

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

Е.В. Светлова, Н.В. Балацкая, И.Г. Куликова, С.В. Саакян, И.В. Свирина,
А.Е. Андрияшин, Е.Б. Мякошина

ФГБУ НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца, Москва, Россия

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 Varicella Zoster (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: I группа — HHV+ и II группа — 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, ПЦР, субпопуляции лимфоцитов, кровь, ткань опухоли.

Адрес для переписки:

Светлова Елена Викторовна
105062, Россия, Москва, ул. Садовая-Черногрозская, 14/19,
ФГБУ НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца.
Тел.: 8 916 463-12-96. E-mail: qr888@ya.ru

Contacts:

Elena V. Svetlova
105062, Russian Federation, Moscow, Sadovaya-
Chernogryazskaya str., 14/19, Moscow Helmholtz Research
Centre of Eye Diseases.
Phone: +7 916 463-12-96. E-mail: qr888@ya.ru

Для цитирования:

Светлова Е.В., Балацкая Н.В., Куликова И.Г., Саакян С.В., Свирина И.В.,
Андрияшин А.Е., Мякошина Е.Б. Инфицированность опухоли вирусами
герпеса человека и особенности субпопуляционного состава
лимфоцитов периферической крови у пациентов с увеальной
меланомой // Инфекция и иммунитет. 2025. Т. 15, № 1. С. 79–87.
doi: 10.15789/2220-7619-TIW-17669

Citation:

Svetlova E.V., Balatskaya N.V., Kulikova I.G., Saakyan S.V., Svirina I.V.,
Andryushin A.E., Myakoshina E.B. Tumor infection with human herpes viruses
and features of peripheral blood lymphocyte subset composition in patients
with uveal melanoma // Russian Journal of Infection and Immunity =
Infektsiya i immunitet, 2025, vol. 15, no. 1, pp. 79–87. doi: 10.15789/2220-
7619-TIW-17669

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

Svetlova E.V., Balatskaya N.V., Kulikova I.G., Saakyan S.V., Svirina I.V., Andryushin A.E., Myakoshina E.B.

Moscow Helmholtz Research Centre of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

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. The aim of the study was 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" (Russia) 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.

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

Введение

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

Так, роль вируса Эпштейна-Барр (EBV) в развитии лимфом Беркитта, Ходжкина, НК-/Т-клеточной лимфомы назального типа, а также рака желудка и носоглотки подтверждена многочисленными исследованиями [18, 27]. Показано, что вирус герпеса человека 8 типа (HHV-8) является причиной ряда лимфопролиферативных заболеваний, саркомы Капоши, карциномы гортани и аденокарциномы (АК) предстательной железы [12, 28, 38]. Эффекты HHV α- и β-подгрупп (Herpes simplex virus (HSV-1, HSV-2), цитомегаловируса (CMV), вирус герпеса человека 6 типа (HHV-6) и др.), связанные с малигнизацией, продолжают активно изучаться.

Роль HHV в развитии глазной онкопатологии в настоящее время остается одним из малоизученных вопросов. В доступной литературе найдены единичные публикации, в которых приведены описания опухолей конъюнктивы и первичных витреотинальных неходжкин-

ских лимфом, ассоциированных с EBV [5, 25, 36]. Случай обнаружения геномов CMV и EBV в сочетании с *Chlamydia trachomatis* в материале пациента с увеальной меланомой представлен также в работе С.В. Саакян и соавт. [4].

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

Несмотря на то что в настоящее время разработаны высокотехнологичные современные методы лечения УМ, более чем у половины пациентов в короткие сроки развивается метастатическая болезнь, которая значительно ухудшает витальный прогноз [35].

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

Действительно, в 1990-х гг. группами Kan-Mitchell J. с соавт. и Huang X.Q. с соавт. были обнаружены изменения количества циркулирующих цитотоксических лимфоцитов крови при меланоме кожи и увеального тракта [14, 17].

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

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

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

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

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

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

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

Диагноз ставился на основании данных стандартных и специализированных офтальмологических методов обследования. Средний уровень проминенции опухоли (по данным эхографии) составил $6,1 \pm 3,0$ мм, а диаметр основания — $15,7 \pm 2,1$ мм. Всем пациентам проведена энуклеация пораженного глаза с последующим патогистологическим исследованием. У 98 па-

циентов диагностирована УМ (99%), в одном случае морфология опухоли соответствовала аденокарциноме пигментного эпителия сетчатки (АПЭС).

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

В биоматериале опухоли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) (термоциклер «CFX96», Bio-Rad Laboratories, Inc., США) проводилось определение генома HSV-1,2, VZV, CMV, EBV, вирусов HHV-6, HHV-8 согласно инструкциям фирмы-производителя. Для постановки ПЦР-РВ использовали коммерческие тест-системы ЗАО «Вектор-Бест» (Россия).

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

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

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

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

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

Результаты

ДНК HHV обнаружена в материале опухоли 11,3% пациентов (n = 11): при этом наиболее часто, в 72,7% случаев (n = 8), определялся геном EBV, существенно реже, в 18,2% проб (2 человека), — 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: I группа — HHV+ и II группа — HHV–.

Результаты исследования крови пациентов основных групп показали, что средние значения абсолютного количества лимфоцитов (CD45⁺) были примерно одинаковыми (2,1±0,08 × 10⁹/л HHV–; 2,2±0,2 × 10⁹/л HHV+) (табл.).

При анализе средних значений общей субпопуляции Т-клеток (CD3⁺) обнаружили повышение как относительного до 77,64±1,18%, так и абсолютного (1,7±0,15 × 10⁹/л) ее содержания у пациентов HHV+ в сравнении как с контрольной группой доноров без офтальмопатологии (73,1±0,87%, $p < 0,05$; 1,51±0,08 × 10⁹/л), так и с группой без ДНК возбудителя в ткани опухоли (71,18±0,86%, $p < 0,05$; 1,51±0,07 × 10⁹/л).

Повышение CD3⁺ лимфоцитов в HHV+ группе было обусловлено, главным образом, подъемом абсолютного (1,12±0,13 × 10⁹/л) и относительного (49,5±2,06%) количества Т-хелперов/индукторов (CD3⁺CD4⁺), отличавшим ее как от контроля (0,97±0,06 × 10⁹/л; 45,7±1,19%), так и от группы пациентов с неинфицированными

ми опухолями (0,97±0,05 × 10⁹/л; 45,01±0,98%). Содержание цитотоксических лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺) у пациентов обеих групп было практически одинаковым (0,6±0,06 × 10⁹/л; 0,6±0,03 × 10⁹/л) и незначительно отличалось от такового у контрольной группы (0,52±0,03 × 10⁹/л), это касается как абсолютных, так и относительных значений.

Индивидуальный анализ частоты сдвигов от нормы показал, что у 36,4% пациентов с инфицированными опухолями относительное количество Т-клеток (CD3⁺) было выше нормальных значений, тогда как у пациентов с HHV–опухолями такие изменения в содержании указанной субпопуляции наблюдались в 3 раза реже (11,4%). Данная тенденция сохранялась по отношению к Т-хелперам/индукторам и цитотоксическим лимфоцитам (рис.).

В крови пациентов I группы (с присутствием ДНК вирусов в ткани опухоли) наиболее часто выявлялся дисбаланс основных регуляторных популяций хелперов-индукторов/цитотоксических лимфоцитов, который заключался в увеличении соотношения CD4⁺/CD8⁺. Так, если в группе HHV– только в 15,9% случаев отме-

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

Table. 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 Control (n = 33)	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 ⁺	× 10 ⁹ /л	2,06±0,11	2,2±0,2	2,1±0,08
Т-лимфоциты общая популяция CD3 ⁺ T lymphocytes (total population) CD3 ⁺	%	73,1±0,87	77,64±1,18*	71,18±0,86
	× 10 ⁹ /л	1,51±0,08	1,7±0,15	1,51±0,066
Т-хелперы CD3 ⁺ CD4 ⁺ T helpers CD3 ⁺ CD4 ⁺	%	45,7±1,19	49,5±2,06	45,01±0,98
	× 10 ⁹ /л	0,97±0,06	1,12±0,13	0,97±0,05
Т-цитотоксические CD3 ⁺ CD8 ⁺ Cytotoxic T lymphocytes CD3 ⁺ CD8 ⁺	%	25,6±1,04	28,37±2,5	26,7±0,83
	× 10 ⁹ /л	0,52±0,03	0,6±0,06	0,6±0,03
Т-«дубль-позитивные» лимфоциты CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ “Double positive” lymphocytes CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺	%	0,54±0,31	1,19±0,23*	1,25±0,15*
	× 10 ⁹ /л	0,009±0,007	0,026±0,005*	0,027±0,004*
В-лимфоциты CD19 ⁺ B lymphocytes CD19 ⁺	%	12,8±0,63	12,4±1,32	13,3±0,65
	× 10 ⁹ /л	0,24±0,02	0,29±0,05	0,29±0,02
Натуральные киллеры CD16 ⁺ CD56 ⁺ Natural killers CD16 ⁺ CD56 ⁺	%	14±0,87	9,49±1,33*	15,06±0,8
	× 10 ⁹ /л	0,29±0,03	0,2±0,03	0,29±0,015
Отношение CD4 ⁺ /CD8 ⁺ CD4 ⁺ /CD8 ⁺ ratio		1,95±0,12	1,95±0,25	1,84±0,07

Примечание. 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 ($p < 0.05$).

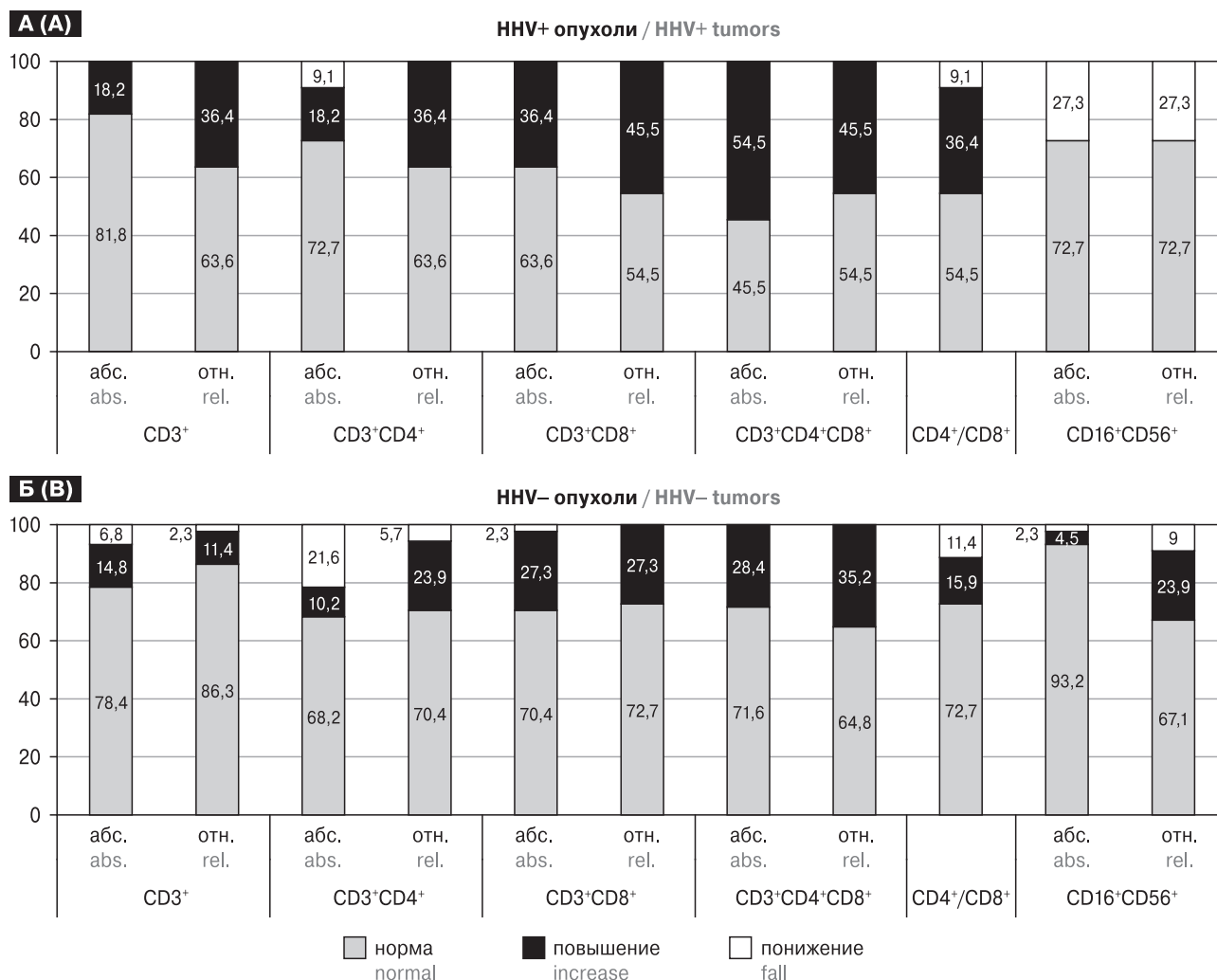


Рисунок. Частота случаев (%) сдвигов от нормы (здоровых доноров) в (суб)популяционном составе лимфоцитов крови (относительное и абсолютное количество) и клеточного соотношения CD4⁺/CD8⁺ у пациентов с HHV+ (А) и HHV- (Б) тканью УМ

Figure. 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+ (A) and HHV- (B) uveal melanoma tissue

чалось повышение CD4⁺/CD8⁺ относительно нормы, то в группе HHV+ данные сдвиги выявлялись в 2,3 раза чаще (36,4%). Относительное и абсолютное количество «дубль-позитивных» Т-клеток (CD3⁺CD4⁺CD8⁺) было повышено у пациентов обеих групп ($0,026 \pm 0,005 \times 10^9/\text{л}$, $p < 0,05$; $0,027 \pm 0,004 \times 10^9/\text{л}$, $p < 0,05$) в сравнении с группой контроля ($0,009 \pm 0,007 \times 10^9/\text{л}$), что подтверждает ранее опубликованные данные и согласуется с исследованиями других ученых. При этом индивидуальный анализ частоты сдвигов от нормы показал, что в группе HHV+ практически в 2 раза чаще (54,5%) встречаются пациенты с повышенными значениями абсолютного количества «дубль-позитивных» лимфоцитов, чем в группе HHV- (28,4%). Увеличение количества CD3⁺CD4⁺CD8⁺ клеток в крови онкологических пациентов, а также больных аутоиммунными и инфекционными заболеваниями описано в целом ряде работ [6, 32, 33].

Обращает внимание достоверное снижение относительного количества NK-клеток ($10 \pm 1,3\%$) у пациентов подгруппы HHV+ по сравнению как с контрольной ($14 \pm 0,87\%$, $p < 0,05$), так и с группой пациентов с HHV- опухолями ($15 \pm 0,8$, $p < 0,05$). При индивидуальном анализе частоты сдвигов от нормы у 25% пациентов с инфицированными опухолями абсолютное и относительное количество NK-клеток также было снижено, тогда как в крови у пациентов с HHV- опухолями, наоборот, отмечалось повышение относительного (23,9%) и абсолютного (4,5%) содержания клеток указанной популяции.

Обсуждение

По результатам нашего исследования инфицированность опухолей увеального тракта составила 11,3%, при этом практически в 73%

из них была обнаружена ДНК EBV. В течение жизни EBV сохраняется в эпителиальных клетках и В-лимфоцитах, реализуя два основных сценария течения инфекции — латентную и литическую [11]. В-лимфоциты поддерживают вирус в латентной форме, экспрессируя шесть ядерных антигенов (EBNA) и два латентных мембранных белка (LMP), что обеспечивает его уклонение от системы иммунологического надзора. В латентно инфицированных ВЭБ-положительных клетках вирус может реактивироваться и перейти к продуктивной фазе жизнедеятельности, называемой литическим циклом. Во время литической репликации EBV поочередно экспрессирует до 80 генов, что приводит к образованию новых вирусных частиц, гибели инфицированной клетки и распространению вируса по организму [19].

В литературе описаны исследования, подтверждающие способность EBV инфицировать клетки эндотелия сосудов и активировать внутриклеточные белки-ингибиторы апоптоза [16, 24]. Бесконтрольный рост сосудов опухоли, поддерживаемый в том числе EBV, способствует ее питанию и росту, а также повышает риск метастазирования за счет увеличения проницаемости сосудистой стенки. Роль EBV в развитии метастатической болезни при УМ еще предстоит изучить, однако ряд уже проведенных исследований указывает на то, что вирус способствует метастазированию других опухолей, например, назофарингеальной карциномы [13, 21]. Два паттерна развития инфекции EBV обуславливают различные варианты взаимодействия между вирусом и клеткой, а также локальный и системный иммунный ответ. Ослабление контроля со стороны иммунной системы приводит к трансформации зараженной клетки, в том числе онкогенного характера. Считается, что EBV является причиной 1% (до 200 000 случаев ежегодно) злокачественных новообразований человека [39]. По данным литературы, до 90% населения земного шара инфицировано EBV, однако развитие онкологического процесса, ассоциированного с вирусом, наблюдается лишь в исключительных случаях [15]. Очевидным фактором, объясняющим столь редкое распространение онкологических заболеваний, вызванных EBV, у здоровых инфицированных людей, является наличие мощного иммунного ответа на вирус, в частности, опосредованного Т-клеточным звеном иммунитета.

Реакция иммунной системы на трансформированную клетку и своевременное ее уничтожение лежит в основе противоопухолевого иммунного ответа. Распознавание генетически измененной клетки запускает сигнальный каскад в лимфоцитах, сопровождающийся выработкой цитокинов, позволяющих избежать

противоопухолевой толерантности иммунной системы. Дендритные клетки захватывают белки — продукты онкогенеза и предоставляют их Т-лимфоцитам на молекулах гистосовместимости МНС I и МНС II, активируя ответ эффекторных Т-клеток против канцер-специфических антигенов [8]. В литературе описаны исследования, указывающие на способность клеток УМ блокировать активирующую функцию дендритных клеток, в частности, продукцию ими цитокинов и активацию Т-лимфоцитов [23].

Онкологическая трансформация, запущенная EBV, подавляет противоопухолевые механизмы клетки, так как экспрессия латентных генов вируса сопряжена с перестройками в матричной РНК клетки-хозяина и препятствует синтезу защитных белков (p53, p63, p73) [7]. В данных условиях адекватный системный противоопухолевый иммунный ответ в случае вирус-положительных опухолей становится практически единственным способом защитить организм от бесконтрольного роста трансформированных клеток. В связи с этим изучение субпопуляционного состава лимфоцитов и их роли в элиминации опухолевых клеток актуально для разных видов опухолей, особенно инфицированных различными возбудителями. В публикациях отечественных и зарубежных авторов описано повышение $CD3^+CD4^+$ лимфоцитов (Т-хелперов) у пациентов с различными видами опухолей [2, 37]. Т-хелперы/индукторы играют важную роль в иммунной защите и борьбе с вирусными инфекциями и раком, они участвуют в передаче цитокиновых сигналов и создании оптимальных условий для правильного функционирования других иммунных клеток, таких как макрофаги, В-клетки и цитотоксические Т-лимфоциты. В нашем исследовании увеличение общего количества Т-лимфоцитов в 3 раза чаще встречалось у пациентов с HHV+ опухолью, при этом повышение средних значений общей популяции происходило за счет увеличения $CD3^+CD4^+$ клеток. Известно, что активированные $CD4^+$ клетки играют важную роль в контроле EBV, особенно в клетках с латентностью I типа, где вирус синтезирует белок EBNA1, обеспечивающий устойчивость вирусной эписомы в опухолевых клетках [20, 26]. Более того, литическая активность EBNA1-специфичных $CD4^+$ Т-клеток против трансформированных вирусом опухолевых клеток наблюдалась при всех EBV-опосредованных злокачественных новообразованиях, включая лимфому Беркитта [30].

Анализ результатов исследования показал повышение количества средних значений «дубль-позитивных» Т-лимфоцитов в обеих группах. Ранее сдвиги в этой популяции были отмечены у пациентов с различными злокаче-

ственными новообразованиями, в том числе с меланомой кожи [31]. Однако накопление минорной популяции, в случае кожной меланомы, обнаруживали именно в инфильтрате опухоли, тогда как в периферической крови увеличение количества $CD3^+CD4^+CD8^+$ не наблюдалось. Наши результаты согласуются также с ранее полученными данными при УМ больших размеров [1]. Натуральные киллеры (НК-клетки, $CD16^+CD56^+$) относятся к эффекторным клеткам врожденного иммунитета и составляют от 5% до 15% от общей популяции циркулирующих лимфоцитов. НК-лимфоциты выполняют множество биологических функций, обладают прямой цитотоксичностью в отношении инфицированных вирусом и онкотрансформированных клеток [10]. Увеличение количества натуральных киллеров, как и их миграция в опухолевый инфильтрат, при онкологическом процессе закономерно и неоднократно описано [34]. В нашей работе обнаружено снижение относительного количества НК-клеток ($CD16^+CD56^+$) в периферической крови у пациентов с ННВ+ опухолями, тогда как у остальных пациентов отмечалось нормальное или увеличенное их количество. Известно, что прогрессирование EBV инфекции связано, в том числе, с недостаточным количеством натуральных киллеров или с угнетением их функции [9, 29]. Более того, вирус, ограничивая экспрессию литических генов, защищает инфицированную клетку от НК-опосредованного уничтожения за счет повышенной устойчивости к апопто-

зу [22]. Не исключено, что снижение количества НК-клеток в периферической крови связано с их прямой цитотоксической функцией и миграцией в очаг роста опухоли и локального размножения бактерий и вирусов, в том числе EBV.

Заключение

Анализ результатов исследования показал, что в 70% случаев в инфицированном опухолевом материале (ННВ+) при УМ выявлялся генотип EBV.

У пациентов с ННВ+ опухолями обнаружены характерные качественные и количественные сдвиги в составе лимфоцитов периферической крови, которые затрагивали преимущественно популяции Т- и НК-клеток:

а) повышение относительного содержания популяции $CD3^+$ лимфоцитов, обеспеченное, главным образом, увеличением доли Т-хелперов и закономерный рост соотношения $CD4^+/CD8^+$, указывают на тесные патогенетические взаимосвязи Т-клеточного звена иммунитета с функционированием вирус-ассоциированной опухоли;

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

Список литературы/References

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 // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 6. С. 1123–1130. [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. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2021, vol. 11, no. 6, pp. 1123–1130. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-FOE-1596
2. Давыдова Ю.О., Капранов Н.М., Никифорова К.А., Каравая О.С., Камельских Д.В., Дроков М.Ю., Кузьмина Л.А., Гапонова Т.В., Гальцева И.В., Паровичникова Е.Н. Субпопуляционный состав Т-хелперов у больных острыми лейкозами после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток // Клиническая онкогематология. 2023. Т. 16, № 2. С. 137–145. [Davydova Yu.O., Kapranov N.M., Nikiforova K.A., Karavaeva O.S., Kamelskikh D.V., Drokov M.Yu., Kuzmina L.A., Gaponova T.V., Galtseva I.V., Parovichnikova E.N. T-helper subpopulations in acute leukemia patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology*, 2023, vol. 16, no. 2, pp. 137–145. (In Russ.)] doi: 10.21320/2500-2139-2023-16-2-137-145
3. Злокачественные новообразования в России в 2023 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2024. 276 с. [Malignant neoplasms in Russia in 2023 (morbidity and mortality). Eds.: A.D. Kaprin, V.V. Starinskii, A.O. Shakhzadova. Moscow: P.A. Herzen Moscow Research Institute of Oncology — branch of the National Medical Research Center of Radiology of the Ministry of Health of Russia, 2024. 276 p. (In Russ.)]
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. Обследование больных увеальной меланомой на наличие герпесвирусных инфекций // Вопросы вирусологии. 2016. Т. 61, № 6. С. 284–287. [Saakyan S.V., Myakoshina E.B., Krichevskaya G.I., Slepova O.S., Panteleeva O.G., Andryushin A.E., Khoroshilova I.P., Zakharova G.P. Testing patients with uveal melanoma for herpesvirus infections. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2016, vol. 61, no. 6, pp. 284–287. (In Russ.)] doi: 10.18821/0507-4088-2016-61-6-284-287
5. Human herpesviruses: biology, therapy, and immunoprophylaxis. Eds.: Arvin A., Campadelli-Fiume G., Mocarski E., Moore P.S., Roizman B., Whitley R., Yamanishi K. Cambridge: Cambridge University Press, 2007.

6. Ban Y., Okamoto M., Ogata N. Case of primary intraocular lymphoproliferative disorder caused by Epstein–Barr virus. *BMC Ophthalmol.*, 2020, vol. 20, no. 1: 306. doi: 10.1186/s12886-020-01583-x
7. Caraballo Cortés K., Osuch S., Perlejewski K., Pawelczyk A., Kaźmierczak J., Janiak M., Jabłońska J., Nazzal K., Stelmasczyk-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, vol. 26, no. 8, pp. 942–950. doi: 10.1111/jvh.13108
8. Chatterjee K., Das P., Chattopadhyay N.R., Mal S., Choudhuri T. The interplay between Epstein-Barr virus (EBV) with the p53 and its homologs during EBV associated malignancies. *Heliyon.*, 2019, vol. 5, no. 11: e02624. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02624
9. Chen D.S., Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*, 2013, vol. 39, no. 1, pp. 1–10. doi: 10.1016/j.immuni.2013.07.012
10. Chijioke O., Müller A., Feederle R., Barros M.H., Krieg C., Emmel V., Marcenaro E., Leung C.S., Antsiferova O., Landtwing V., Bossart W., Moretta A., Hassan R., Boyman O., Niedobitek G., Delecluse H.J., Capaul R., Münz C. Human natural killer cells prevent infectious mononucleosis features by targeting lytic Epstein–Barr virus infection. *Cell Rep.*, 2013, vol. 5, no. 6, pp. 1489–1498. doi: 10.1016/j.celrep.2013.11.041
11. Cooper M.A., Fehniger T.A., Caligiuri M.A. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.*, 2001, vol. 22, no. 11, pp. 633–640. doi: 10.1016/s1471-4906(01)02060-9
12. Dunmire S.K., Verghese P.S., Balfour H.H. Jr. Primary Epstein–Barr virus infection. *J. Clin Virol.*, 2018, no. 102, pp. 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. *Auris. Nasus. Larynx*, 2008, vol. 35, no. 3, pp. 357–362. doi: 10.1016/j.anl.2007.08.006
14. Huang X.Q., Mitchell M.S., Liggett P.E., Murphree A.L., Kan-Mitchell J. Non-fastidious, melanoma-specific CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes from choroidal melanoma patients. *Cancer Immunol. Immunother.*, 1994, vol. 38, no. 6, pp. 399–405. doi: 10.1007/BF01517210
15. Huang D., Song S.J., Wu Z.Z., Wu W., Cui X.Y., Chen J.N., Zeng M.S., Su S.C. Epstein–Barr virus-induced VEGF and GM-CSF drive nasopharyngeal carcinoma metastasis via recruitment and activation of macrophages. *Cancer Res.*, 2017, vol. 77, no. 13, pp. 3591–3604. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2706
16. Uveal melanoma: a model for exploring fundamental cancer biology. Eds.: Jager M.J., Niederkorn J.Y., Ksander B.R. London: Taylor & Francis, 2004. 259 p.
17. Jones K., Rivera C., Sgadari C., Franklin J., Max E.E., Bhatia K., Tosato G. Infection of human endothelial cells with Epstein–Barr virus. *J. Exp Med.*, 1995, vol. 182, no. 5, pp. 1213–1221. doi: 10.1084/jem.182.5.1213
18. Kan-Mitchell J., Liggett P.E., Harel W., Steinman L., Nitta T., Oksenberg J.R., Posner M.R., Mitchell M.S. Lymphocytes cytotoxic to uveal and skin melanoma cells from peripheral blood of ocular melanoma patients. *Cancer. Immunol. Immunother.*, 1991, vol. 33, no. 5, pp. 333–340. doi: 10.1007/BF01756599
19. Kim D.H., Chang M.S., Yoon C.J., Middeldorp J.M., Martinez O.M., Byeon S.J., Rha S.Y., Kim S.H., Kim Y.S., Woo J.H. Epstein–Barr virus BARF1-induced NFκB/miR-146a/SMAD4 alterations in stomach cancer cells. *Oncotarget.*, 2016, vol. 7, no. 50, pp. 82213–82227. doi: 10.18632/oncotarget.10511
20. Laichalk L.L., Thorley-Lawson D.A. Terminal differentiation into plasma cells initiates the replicative cycle of Epstein–Barr virus in vivo. *J. Virol.*, 2005, vol. 79, no. 2, pp. 1296–1307. 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-helper 1 responses. *J. Virol.*, 2001, vol. 75, no. 18, pp. 8649–8659. doi: 10.1128/jvi.75.18.8649-8659.2001
22. Li D.K., Chen X.R., Wang L.N., Wang J.H., Li J.K., Zhou Z.Y., Li X., Cai L.B., Zhong S.S., Zhang J.J., Zeng Y.M., Zhang Q.B., Fu X.Y., Lyu X.M., Li M.Y., Huang Z.X., Yao K.T. 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, vol. 29, no. 10, pp. 1439–1451. doi: 10.1038/s41417-022-00453-6
23. López-Montañés M., Alarí-Pahissa E., Sintes J., Martínez-Rodríguez J.E., 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, vol. 199, no. 2, pp. 656–665. doi: 10.4049/jimmunol.1601574
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, vol. 91, no. 4, pp. 491–499. doi: 10.1016/j.exer.2010.06.025
25. Millan M.T., Natkunam Y., Clarke-Katzenberg R., Desai D., Prapong W., So S.K., Esquivel C.O., Sibley R., Ferran C., Martinez O.M. Epstein–Barr virus infection is associated with endothelial Bcl-2 expression in transplant liver allografts. *Transplantation*, 2002, vol. 73, no. 3, pp. 465–469. 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 clinicopathologic report. *Retina*, 1999, vol. 19, no. 1, pp. 45–50. doi: 10.1097/00006982-199901000-00007
27. Münz C., Bickham K.L., Subklewe M., Tsang M.L., Chahroudi A., Kurilla M.G., Zhang D., O'Donnell M., Steinman R.M. Human CD4(+) T lymphocytes consistently respond to the latent Epstein–Barr virus nuclear antigen EBNA1. *J. Exp Med.*, 2000, vol. 191, no. 10, pp. 1649–1660. 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 classical Hodgkin lymphoma. *Blood*, 2019, vol. 134, no. 7, pp. 591–596. doi: 10.1182/blood.2019000568
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. *Cancer. Res.*, 2013, vol. 73, no. 18, pp. 5695–5708. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-4196
30. Orange J.S. Natural killer cell deficiency. *J. Allergy Clin Immunol.*, 2013, vol. 132, no. 3, pp. 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. Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science*, 2005, vol. 307, no. 5709, pp. 593–596. doi: 10.1126/science.1104904
32. Parrot T., Oger R., Allard M., Desfrancois J., Raingeard 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, vol. 10, no. 1: 5900 doi: 10.1038/s41598-020-62664-x
33. Quandt D., Rothe K., Scholz R., Baerwald C.W., Wagner U. Peripheral CD4CD8 double positive T cells with a distinct helper cytokine profile are increased in rheumatoid arthritis. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 3: e93293. doi: 10.1371/journal.pone.0093293
34. Rahemtullah A., Reichard K.K., Preffer F.I., Harris N.L., Hasserjian R.P. A double-positive CD4⁺CD8⁺ T-cell population is commonly found in nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. *Am. J. Clin. Pathol.* 2006, vol. 126, pp. 805–814. doi: 10.1309/Y8KD32QGRYFNIXQX
35. Ran G.H., Lin Y.Q., Tian L., Zhang T., Yan D.M., Yu J.H., Deng Y.C. Natural killer cell homing and trafficking in tissues and tumors: from biology to application. *Signal Transduct Target Ther.*, 2022, vol. 7, no. 1: 205 doi: 10.1038/s41392-022-01058-z
36. Vaivanjikul J., Boonsiri K. Conjunctival tumor caused by Epstein–Barr virus-related infectious mononucleosis: case report and review of literature. *Orbit*. 2017, vol. 36, no. 2, pp. 91–94. doi: 10.1080/01676830.2017.1279659
37. Wang Z.K., Yang B., Liu H., Hu Y., Yang J.L., Wu L.L., Zhou Z.H., Jiao S.C. Regulatory T cells increase in breast cancer and in stage IV breast cancer. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2012, vol. 61, no. 6, pp. 911–916. doi: 10.1007/s00262-011-1158-4
38. Weiss R.A., Whitby D., Talbot S., Kellam P., Boshoff C. Human herpesvirus type 8 and Kaposi's sarcoma. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 1998, no. 23, pp. 51–54.
39. Wong Y., Meehan M.T., Burrows S.R., Doolan D.L., Miles J.J. Estimating the global burden of Epstein–Barr virus-related cancers. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2022, vol. 148, no. 1, pp. 31–46. doi: 10.1007/s00432-021-03824-y

Авторы:

Светлова Е.В., врач-вирусолог вирусологической микробиологической лаборатории отдела иммунологии и вирусологии ФГБУ НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца, Москва, Россия;

Балацкая Н.В., к.б.н., ведущий научный сотрудник, начальник отдела иммунологии и вирусологии ФГБУ НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца, Москва, Россия;

Куликова И.Г., биолог вирусологической микробиологической лаборатории отдела иммунологии и вирусологии ФГБУ НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца, Москва, Россия;

Саакян С.В., член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, начальник отдела офтальмоонкологии и радиологии ФГБУ НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца, Москва, Россия;

Свирина И.В., аспирант отдела офтальмоонкологии и радиологии ФГБУ НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца, Москва, Россия;

Андрюшин А.Е., научный сотрудник отдела иммунологии и вирусологии отдела иммунологии и вирусологии ФГБУ НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца, Москва, Россия;

Мякошина Е.Б., д.м.н., научный сотрудник отдела офтальмоонкологии и радиологии ФГБУ НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца, Москва, Россия.

Authors:

Svetlova E.V., Virologist, Laboratory of Virology and Microbiology, Department of Immunology and Virology, Moscow Helmholtz Research Centre of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation;

Balatskaya N.V., PhD (Biology), Leading Researcher, Head of the Department of Immunology and Virology, Moscow Helmholtz Research Centre of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation;

Kulikova I.G., Biologist, Laboratory of Virology and Microbiology, Department of Immunology and Virology, Moscow Helmholtz Research Centre of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation;

Saakyan S.V., RAS Corresponding Member, DSc (Medicine), Professor, Head of the Department of Ophthalmooncology and Radiology, Moscow Helmholtz Research Centre of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation;

Svirina I.V., PhD Student, Department of Ophthalmooncology and Radiology, Moscow Helmholtz Research Centre of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation;

Andryushin A.E., Researcher, Department of Immunology and Virology, Moscow Helmholtz Research Centre of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation;

Myakoshina E.B., DSc (Medicine), Researcher, Department of Ophthalmooncology and Radiology, Moscow Helmholtz Research Centre of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 24.05.2024
Принята к печати 13.08.2024

Received 24.05.2024
Accepted 13.08.2024