудистой оболочки, наиболее часто локализуется в хориоидее
27 (до 90%) и, значительно реже, в радужке и цилиарном теле.

28 Несмотря на то, что в настоящее время разработаны
29 высокотехнологичные современные методы лечения УМ, более чем у

30 половины пациентов в короткие сроки развивается метастатическая болезнь,
31 которая значительно ухудшает витальный прогноз [16].

32 Важным фактором, способствующим неопластической прогрессии,
33 является ослабление системы иммунологического надзора и, в частности,
34 нарушения в количественном и качественном составе основных субпопуляций
35 лимфоцитов периферической крови.

36 Действительно, в 1990-х г. группами Kan-Mitchell J. с соавт., и Huang
37 X.Q. с соавт. были обнаружены изменения количества циркулирующих
38 цитотоксических лимфоцитов крови при меланоме кожи и увеального тракта
39 [18,14].

40 Несколько позднее появились данные, свидетельствующие об
41 ассоциации роста УМ со сдвигами более широкого состава
42 иммунокомпетентных клеток, вовлекающими также звено
43 хелперов/индукторов, минорную популяцию дубль-позитивных Т-клеток и
44 натуральные киллеры (CD16+ CD56+) – основные лимфоциты врожденного
45 иммунитета, играющие ключевую роль в противоопухолевой и
46 противовирусной защите.

47 В последние годы было показано, что реактивация и хроническое
48 течение герпесвирусной инфекции при УМ, в отличие от пациентов с
49 неонкологической патологией глаза и нормальной иммунологической
50 реактивностью, сопровождается «неадекватными» сдвигами в составе
51 эффекторных популяций лимфоцитов врождённого и адаптивного
52 иммунитета, что может вести к ослаблению противоопухолевой защиты и
53 способствовать злокачественному росту [1].

54 Взаимодействия в системе «вирус - клетки опухоли-иммунная защита
55 организма» при УМ в силу методических трудностей, остаются все еще
56 малоизученными, в то время как онкогенная роль вирусов - облигатных
57 внутриклеточных паразитов, неоспоримо доказана при целом ряде
58 злокачественных новообразований.

59 На сегодняшний день большинство исследований сосредоточены на
60 расшифровке иммуномодулирующих свойств микроокружения опухоли *in situ*
61 и детальных механизмах опухольспецифического ответа.

62 Однако исследования, направленные на прямой поиск HHV в опухоли и
63 возможных взаимосвязей ее инфицированности с качественным и
64 количественным составом субпопуляций лимфоцитов крови при УМ, не
65 проводились.

66 **Цель:** определение и анализ субпопуляционного состава лимфоцитов
67 периферической крови у пациентов с УМ в зависимости от инфицированности
68 материала опухолей вирусами герпеса человека (HHV).

69 2 Материалы и методы

70 В исследование вошли 99 пациентов (57 женщин и 42 мужчины в
71 возрасте от 18 до 83 лет) с опухолями увеального тракта, находившихся на
72 лечении в Отделе офтальмоонкологии ФГБУ НМИЦ Глазных болезней им.
73 Гельмгольца.

74 Диагноз ставился на основании данных стандартных и
75 специализированных офтальмологических методов обследования. Средний
76 уровень проминенции опухоли (по данным эхографии) составил $6,1 \pm 3,0$ мм,
77 а диаметр основания – $15,7 \pm 2,1$ мм. Всем пациентам проведена энуклеация
78 поражённого глаза с последующим патогистологическим исследованием. У 98
79 пациентов диагностирована УМ (99%), в одном случае морфология опухоли
80 соответствовала аденокарциноме пигментного эпителия сетчатки (АПЭС).

81 Материал опухоли помещался в криопробирки типа Eppendorf и
82 хранился в камере глубокой заморозки при температуре -70°C до проведения
83 исследований.

84 В биоматериале опухоли методом полимеразной цепной реакции в
85 реальном времени (ПЦР-РВ) (термоциклер CFX96, Bio-Rad Laboratories, Inc.,
86 США) проводилось определение генома HSV-1,2, вируса Varicella Zoster
87 (VZV), CMV, EBV, вирусов HHV-6, HHV-8 согласно инструкциям фирмы-

88 производителя. Для постановки ПЦР-РВ использовали коммерческие тест-
89 системы ЗАО «Вектор-Бест», Россия.

90 Забор крови проводился в утреннее время до энуклеации в вакуумные
91 пробирки со стабилизатором К₃ЭДТА (Zhejiang Gongdong Medical Technology
92 Co., Ltd., КНР).

93 Иммунофенотипирование субпопуляций лимфоцитов в цельной крови
94 (ЦК) пациентов и здоровых доноров выполнялось методом лазерной
95 цитофлуориметрии на проточном цитометре BD FACS Canto II (Becton
96 Dickinson, США) с использованием системы моноклональных антител
97 Multitest 6-Color TBNK Reagent в пробирках BD Tru Count (Becton Dickinson,
98 США). В программе Canto (Becton Dickinson, США) определяли
99 относительное и абсолютное содержание Т-лимфоцитов (CD3+), Т-хелперов
100 (CD3+CD4+CD8-), Т-цитотоксических (CD3+CD4-CD8+), Т-дубль
101 позитивных (CD3+CD4+CD8+), НК-клеток - (CD16+CD56+), В-лимфоцитов
102 (CD19+), рассчитывался индекс (CD4+/CD8+), отражающий баланс хелперов
103 и цитотоксических Т-клеток.

104 В группу контроля вошли 33 здоровых человека без признаков
105 офтальмопатологии, сопоставимых по возрасту и полу с пациентами основных
106 групп.

107 Всего исследована 231 проба биоматериала: ткани опухоли (n=99) и
108 цельная кровь (n=132).

109 Статистическая обработка данных выполнена в программах «Biostatd»,
110 «Excel» (t -критерий Стьюдента, уровень статистической значимости: p <0,05)
111 Количественные данные представлены в виде M±m (M-среднее значение, m-
112 ошибка среднего значения).

113 3 Результаты

114 ДНК HHV обнаружена в материале опухоли 11,3 % пациентов (n=11):
115 при этом наиболее часто, в 72,7 % случаев (n=8), определялся геном EBV,
116 существенно реже, в 18,2% проб (2 чел.) - HHV-6. В 1 случае (при АПЭС)

117 выявлено сочетанное инфицирование EBV и HHV-6. По результатам ПЦР
118 обследования в зависимости от инфицированности опухоли пациентов
119 распределили на 2 группы: 1-я - HHV «+» и 2 - я - HHV «-».

120 Результаты исследования крови пациентов основных групп показали,
121 что средние значения абсолютного количества лимфоцитов (CD45+) были
122 примерно одинаковыми ($2,1 \pm 0,08 \times 10^9/\text{л}$ HHV «-»; $2,2 \pm 0,2 \times 10^9/\text{л}$ HHV «+») (табл. 1).

124 При анализе средних значений общей субпопуляции Т-клеток (CD3+)
125 обнаружили повышение как относительного до $77,64 \pm 1,18\%$, так и
126 абсолютного ($1,7 \pm 0,15 \times 10^9/\text{л}$) ее содержания у пациентов HHV «+» в
127 сравнении как с контрольной группой доноров без офтальмопатологии
128 ($73,1 \pm 0,87\%$, $p < 0,05$; $1,51 \pm 0,08 \times 10^9/\text{л}$), так и с группой без ДНК возбудителя в
129 ткани опухоли ($71,18 \pm 0,86\%$, $p < 0,05$; $1,51 \pm 0,07 \times 10^9/\text{л}$).

130 Повышение CD3+ лимфоцитов в HHV «+» группе было обусловлено,
131 главным образом, подъемом абсолютного ($1,12 \pm 0,13 \times 10^9/\text{л}$) и относительного
132 ($49,5 \pm 2,06\%$) количества Т-хелперов/индукторов (CD3+CD4+), отличавшим ее
133 как от контроля ($0,97 \pm 0,06 \times 10^9/\text{л}$; $45,7 \pm 1,19\%$), так и от группы пациентов с
134 неинфицированными опухолями ($0,97 \pm 0,05 \times 10^9/\text{л}$; $45,01 \pm 0,98\%$).

135 Содержание цитотоксических лимфоцитов (CD3+CD8+) у пациентов
136 обеих групп было практически одинаковым ($0,6 \pm 0,06 \times 10^9/\text{л}$; $0,6 \pm 0,03 \times 10^9/\text{л}$) и
137 незначительно отличалось от такового у контрольной группы ($0,52 \pm 0,03$
138 $\times 10^9/\text{л}$), это касается как абсолютных, так и относительных значений.

139 Индивидуальный анализ частоты сдвигов от нормы показал, что у 36,4
140 % пациентов с инфицированными опухолями относительное количество Т-
141 клеток (CD3+) было выше нормальных значений, тогда как у пациентов с HHV
142 «-» опухолями такие изменения в содержании указанной субпопуляции
143 наблюдались в 3 раза реже (11,4 %). Данная тенденция сохранялась по

144 отношению к Т- хелперам/индукторам и цитотоксическим лимфоцитам (рис.
145 1).

146 В крови пациентов 1-й группы (с присутствием ДНК вирусов в ткани
147 опухоли) наиболее часто выявлялся дисбаланс основных регуляторных
148 популяций хелперов-индукторов/цитотоксических лимфоцитов, который
149 заключался в увеличении соотношения CD4+/CD8+. Так, если в группе HHV
150 «-» только в 15,9% случаев отмечалось повышение CD4+/CD8+ относительно
151 нормы, то в группе HHV «+» данные сдвиги выявлялись в 2,3 раза чаще
152 (36,4%).

153 Относительное и абсолютное количество «дубль-позитивных» Т-клеток
154 (CD3+CD4+CD8+) было повышено у пациентов обеих групп
155 ($0,026 \pm 0,005 \times 10^9/\text{л}$, $p < 0,05$; $0,027 \pm 0,004 \times 10^9/\text{л}$, $p < 0,05$) в сравнении с группой
156 контроля ($0,009 \pm 0,007 \times 10^9/\text{л}$), что подтверждает ранее опубликованные
157 данные и согласуется с исследованиями других ученых. При этом
158 индивидуальный анализ частоты сдвигов от нормы показал, что в группе HHV
159 «+» практически в 2 раза чаще (54,5%) встречаются пациенты с повышенными
160 значениями абсолютного количества «дубль-позитивных» лимфоцитов, чем в
161 группе HHV «-» (28,4%). Увеличение количества CD3+CD4+CD8+ клеток в
162 крови онкологических пациентов, а также больных аутоиммунными и
163 инфекционными заболеваниями описано в целом ряде работ [7, 33, 34].

164 Обращает внимание достоверное снижение относительного
165 количества НК-клеток ($10 \pm 1,3\%$) у пациентов подгруппы HHV «+» по
166 сравнению как с контрольной ($14 \pm 0,87\%$, $p < 0,05$), так и с группой пациентов
167 с HHV «-» опухолями ($15 \pm 0,8$, $p < 0,05$). При индивидуальном анализе частоты
168 сдвигов от нормы у 25 % пациентов с инфицированными опухолями
169 абсолютное и относительное количество НК-клеток также было снижено,
170 тогда как в крови у пациентов с HHV «-» опухолями, наоборот, отмечалось

171 повышение относительного (23,9%) и абсолютного (4,5%) содержания клеток
172 указанной популяции.

173 4 Обсуждение

174 По результатам нашего исследования инфицированность опухолей
175 увеального тракта составила 11,3%, при этом практически в 73% из них была
176 обнаружена ДНК EBV. В течение жизни EBV сохраняется в эпителиальных
177 клетках и В-лимфоцитах, реализуя два основных сценария течения инфекции
178 – латентную и литическую [12]. В-лимфоциты поддерживают вирус в
179 латентной форме, экспрессируя шесть ядерных антигенов (EBNA) и два
180 латентных мембранных белка (LMP), что обеспечивает его уклонение от
181 системы иммунологического надзора. В латентно инфицированных ВЭБ-
182 положительных клетках вирус может реактивироваться и перейти к
183 продуктивной фазе жизнедеятельности, называемой литическим циклом. Во
184 время литической репликации EBV поочередно экспрессирует до 80 генов, что
185 приводит к образованию новых вирусных частиц, гибели инфицированной
186 клетки и распространению вируса по организму [20].

187 В литературе описаны исследования, подтверждающие способность
188 EBV инфицировать клетки эндотелия сосудов и активировать
189 внутриклеточные белки ингибиторы апоптоза [17, 25]. Бесконтрольный рост
190 сосудов опухоли, поддерживаемый в том числе EBV, способствует ее питанию
191 и росту, а также повышает риск метастазирования за счет увеличения
192 проницаемости сосудистой стенки. Роль EBV в развитии метастатической
193 болезни при УМ еще предстоит изучить, однако ряд уже проведенных
194 исследований указывает на то, что вирус способствует метастазированию
195 других опухолей, например, нозофарингеальной карциномы [22,15].

196 Два паттерна развития инфекции EBV обуславливают различные
197 варианты взаимодействия между вирусом и клеткой, а также локальный и
198 системный иммунный ответ. Ослабление контроля со стороны иммунной

199 системы приводит к трансформации зараженной клетки, в том числе
200 онкогенного характера. Считается, что EBV является причиной 1% (до
201 200 000 случаев ежегодно) злокачественных новообразований человека [39].
202 По данным литературы до 90% населения земного шара инфицировано EBV,
203 однако развитие онкологического процесса, ассоциированного с вирусом,
204 наблюдается лишь в исключительных случаях [5]. Очевидным фактором,
205 объясняющим столь редкое распространение онкологических заболеваний,
206 вызванных EBV, у здоровых инфицированных людей, является наличие
207 мощного иммунного ответа на вирус, в частности, опосредованный Т-
208 клеточным звеном иммунитета.

209 Реакция иммунной системы на трансформированную клетку и
210 своевременное ее уничтожение лежит в основе противоопухолевого
211 иммунного ответа. Распознавание генетически измененной клетки запускает
212 сигнальный каскад в лимфоцитах, сопровождающийся выработкой
213 цитокинов, позволяющих избежать противоопухолевой толерантности
214 иммунной системы. Дендритные клетки захватывают белки – продукты
215 онкогенеза и предоставляют их Т-лимфоцитам на молекулах
216 гистосовместимости МНСI и МНСII, активируя ответ эффекторных Т-клеток
217 против канцер-специфических антигенов [9]. В литературе описаны
218 исследования, указывающие на способность клеток УМ блокировать
219 активирующую функцию дендритных клеток, в частности, продукцию ими
220 цитокинов и активацию Т-лимфоцитов [24].

221 Онкологическая трансформация, запущенная EBV, подавляет
222 противоопухолевые механизмы клетки, так как экспрессия латентных генов
223 вируса сопряжена с перестройками в матричной РНК клетки-хозяина и
224 препятствует синтезу защитных белков (p53, p63, p73) [8]. В данных условиях
225 адекватный системный противоопухолевый иммунный ответ в случае вирус-
226 положительных опухолей становится практически единственным способом
227 защитить организм от бесконтрольного роста трансформированных клеток. В

228 связи с этим изучение субпопуляционного состава лимфоцитов и их роли в
229 элиминации опухолевых клеток актуально для разных видов опухолей,
230 особенно инфицированных различными возбудителями.

231 В публикациях отечественных и зарубежных авторов описано
232 повышение CD3+CD4+ лимфоцитов (Т-хелперов) у пациентов с различными
233 видами опухолей [2, 37]. Т-хелперы/индукторы играют важную роль в
234 иммунной защите и борьбе с вирусными инфекциями и раком, они участвуют
235 в передаче цитокиновых сигналов и создании оптимальных условий для
236 правильного функционирования других иммунных клеток, таких как
237 макрофаги, В-клетки и цитотоксические Т-лимфоциты. В нашем
238 исследовании увеличение общего количества Т-лимфоцитов в три раза чаще
239 встречалось у пациентов с HHV «+» опухолью, при этом повышение средних
240 значений общей популяции происходило за счет увеличения CD3+CD4+
241 клеток. Известно, что активированные CD4+ клетки играют важную роль в
242 контроле EBV, особенно в клетках с латентностью I типа, где вирус
243 синтезирует белок EBNA1, обеспечивающий устойчивость вирусной эписомы
244 в опухолевых клетках [27, 21]. Более того, литическая активность EBNA1-
245 специфичных CD4 + Т-клеток против трансформированных вирусом
246 опухолевых клеток наблюдалась при всех EBV-опосредованных
247 злокачественных новообразованиях, включая лимфому Беркитта [31].

248 Анализ результатов исследования показал повышение количества
249 средних значений «дубль позитивных» Т-лимфоцитов в обеих группах. Ранее
250 сдвиги в этой популяции были отмечены у пациентов с различными
251 злокачественными новообразованиями, в том числе с меланомой кожи [32].
252 Однако накопление минорной популяции, в случае кожной меланомы,
253 обнаруживали именно в инфильтрате опухоли, тогда как в периферической
254 крови увеличение количества CD3+CD4+CD8+ не наблюдалось. Наши
255 результаты согласуются также с ранее полученными данными при УМ
256 больших размеров [1].

257 Натуральные киллеры (NK-клетки, CD16+CD56+) относятся к
258 эффektorным клеткам врожденного иммунитета и составляют от 5% до 15%
259 от общей популяции циркулирующих лимфоцитов. NK-лимфоциты
260 выполняют множество биологических функций, обладают прямой
261 цитотоксичностью в отношении инфицированных вирусом и
262 онкотрансформированных клеток [11]. Увеличение количества натуральных
263 киллеров, как и их миграция в опухолевый инфильтрат, при онкологическом
264 процессе закономерно и неоднократно описано [35]. В нашей работе
265 обнаружено снижение относительного количества NK-клеток (CD16+CD56+)
266 в периферической крови у пациентов с HHV «+» опухолями, тогда как у
267 остальных пациентов отмечалось нормальное или увеличенное их количество.
268 Известно, что прогрессирование EBV инфекции связано, в том числе, с
269 недостаточным количеством натуральных киллеров или с угнетением их
270 функции [10, 30]. Более того, вирус, ограничивая экспрессию литических
271 генов, защищает инфицированную клетку от NK-опосредованного
272 уничтожения за счет повышенной устойчивости к апоптозу [23]. Не
273 исключено, что снижение количества NK-клеток в периферической крови
274 связано с их прямой цитотоксической функцией и миграцией в очаг роста
275 опухоли и локального размножения бактерий и вирусов, в том числе EBV.

276 5 Заключение

277 1. Анализ результатов исследования показал, что в 70% случаев в
278 инфицированном опухолевом материале (HHV «+») при УМ выявлялся геном
279 EBV.

280 2. У пациентов с HHV «+» опухолями обнаружены характерные
281 качественные и количественные сдвиги в составе лимфоцитов периферической
282 крови, которые затрагивали преимущественно популяции Т- и NK-клеток:

283 а) повышение относительного содержания популяции CD3+
284 лимфоцитов, обеспеченное, главным образом, увеличением доли Т-хелперов и
285 закономерный рост соотношения CD4+/CD8+, указывают на тесные

286 патогенетические взаимосвязи Т-клеточного звена иммунитета с
287 функционированием вирус-ассоциированной опухоли;

288 б) более частое выявление сниженного количества циркулирующих
289 естественных киллеров не позволяет исключить миграцию CD16⁺ CD56⁺
290 лимфоцитов из кровяного русла в опухолевый очаг, содержащий вирус, а также
291 прямое влияние EBV на данные клетки, являющиеся ключевыми элементами
292 системы иммунного надзора за опухолями.

ТАБЛИЦЫ

Таблица 1. Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови здоровых добровольцев и пациентов с УМ в зависимости от инфицированности материала опухоли (M±m).

Table 1. Peripheral blood lymphocyte subset composition in healthy volunteers and patients with uveal melanoma based on tumor material HHV infection (M±m).

Показатель Factors	Единица Измерения Unit	Исследуемые группы Groups		
		Контроль (n=33) Control	Пациенты с УМ Patients with UM (n=99)	
			Наличие генома HHV в материале опухоли HHV genome detected in tumor material	
			HHV+ (n=11)	HHV – (n=88)
Лимфоциты CD45+ Lymphocytes CD45+	х10 ⁹ /л	2,06±0,11	2,2±0,2	2,1±0,08
Т-лимфоциты	%	73,1±0,87	77,64±1,18*#	71,18±0,86
общая популяция CD3+	х10 ⁹ /л	1,51±0,08	1,7±0,15	1,51±0,066

T lymphocytes (total population) CD3+				
T-хелперы CD3+	%	45,7±1,19	49,5±2,06	45,01±0,98
CD4+	х10 ⁹ /л	0,97±0,06	1,12±0,13	0,97±0,05
T helpers CD3+CD4+				
T-цитотоксические CD3+ CD8+	%	25,6±1,04	28,37±2,5	26,7±0,83
Cytotoxic T lymphocytes CD3+CD8+	х10 ⁹ /л	0,52±0,03	0,6±0,06	0,6±0,03
T-«дубль- позитивные» лимфоциты CD3+CD4+ CD8+	%	0,54±0,31	1,19±0,23*	1,25±0,15*
“dubble positive” lymphocytes CD3+CD4+CD8+	х10 ⁹ /л	0,009±0,007	0,026±0,005*	0,027±0,004*
B-лимфоциты CD19+	%	12,8±0,63	12,4±1,32	13,3±0,65
B lymphocytes CD19+	х10 ⁹ /л	0,24±0,02	0,29±0,05	0,29±0,02
Натуральные киллеры CD16+	%	14±0,87	9,49±1,33*#	15,06±0,8
CD56+ Natural killers	х10 ⁹ /л	0,29±0,03	0,2±0,03	0,29±0,015

CD16+CD56+				
Отношение CD4+ /CD8+ Ratio of helper- inducer T lymphocytes to cytotoxic suppressor T lymphocytes, CD4+/CD8+	Рассч. Ед.	1,95±0,12	1,95±0,25	1,84±0,07

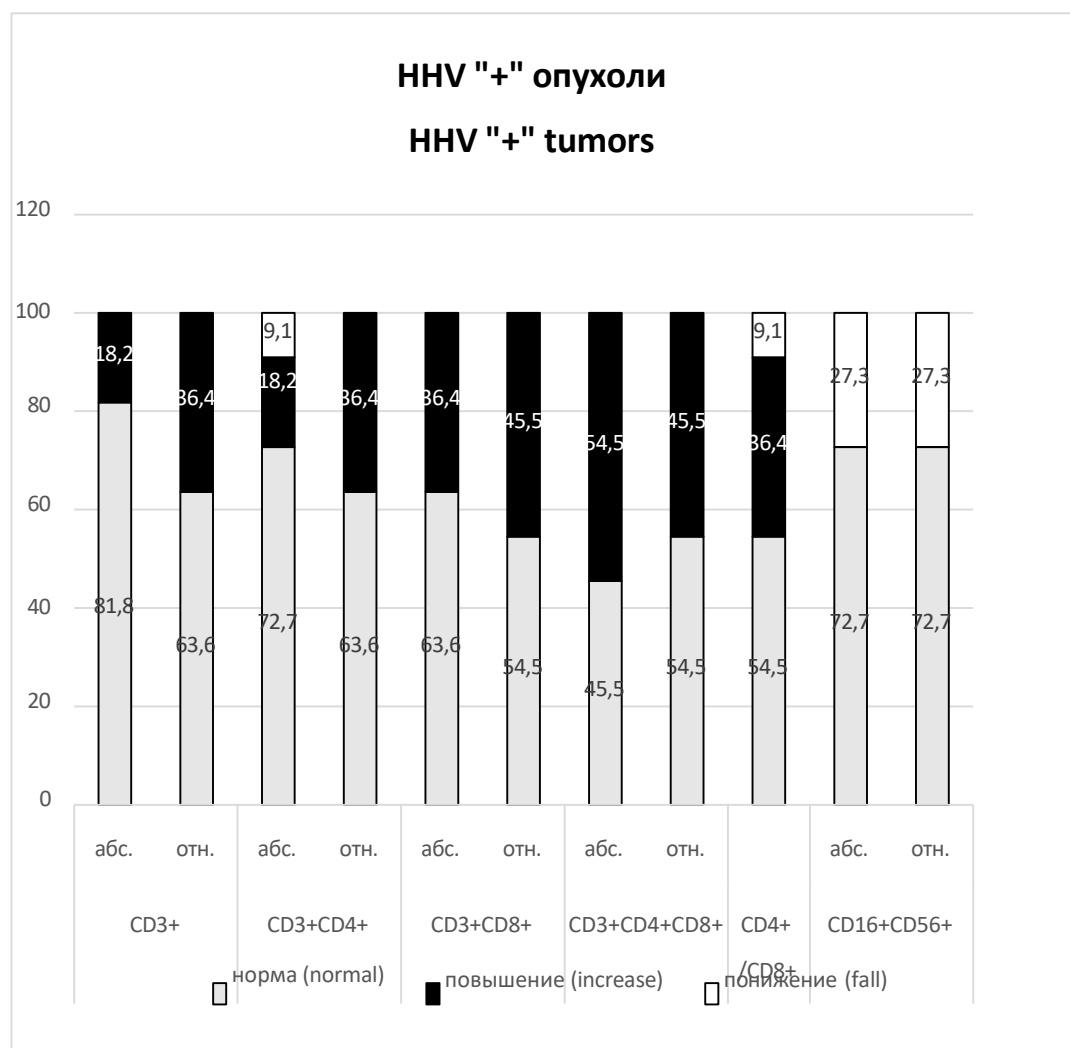
Примечания: n- количество обследуемых в группе; * - достоверность различия параметров у пациентов исследуемых групп по сравнению с группой контроля (p<0,05); # - достоверность различия параметров у пациентов основных исследуемых групп (p<0,05).

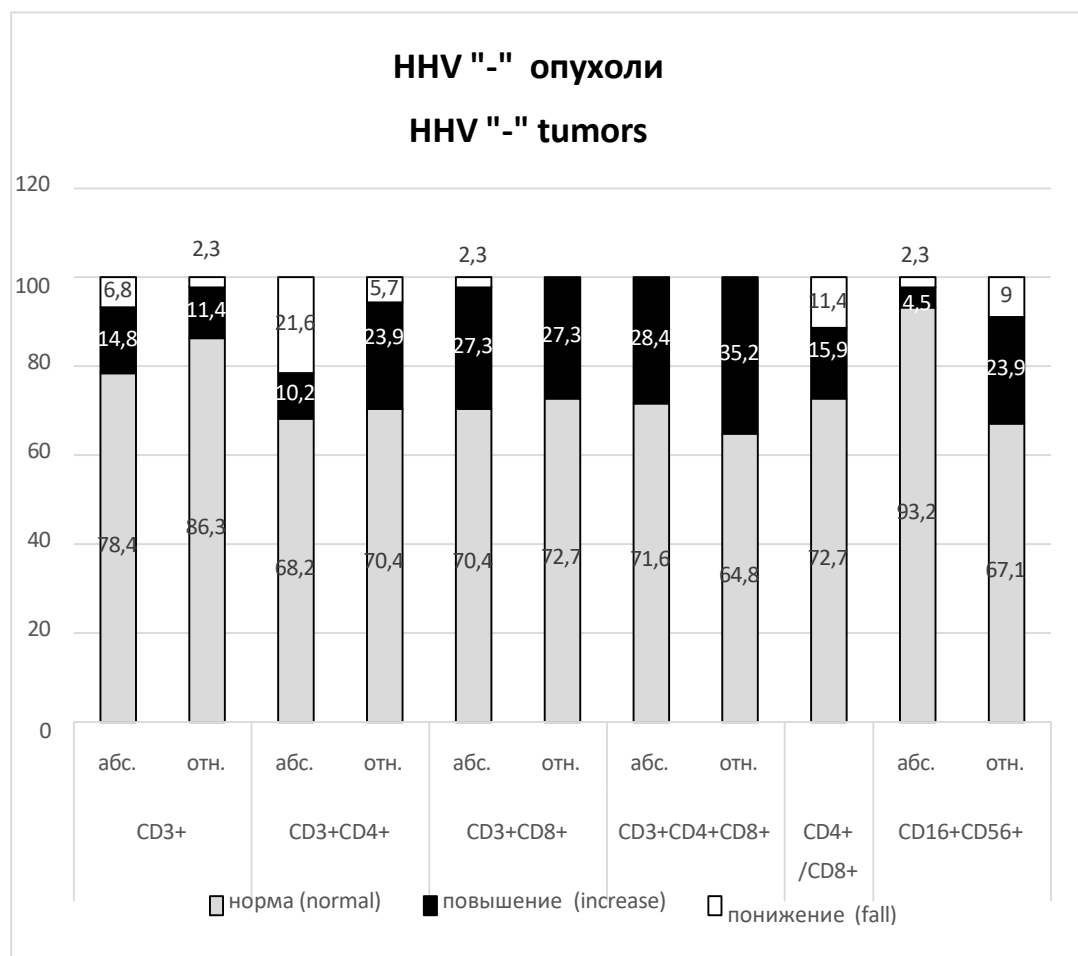
Note: n - number of subjects per group; *, significant differences for test group patient parameters compared with control group (p < 0,05); # - significant differences for patient parameters in main test groups (p < 0,05).

РИСУНКИ

Рисунок 1. Частота случаев (%) сдвигов от нормы (здоровых доноров) в (суб)популяционном составе лимфоцитов крови (относительное и абсолютное количество) и клеточного соотношения CD4+/CD8+ у пациентов с HHV «+» и HHV «-» тканью УМ.

Figure 1. Incidence of shifts from normal range (healthy donors) for blood lymphocyte population (sub) profile (relative and absolute numbers), CD4+/CD8+ cell ratio in patients with HHV “+” and HHV “-” uveal melanoma tissue.





ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Светлова Елена Викторовна – врач-вирусолог вирусологической микробиологической лаборатории отдела иммунологии и вирусологии ФГБУ НМИЦ ГБ им. Гельмгольца МЗ РФ;

адрес: 105062, Москва, ул. Садовая-Черногрязская, 14/19;

телефон: 8(916)463-12-96;

e-mail: qr888@ya.ru

Svetlova Elena Viktorovna – virologist doctor of the Department of Immunology and Virology Helmholtz Scientific Medical Research Center for Ophthalmic Diseases;

address: 105062, Moscow, Sadovaya-Chernogryazskaya, 14/19;

telephone: 8(916)463-12-96;

e-mail: qr888@ya.ru

Блок 2. Информация об авторах

Балацкая Наталья Владимировна – к.б.н., начальник отдела иммунологии и вирусологии ФГБУ НМИЦ ГБ им. Гельмгольца МЗ РФ;

Balatskaya Natalya Vladimirovna – PhD in Biological sciences, Head of the Department of Immunology and Virology Helmholtz Scientific Medical Research Center for Ophthalmic Diseases;

Куликова Ирина Геннадиевна – биолог вирусологической микробиологической лаборатории отдела иммунологии и вирусологии ФГБУ НМИЦ ГБ им. Гельмгольца МЗ РФ;

Kulikova Irina Gennadievna – biologist of the Department of Immunology and Virology Helmholtz Scientific Medical Research Center for Ophthalmic Diseases;

Саакаян Светлана Владимировна – чл.-корр. РАН, д.м.н., профессор, начальник отдела офтальмоонкологии и радиологии ФГБУ НМИЦ ГБ им. Гельмгольца МЗ РФ;

Saakayan Svetlana Vladimirovna – Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Grand PhD in Medical sciences, Professor, Head of the Department of Ophthalmooncology and Radiology Helmholtz Scientific Medical Research Center for Ophthalmic Diseases;

Свирина Ирина Витальевна – аспирант отдела офтальмоонкологии и радиологии ФГБУ НМИЦ ГБ им. Гельмгольца МЗ РФ;

Svirina Irina Vitalievna – PhD student of the Department of Ophthalmooncology and Radiology Helmholtz Scientific Medical Research Center for Ophthalmic Diseases;

Андрюшин Александр Евгеньевич – научный сотрудник отдела иммунологии и вирусологии ФГБУ НМИЦ ГБ им. Гельмгольца МЗ РФ;

Andryushin Alexander Evgenievich – researcher of the Department of Immunology and Virology Helmholtz Scientific Medical Research Center for Ophthalmic Diseases;

Мякошина Елена Борисовна – д.м.н., научный сотрудник отдела офтальмоонкологии и радиологии ФГБУ НМИЦ ГБ им. Гельмгольца МЗ РФ;

Myakoshina Elena Borisovna – Grand PhD in Medical sciences, senior researcher of the Department of Ophthalmooncology and Radiology Helmholtz Scientific Medical Research Center for Ophthalmic Diseases.

Блок 3. Метаданные статьи

ИНФИЦИРОВАННОСТЬ ОПУХОЛИ ВИРУСАМИ ГЕРПЕСА ЧЕЛОВЕКА И
ОСОБЕННОСТИ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ЛИМФОЦИТОВ
ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С УВЕАЛЬНОЙ
МЕЛАНОМОЙ

TUMOR INFECTION WITH HUMAN HERPES VIRUSES AND
PARTICULARITIES OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTE
SUBPOPULATION COMPOSITION IN PATIENTS WITH UVEAL
MELANOMA

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

ВГЧ И СУБПОПУЛЯЦИИ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ УВЕАЛЬНОЙ МЕЛАНОМЕ
HHV AND LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN UVEAL MELANOMA

Ключевые слова: вирусы группы герпеса, увеальная меланома, полимеразная
цепная реакция, субпопуляции лимфоцитов, кровь, ткань опухоли.

Keywords: herpes group viruses, uveal melanoma, polymerase chain reaction,
lymphocyte subpopulations, blood, tumor tissue.

Оригинальные статьи.

Количество страниц текста – 11, количество таблиц – 1, количество рисунков
– 1.

24.05.2024

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет адрес (URL) цитируемой статьи или DOI
1	Балацкая Н.В., Саакян С.В., Мякошина Е.Б., Куликова И.Г., Кричевская Г.И. Особенности эффекторных субпопуляций лимфоцитов у пациентов с увеальной меланомой при активации и хроническом течении герпесвирусной инфекции. <i>Инфекция и иммунитет.</i> 2021; 11(6): 1123–30.	Balatskaya N.V., Saakyan S.V., Myakoshina E.B., Kulikova I.G., Krichevskaya G.I. Features of effector lymphocyte subsets in patients with uveal melanoma in recurrent and chronic herpesvirus infection // Russian Journal of Infection and Immunity = <i>Infektsiya i immunitet</i> , 2021, vol. 11, no. 6, pp. 1123–1130	doi: 10.15789/2220-7619-FOE-1596

2	Давыдова Ю.О., Капранов Н.М., Никифорова К.А. и др. Субпопуляционный состав Т-хелперов у больных острыми лейкозами после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток. Клиническая онкогематология. 2023;16(2):137–45.	Davydova YuO, Kapranov NM, Nikiforova KA, et al. T-Helper Subpopulations in Acute Leukemia Patients After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Clinical oncohematology. 2023;16(2):137–45	doi: 10.21320/2500-2139-2023-16-2-137-145
3	Каприн А.Д. и др. Злокачественные новообразования в России в 2022 году (заболеваемость и смертность) – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал	Каприн А.Д. et al. Malignant neoplasms in Russia in 2022 (morbidity and mortality) - М.: МНИОИ им. П.А. Herzen - branch of the Federal State Budgetary Institution "National Medical Research Center of Radiology" of the Ministry of Health of Russia, 2023. 275 p.	https://oncology.ru/service/statistics/malignant_tumors/2022.pdf

	ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2023. 275 с.		
4	Саакян С.В., Мякошина Е.Б., Кричевская Г.И., Слепова О.С., Пантелеева О.Г., Андрюшин А.Е., Хорошилова И.П., Захарова Г.П. Тестирование пациентов с увеальной меланомой на герпесвирусные инфекции. <i>Vopr Virusol.</i> 2016, 28 декабря;61(6):284-287.	Saakyan S.V., Myakoshina E.B., Krichevskaya G.I., Slepova O.S., Panteleeva O.G., Andryushin A.E., et al. Testing patients with uveal melanoma for herpesvirus infections. <i>Voprosy virusologii.</i> 2016; 61(6): 284–7.	doi: 10.18821/0507-4088-2016-61- 6-284-287.
5	Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS,	-	-

	Roizman B, Whitley R, Yamanishi K, editors. Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. Cambridge: Cambridge University Press; 2007		
6	Ban Y. , Okamoto M., Ogata N. Case of primary intraocular lymphoproliferative disorder caused by Epstein-Barr virus. <i>BMC Ophthalmol.</i> 2020; 20(1): 306.	-	doi: 10.1186/s12886-020-01583-x
7	Caraballo Cortés K, Osuch S, Perlejewski K, Pawełczyk A, Kaźmierczak J, Janiak M,	-	doi: 10.1111/jvh.13108

	Jabłońska J, Nazzal K, Stelmaszczyk-Emmel A, Berak H, Bukowska-Ośko I, Paciorek M, Laskus T, Radkowski M. Expression of programmed cell death protein 1 and T-cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule-3 on peripheral blood CD4+CD8+ double positive T cells in patients with chronic hepatitis C virus infection and in subjects who spontaneously cleared the virus. J Viral Hepat. 2019 Aug;26(8):942-950.		
8	Chatterjee K, Das P, Chattopadhyay NR, Mal S,	-	doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02624

	Choudhuri T. The interplay between Epstein-Bar virus (EBV) with the p53 and its homologs during EBV associated malignancies. Heliyon. 2019 Nov 14;5(11): e02624.		
9	Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. Immunity. 2013 Jul 25; 39(1):1-10	-	doi: 10.1016/j.immuni.2013.07.012
10	Chijioke O, Müller A, Feederle R, Barros MH, Krieg C, Emmel V, Marcenaro E, Leung CS, Antsiferova O, Landtwing V, Bossart W, Moretta A, Hassan R, Boyman O, Niedobitek G,	-	doi: 10.1016/j.celrep.2013.11.041

	Delecluse HJ, Capaul R, Münz C. Human natural killer cells prevent infectious mononucleosis features by targeting lytic Epstein-Barr virus infection. Cell Rep. 2013 Dec 26;5(6):1489-98		
11	Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. Trends Immunol. 2001 Nov;22(11):633-40.	-	doi: 10.1016/s1471-4906(01)02060-9
12	Dunmire SK, Verghese PS, Balfour HH Jr. Primary Epstein-Barr virus infection. J Clin Virol. 2018 May; 102:84-92.	-	doi: 10.1016/j.jcv.2018.03.001

13	Güvenç M.G. , Midilli K. , Ozdoğan A. , Inci E. , Tahamiler R. , Enver O. Detection of HHV-8 and HPV in laryngeal carcinoma. <i>Auris Nasus Larynx</i> . 2008; 35(3): 357–62.	-	doi: 10.1016/j.anl.2007.08.006
14	Huang XQ, Mitchell MS, Liggett PE, Murphree AL, Kan-Mitchell J. Non-fastidious, melanoma-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes from choroidal melanoma patients. <i>Cancer Immunol Immunother</i> . 1994 Jun;38(6):399-405	-	doi: 10.1007/BF01517210.
15	Huang D, Song SJ, Wu ZZ, Wu W, Cui XY, Chen JN, Zeng MS,	-	doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2706

	Su SC. Epstein-Barr Virus-Induced VEGF and GM-CSF Drive Nasopharyngeal Carcinoma Metastasis via Recruitment and Activation of Macrophages. <i>Cancer Res.</i> 2017 Jul 1;77(13):3591-3604		
16	Jager MJ, Niederkorn JY, Ksander BR eds. <i>Uveal Melanoma: A Model for Exploring Fundamental Cancer Biology</i> . London: Taylor & Francis; 2004. 259 p.	-	-
17	Jones K, Rivera C, Sgadari C, Franklin J, Max EE, Bhatia K, Tosato G. Infection of human	-	doi: 10.1084/jem.182.5.1213

	endothelial cells with Epstein-Barr virus. J Exp Med. 1995 Nov 1;182(5):1213-21.		
18	Kan-Mitchell J, Liggett PE, Harel W, Steinman L, Nitta T, Oksenberg JR, Posner MR, Mitchell MS. Lymphocytes cytotoxic to uveal and skin melanoma cells from peripheral blood of ocular melanoma patients. Cancer Immunol Immunother. 1991;33(5):333-40.	-	doi: 10.1007/BF01756599
19	Kim D.H., Chang M.S., Yoon C.J., Middeldorp J.M., Martinez O.M., Byeon S.J., et al. Epstein-Barr virus BARF1-induced	-	doi: 10.18632/oncotarget.10511

	NFκB/miR-146a/SMAD4 alterations in stomach cancer cells. <i>Oncotarget</i> . 2016; 7(50): 82213–27.		
20	Laichalk LL, Thorley-Lawson DA. Terminal differentiation into plasma cells initiates the replicative cycle of Epstein-Barr virus in vivo. <i>J Virol</i> . 2005 Jan;79(2):1296-307.	-	doi: 10.1128/JVI.79.2.1296-1307.2005
21	Leen A, Meij P, Redchenko I, Middeldorp J, Bloemena E, Rickinson A, Blake N. Differential immunogenicity of Epstein-Barr virus latent-cycle proteins for human CD4(+) T-	-	doi: 10.1128/jvi.75.18.8649-8659.2001

	helper 1 responses. J Virol. 2001 Sep;75(18):8649-59		
22	Li DK, Chen XR, Wang LN, Wang JH, Li JK, Zhou ZY, Li X, Cai LB, Zhong SS, Zhang JJ, Zeng YM, Zhang QB, Fu XY, Lyu XM, Li MY, Huang ZX, Yao KT. Exosomal HMGA2 protein from EBV-positive NPC cells destroys vascular endothelial barriers and induces endothelial-to-mesenchymal transition to promote metastasis. Cancer Gene Ther. 2022 Oct;29(10):1439-1451	-	doi: 10.1038/s41417-022-00453-6
23	López-Montañés M, Alari-Pahissa E, Sintés J, Martínez-	-	doi: 10.4049/jimmunol.1601574

	Rodríguez JE, Muntasell A, López-Botet M. Antibody-Dependent NK Cell Activation Differentially Targets EBV-Infected Cells in Lytic Cycle and Bystander B Lymphocytes Bound to Viral Antigen-Containing Particles. J Immunol. 2017 Jul 15;199(2):656-665.		
24	Ma J, Usui Y, Takeuchi M, Okunuki Y, Kezuka T, Zhang L, Mizota A, Goto H. Human uveal melanoma cells inhibit the immunostimulatory function of dendritic cells. Exp Eye Res. 2010 Oct;91(4):491-9	-	doi: 10.1016/j.exer.2010.06.025

25	Millan MT, Natkunam Y, Clarke-Katzenberg R, Desai D, Prapong W, So SK, Esquivel CO, Sibley R, Ferran C, Martinez OM. Epstein-Barr virus infection is associated with endothelial Bcl-2 expression in transplant liver allografts. Transplantation. 2002 Feb 15;73(3):465-9.	-	doi: 10.1097/00007890-200202150-00023
26	Mittra R.A. , Pulido J.S. , Hanson G.A. , Kajdacsy-Balla A. , Brummitt C.F. Primary ocular Epstein-Barr virus-associated non-Hodgkin's lymphoma in a patient with AIDS: a	-	doi: 10.1097/00006982-199901000-00007

	clinicopathologic report. <i>Retina</i> . 1999; 19(1): 45–50.		
27	Münz C, Bickham KL, Subklewe M, Tsang ML, Chahroudi A, Kurilla MG, Zhang D, O'Donnell M, Steinman RM. Human CD4(+) T lymphocytes consistently respond to the latent Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA1. <i>J Exp Med</i> . 2000 May 15;191(10):1649-60	-	doi: 10.1084/jem.191.10.1649.
28	Murray P.G. , Young L.S. An etiological role for the Epstein-Barr virus in the pathogenesis of	-	doi: 10.1182/blood.2019000568

	classical Hodgkin lymphoma. <i>Blood</i> . 2019; 134(7): 591–6.		
29	Mygatt G.J. , Singhal A. , Sukumar G. , Dalgard C.L. , Kaleeba J.A.R. Oncogenic herpesvirus HHV-8 promotes androgen-independent prostate cancer growth. <i>Cancer Res</i> . 2013; 73(18): 5695–708.	-	doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-4196
30	Orange JS. Natural killer cell deficiency. <i>J Allergy Clin Immunol</i> . 2013 Sep;132(3):515- 525	-	doi: 10.1016/j.jaci.2013.07.020
31	Paludan C, Schmid D, Landthaler M, Vockerodt M, Kube D, Tuschl T, Münz C.	-	doi: 10.1126/science.1104904

	Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. Science. 2005 Jan 28;307(5709):593-6		
32	Parrot T, Oger R, Allard M, Desfrançois J, Raingard de la Blétière D, Coutolleau A, Preisser L, Khammari A, Dréno B, Delneste Y, Guardiola P, Fradin D, Gervois N. Transcriptomic features of tumour-infiltrating CD4 ^{low} CD8 ^{high} double positive $\alpha\beta$ T cells in melanoma. Sci Rep. 2020 Apr 3;10(1):5900	-	doi: 10.1038/s41598-020-62664-x

33	Quandt D, Rothe K, Scholz R, Baerwald CW, Wagner U. Peripheral CD4CD8 double positive T cells with a distinct helper cytokine profile are increased in rheumatoid arthritis. PLoS One. 2014 Mar 25;9(3): e93293.	-	doi: 10.1371/journal.pone.0093293
34	Rahemtullah A, Reichard KK, Preffer FI, Harris NL, Hasserjian RP. A double-positive CD4+CD8+ T-cell population is commonly found in nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. <i>Am. J. Clin. Pathol.</i> 2006; 126:805–814.	-	doi: 10.1309/Y8KD32QGRYFN1X QX

35	Ran GH, Lin YQ, Tian L, Zhang T, Yan DM, Yu JH, Deng YC. Natural killer cell homing and trafficking in tissues and tumors: from biology to application. <i>Signal Transduct Target Ther.</i> 2022 Jun 29;7(1):205	-	doi: 10.1038/s41392-022-01058-z
36	Vaivanijkul J., Boonsiri K. Conjunctival tumor caused by Epstein-Barr virus-related infectious mononucleosis: Case report and review of literature. <i>Orbit.</i> 2017; 36(2): 91–4.	-	doi: 10.1080/01676830.2017.1279659
37	Wang ZK, Yang B, Liu H, Hu Y, Yang JL, Wu LL, Zhou ZH, Jiao SC. Regulatory T cells increase	-	doi: 10.1007/s00262-011-1158-4

	in breast cancer and in stage IV breast cancer. <i>Cancer Immunol Immunother.</i> 2012 Jun;61(6):911-6		
38	Weiss R. A. , Whitby D. , Talbot S. , Kellam P. , Boshoff C. Human herpesvirus type 8 and Kaposi's sarcoma. <i>J. Natl. Cancer Inst. Monogr.</i> 1998; (23): 51–4.	-	-
39	Wong Y, Meehan MT, Burrows SR, Doolan DL, Miles JJ. Estimating the global burden of Epstein-Barr virus-related cancers. <i>J Cancer Res Clin Oncol.</i> 2022 Jan;148(1):31-46.	-	doi: 10.1007/s00432-021-03824-y

