

КЛИНИКО-ВИРУСОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЗАБОЛЕВАНИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ВИРУСОМ САРКОМЫ КАПОШИ

В.Э. Гурцевич¹, Л.С. Яковлева¹, С.А. Галецкий¹, Т.А. Афанасьева¹,
Н.Б. Сенюта¹, В.Н. Степина¹, Е.Л. Кадырова¹, Д.А. Широков¹,
М.М. Анохина¹, Т.Т. Кондратьева¹, Н.Н. Тупицын¹, А. Жессан²

¹ ГУ Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва, Россия

² Институт Пастера, Париж, Франция

Резюме. В работе приведены литературные данные и результаты собственных исследований, посвященных вирусу саркомы Капоши (KSHV) и его ассоциации с саркомой Капоши (СК), первичной выпотной лимфомой (ПВЛ) и мультицентрической болезнью Кастлемана (МБК). Полученные данные свидетельствуют о том, что все 3 основные клинические формы СК, диагностируемые в России, в высокой степени ассоциированы с KSHV, хотя и не в 100% случаев. Среди больных другими формами опухоли и не онкологических больных выявлены отдельные группы лиц с высоким уровнем инфицированности вирусом, что является фактором риска для возникновения СК. Обнаружено, что простата, особенно у больных карциномой простаты и СК, может быть серьезным источником вируса и интимные контакты с этими больными должны быть ограничены. Молекулярные варианты изолятов KSHV, циркулирующие в стране, относятся к двум основным генетическим подгруппам (А и С), широко представленным в Европейских странах и США, что указывает на общее происхождение вируса в этих странах. Приведены литературные данные о современных подходах в лечении.

Ключевые слова: вирус саркомы Капоши, саркома Капоши, первичная выпотная лимфома, мультицентрическая болезнь Кастлемана, диагностика.

CLINICAL AND VIROLOGICAL CHARACTERISTICS OF DISEASES ASSOCIATED WITH THE KAPOSI SARCOMA VIRUS

Gurtsevich V.E., Yakovleva L.S., Galetskiy S.A., Afanasieva T.A., Senjuta N.B., Stepina V.N., Kadyrova E.L., Shirokov D.A., Anokhina M.M., Kondratieva T.T., Tupitsin N.N., Zhessan A.

Abstract. The paper presents literature data and results of own studies on the Kaposi's sarcoma herpesvirus (KSHV) and its association with Kaposi's sarcoma (KS), the primary effusion lymphoma (PEL) and multicentric Kastleman disease (MCD). The obtained data show that all 3 main clinical forms of KS, diagnosed in Russia, are significantly associated with KSHV, though not always in 100% of cases. Distinct groups of persons with high prevalence of virus infection have been detected among patients with other forms of cancer and non-cancer diseases that may represent a risk factor for development of KS. It was found that the prostate, especially in patients with carcinoma of the prostate and KS could be an important localization of virus and intimate contact with these patients should be limited. For the first time in Russia HIV-negative case of PEL associated with KSHV had been diagnosed and studied in details. It was also demonstrated that isolates of KSHV, circulating in the country, belong to the two major genetic subgroups of the virus (A and C), a widely represented in the European countries and in the United States, which indicates a common origin of the virus in these countries. The current methodologies of KS' treatment are also presented. (*Infekc. immun.*, 2011, vol. 1, N 2, p. 151–160)

Key words: Kaposi's sarcoma herpesvirus, Kaposi's sarcoma, the primary effusion lymphoma, multicentric Kastleman disease, diagnostics.

поступила в редакцию 15.12.2010
принята к печати 20.12.2010

© Гурцевич В.Э. и соавт., 2011

Адрес для переписки:

Гурцевич Владимир Эдуардович,
д.м.н., профессор, зав. лабораторией
вирусного канцерогенеза ГУ Российский
онкологический научный центр
им. Н.Н. Блохина

115478, Москва, Каширское ш., 24,
ГУ Российский онкологический
научный центр им. Н.Н. Блохина.
Тел. (495) 324-25-64.
E-mail: gurtsevitch@crc.umos.ru

Введение

Герпесвирус саркомы Капоши (KSHV) был открыт в 1994 г. группой американских исследователей в составе Y. Chang, P. Moore, E. Cesarman и D.M. Knowles [5]. Исследования показали, что этот вирус относится к подсемейству γ -герпесвирусов, роду радиновирусов, типу 8. В классификации, основанной на таксономии герпетических вирусов, KSHV был обозначен как HHV-8 (human herpes virus 8). Вирус обладает сиквенсной гомологией с такими представителями герпетических вирусов как герпесвирус саймири (HVS) и вирус Эпштейна–Барр (EBV) [24].

Основные пути распространения KSHV – половой (с семенной жидкостью, вагинальным секретом), горизонтальный (со слюной, особенно у детей), гематогенный (при гемотрансфузиях и внутривенных инъекциях инфицированной крови), трансплацентарный (у новорожденных, зараженных инфицированными матерями) [18, 22]. Вирус обладает тропностью к лимфоидным, эпителиальным и дендритным клеткам, а также к зернистому эпителию простаты. Геном KSHV, представляющий собой двойную спираль ДНК, содержит длинную уникальную область (LUR) размером 140,5 kb, в которой идентифицировано около 90 генов (открытых рамок считывания, ORF) [24, 25]. Учитывая гомологию между некоторыми регуляторными генами клетки и рядом вирусных генов, было высказа-

но предположение о клеточном происхождении последних. Захват клеточных генов вирусом из клетки в процессе формирования вирусных частиц произошел, по-видимому, миллионы лет тому назад, дав основания назвать KSHV вирусом-пиратом. Вирусные гены, являющиеся клеточными гомологами и кодируемые ими белки представлены в табл. 1 [11].

В настоящее время доказано, что KSHV является этиологическим фактором, по крайней мере, для трех новообразований человека: саркомы Капоши (СК), первичной выпотной лимфомы (ПВЛ) (Primary Effusion Lymphoma, PEL) или В-клеточной лимфомы полостей тела (Body Cavity B-cell Lymphoma, BCBL), а также определенных вариантов мультицентрической болезни Каствелмана (МБК) (Multicentric Castleman Disease, MCD).

Эпидемиологическими исследованиями показано, что в различных странах мира инфицированность населения KSHV существенно варьирует и четко коррелирует с уровнем заболеваемости СК. При этом условно выделяют три географических региона: 1) высоко эндемичный по заболеваемости СК регион, к которому относятся страны Африки, Среднего Востока, уровень инфицированности населения в которых KSHV достигает 30–70%; 2) регион с промежуточной эндемичностью (страны Средиземноморья), уровень инфицированности в которых вирусом, не превышает 10–25%; и 3) неэндемичный регион, к которому отно-

ТАБЛИЦА 1. БЕЛКИ, КОДИРУЕМЫЕ ОТКРЫТЫМИ РАМКАМИ СЧИТЫВАНИЯ (ORF) ВИРУСА САРКОМЫ КАПОШИ, ЯВЛЯЮЩИЕСЯ ГОМОЛОГАМИ КЛЕТОЧНЫХ БЕЛКОВ

ORF KSHV	Белки KSHV	Функции белков KSHV
ORF16	vBCL-2	сиквенсный и функциональный гомолог антиапоптотического белка BCL-2, ингибирует апоптоз
ORF72	vcyc	гомолог клеточных цитокинов, интерферирующий с нормальным клеточным циклом, способен инактивировать широкий набор мишеней (pRbx, p27, гистон H и cdc 25A)
ORFK2	vIL6	гомолог интерлейкина IL-6 человека, активирует STAT и MAPK, а также другие серин/треонинкиназные пути
ORFK6	vMIP-I	белки макрофогального воспаления, являющиеся гомологами цитокинов, антагонисты рецепторов CC, координируют движение лейкоцитов, регулируют их сбор к месту воспаления
ORFK4	vMIP-II	
ORFK4.1	vMIP-III 0	
ORFK9	vIRF-1	белки-гомологи интерферон (IRF)-регулирующих факторов транскрипции, ингибируют транскрипционную активность p53, вызывают опухоли у голых мышей
ORFK11	vIRF-2	
ORFK10.5	vIRF-3/LANA2	
ORF74	vGPCR	белок-гомолог клеточного рецептора, связывающего G-белок: индуцирует ангиогенез через активацию VEGF, активирует транскрипционный фактор AP-1 и NF- κ B
ORFK13	vFLIP	мощный активатор сигнального пути NF- κ B, обладает антиапоптотическими функциями: ингибирует внешний сигнальный путь апоптоза, предотвращая активацию каспаз, включая каспазу 8

сится большинство стран Американского континента, Северной Европы и некоторые страны Азии, инфицированность населения которых вирусом не превышает 10% [2, 18].

Что касается России, то статистические данные о заболеваемости СК отсутствуют, поскольку эта форма опухоли учитывается в совокупности со всеми злокачественными новообразованиями кожи. Можно предположить, что показатели инфицированности населения KSHV, как и заболеваемости СК, в различных регионах страны, скорее всего, существенно колеблются в зависимости от многих факторов, включая степень инфицированности ВИЧ инфекцией, создающей на фоне нарастающего иммунодефицита благоприятные условия для размножения вируса и возникновения болезни. Действительно, проведенные нами исследования подтвердили это предположение и показали, что, например, среди московских доноров крови уровень инфицированности KSHV был невысоким и составил 4%: серопозитивными оказались двое доноров из 50-ти обследованных. Этот показатель, однако, был гораздо выше среди коренного населения Республики Бурятия — 25,1%: из 745 обследованных лиц серопозитивными оказались 187 [4]. Интересно отметить, что в Бурятии высокая степень инфицированности населения KSHV коррелировала с высокой его инфицированностью ВИЧ-инфекцией, которая за 7 лет (с 1998 по 2004 гг.) увеличилась в 440 раз и достигла к началу 2005 г. 2204 человек.

Задача нашего исследования состояла в изучении ассоциации KSHV с различными клиническими формами СК в России, выяснении возможного места латенции вируса в организме человека, а также молекулярной характеристики российских вариантов KSHV и их филогенетическом анализе.

Материалы и методы

Для решения поставленных задач образцы сывороток крови больных классической, иммуносупрессивной и СПИД-ассоциированной формами СК, а также контрольных групп больных и доноров крови, тестировали стандартным методом непрямой иммунофлуоресценции на присутствие антител к латентному ядерному (EBNA) и/или литическому капсидному (VCA) антигенам KSHV. В качестве антигенсодержащих клеток использовали клетки перевиваемых клеточных линий BCBL-1 и BC-3, моноинфицированных KSHV. Клеточные линии P3HR-1 и RAJI, обработанные ТПА (и n-бутиратом натрия для RAJI), использовали для обнаружения антител к вирусному капсидному (VCA) и раннему (EA) антигенам EBV соответственно [10].

Поиск последовательностей KSHV осуществляли в биопсийном материале опухолей боль-

ных СК, других онкологических и не онкологических больных, а также в клетках эякулята или простатической жидкости соответствующих пациентов и здоровых лиц. С этой целью ДНК, экстрагированную из исследуемого материала, тестировали в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием вирус-специфических пар праймеров к ORF26 и ORFK1 вируса, соблюдая режимы и условия проведения ПЦР, описанные нами ранее [9, 14]. В некоторых случаях использовали также вариант «гнездной» ПЦР. Сиквенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом сиквенаторе ABI PRISM 3100-Avant. Обработку данных сиквенирования осуществляли с помощью программ Chromas 230 и Vector NTI. Другие методы, использованные при проведении данной работы, описаны в соответствующих разделах этой статьи

Результаты и обсуждение

Саркома Капоши (СК) — многофокусное неопластическое заболевание, возникающее из эндотелиальных и кровеносных лимфатических сосудов, главным образом дермы. Характеризуется СК следующими признаками: 1) хаотическим незавершенным ангиогенезом, 2) пролиферацией веретеновидных клеток и 3) инфильтрацией опухоли мононуклеарами (рис. 1, III обложка). Впервые заболевание в качестве нозологической единицы было описано австрийским дерматологом венгерского происхождения Морисом Капоши в 1872 г. [6].

В настоящее время различают несколько форм СК, а именно: спорадическую (классическую или идиопатическую), возникающую чаще всего у лиц пожилого возраста; эндемическую (африканскую), эпидемическую (СПИД-ассоциированную); иммуносупрессивную, возникающую чаще всего под воздействием иммуносупрессии различного генеза [13]. Болезнь проявляется в виде различного рода кожных поражений, которые чаще всего локализуются на нижних, реже на верхних конечностях в виде пятен, бляшек или опухолевых узлов (рис. 2, III обложка). Поражению может быть подвергнута и слизистая оболочка различных органов, в том числе полости рта или гениталий (рис. 3, III обложка). Встречаются также поражения внутренних органов, пищеварительного тракта, дыхательных путей и лимфатических узлов [6].

Результаты изучения степени ассоциации российских больных СК с KSHV представлены в табл. 2 [10]. Из таблицы следует, что из 67 больных классической формой болезни антитела к вирусу обнаружены у 56, то есть уровень серопозитивности составил 83,6%. При изучении биопсийного материала серопозитивных

ТАБЛИЦА 2. МАРКЕРЫ KSHV У БОЛЬНЫХ СК И КОНТРОЛЬНЫХ ГРУПП

Заболевание, стадия болезни	Число обследованных	Число серопозитивных лиц			ПЦР-анализ опухолевой ткани у серопозитивных лиц	
		абс.	%	СГТА	абс.	%
<i>Больные саркомой Капоши (СК)</i>						
Классическая СК (всего)	67	56/67**	83,6	1 : 296	31/41	75,6
I стадия	19	18/19	94,7	1 : 308	14/18	77,7
II стадия	15	12/15	80,0	1 : 386	8/12	66,7
III стадия	10	10/10	100,0	1 : 242	8/10	80,0
IV стадия	4	1/4	25,0	1 : 320	1/1	100,0
Всего по стадиям	48*	41/48	85,4	1 : 316	31/41	75,5
Иммуносупрессивная СК	18	11/16	68,8	1 : 181	6/9	66,7
СПИД-ассоциированная СК	10	5/7	71,4	1 : 190	4/4	100,0
<i>Контрольные группы больных и здоровых лиц</i>						
Соматические больные	117	0/117	0	0	н/и	н/и
Пузырчатка	13	0/13	0	0	н/и	н/и
Доноры крови	50	2/50	4,0	1 : 80	н/и	н/и

Примечания. *В 19 случаях стадию болезни выявить не удалось; **числитель — число позитивных случаев, знаменатель — число исследованных случаев; н/и — не исследовали.

больных этой формой опухоли вирусные последовательности были выявлены у 31 из 41 тестируемых образцов (то есть в 75,6% случаев). Уровень серопозитивности для 18 больных иммуносупрессивной и 10 больных СПИД-ассоциированной формами СК составил, соответственно, 68,8 и 71,4%, а вирус-специфические последовательности в опухолевых биоптатах серопозитивных больных этих же групп были обнаружены в 66,7 и 100% случаев соответственно. В контрольных группах больных и здоровых лиц, представленных в наших исследованиях соматическими больными (113 случаев), больными пузырчаткой (13 случаев) и донорами крови (50 доноров), серопозитивными оказались лишь двое доноров крови (4%), как об этом уже было указано выше. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что уровень ассоциации СК с KSHV в России достаточно высок, хотя и не достигает 100%, как это наблюдают в эндемичных по СК регионах.

Инфицированность этим вирусом больных другой опухолевой и неопухолевой патологией существенно различалась (табл. 3) [11]. В группе детей, больных острым лимфоидным/миелоидным лейкозом она составила 5,5%: вирус-специфические антитела были обнаружены, у одного из 18 детей. Показатели серопозитивности были, однако, существенно выше в других группах больных и колебались от 26% в группе реципиентов почечных аллотрансплантатов

(26 случаев) до 71,4% у ВИЧ-инфицированных гомосексуалистов (7 случаев). Особый интерес вызвал высокий уровень серопозитивности в группе больных раком желудка: вирус-специфические антитела были выявлены у 18 из 43 изученных больных (41,8%). Однако, при дополнительном изучении 20 сывороток больных раком желудка, ни в одном случае антитела к этому вирусу обнаружены не были.

В зарубежных исследованиях, проведенных в эндемичных по СК регионах, было показано, что одним из важнейших мест персистенции KSHV в организме человека является простата [14]. С целью проверки справедливости этого утверждения маркеры KSHV были нами изучены у больных карциномой простаты, хроническим простатитом и СК, осложненной хроническим простатитом [11]. Из табл. 4 видно, что из 11 больных карциномой простаты четверо содержали вирус-специфические антитела (36,4%), а вирусные последовательности в опухолевой ткани выявлены у двух из них. Вирусные последовательности были обнаружены и в одном из 19 изученных образцов спермы, полученных от больных хроническим простатитом. У больных СК при наличии у них хронического простатита, число вирус-содержащих образцов спермы уже превысило 50%. Таким образом, полученные данные подтвердили ранее сделанное сообщение о персистенции KSHV в простате, особенно часто наблюдаемой у больных кар-

ТАБЛИЦА 3. ИНФИЦИРОВАННОСТЬ KSHV БОЛЬНЫХ ОНКОЛОГИЧЕСКИМИ И НЕ ОНКОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Заболевание	Число обследованных	Число HHV-8 серопозитивных лиц		СГЗТ антител	Данные ПЦР-анализа**
		абс.	%		
Острый лимфоидный/миелоидный лейкоз (дети)	18	1/18*	5,5	1 : 180	н/и
Рак носоглотки	9	0/9	0	0	н/и
Меланома	29	0/10	0	0	н/и
T- и B-клеточные лимфомы кожи	10	5/10	50,0	1 : 115	1/5 (20%)
Энцефалопатия	11	3/11	27,3	1 : 202	н/и
ВИЧ-инфицированные	7	5/7	71,4	1 : 278	н/и
Рак желудка	43	18/43	41,8	1 : 296	н/и
Реципиенты почек	26	7/26	26	1 : 59	н/и

Примечания. *Числитель — число позитивных случаев, знаменатель — число исследованных случаев; **числитель — число позитивных случаев, знаменатель — число исследованных случаев; н/и — не исследовали.

циномой простаты и СК. Эти находки позволили нам предположить, что особый риск быть инфицированным этим вирусом могут иметь лица, имеющие интимные контакты с указанными больными.

Для проверки высказанного предположения нами были обследованы четыре сексуально активные пары, в каждой из которых один из партнеров был больным СК (табл. 5) [11]. В паре № 1 больной СК была женщина с классической формой болезни. Она оказалась серонегативной, но вирусные последовательности в образце опухолевой ткани присутствовали. У ее партнера, больного хроническим простатитом, антитела к KSHV в сыворотке крови не обнаружены, но в образце его спермы методом «гнездной» ПЦР были выявлены вирусные последовательности. В парах № 2, № 3 и № 4 больными СК

были мужчины, все с классической формой болезни, все серонегативные, но с обнаруженными вирусными последовательностями в опухолевой ткани. Из трех половых партнерш этих больных две женщины оказались серопозитивными и одна серонегативной. Полученные данные свидетельствуют о том, что больные СК являются реальным источником KSHV и могут заразить интимно контактирующих с ними лиц либо половым путем, либо через слюну. Половой путь инфицирования вирусом доказан многочисленными исследованиями, особенно для гомосексуалистов [8, 26]. Через слюну чаще всего заражаются дети, хотя такая возможность не исключена и для взрослых [11, 25].

Первичная лимфома серозных полостей характеризуется наличием в полостях тела (обычно в грудной полости) опухолевых масс, состоя-

ТАБЛИЦА 4. ПОИСКИ МАРКЕРОВ KSHV У БОЛЬНЫХ КАРЦИНОМОЙ ПРОСТАТЫ И ХРОНИЧЕСКИМ ПРОСТАТИТОМ, ОСЛОЖНЕННЫМ И НЕ ОСЛОЖНЕННЫМ СК

Диагноз	Наличие и форма СК	Стадия СК	Число обследованных	Число серопозитивных	СГЗТ1	ПЦР-анализ	
						опухоль	эякулят
Хронический простатит	нет	–	19	н/и	н/и	нет	1/192 (5,3%)
Карцинома простаты	нет	–	11	4/11	1 : 1603	2/24 (100%)	н/и
Хронический простатит у больных СК	Классическая или иммуносупрессивная	I-II, II	7	3/6 (50,0%)	1 : 254	5/6 (83,3%)	4/7 (57,1%)

Примечания. 1 — среднегеометрическое значение титров антител; 2 — позитивный сигнал получен в «гнездной» ПЦР; 3 — специфическое свечение получено в разведении 1 : 160; 4 — ПЦР-анализ биопсийного материала проведен у серопозитивных больных.

ТАБЛИЦА 5. РИСК ПОЛОВЫХ ПАРТНЕРОВ БОЛЬНЫХ САРКОМОЙ КАПОШИ (СК) БЫТЬ ИНФИЦИРОВАННЫМИ KSHV

Пары партнеров	Больные СК				Половые партнеры больных СК	
	пол	Тип СК	стадия СК	Результаты исследования	пол	Результаты исследования
1	Ж	классический	II	*сыворотка — негатив. опухоль — ПЦР-позит.	М (хр. простатит)	сыворотка — негатив. **эякулят — ПЦР-позитив.
2	М	классический + хр. простатит	II	сыворотка — негатив. опухоль — ПЦР-позит.	Ж	сыворотка — позитив.
3	М	классический	III	сыворотка — негатив. опухоль — ПЦР-позит. эякулят — негатив	Ж	сыворотка — позитив.
4	М	классический + хр. простатит	III	сыворотка — негатив. опухоль — ПЦР-позит.	Ж	сыворотка — негатив.

Примечания. *Сыворотка на присутствие антител к HHV-8 исследовали методом непрямой иммунофлуоресценции;
**данный образец ДНК исследовали в «гнездной» ПЦР, остальные образцы ДНК — в обычной ПЦР.

ТАБЛИЦА 6. РЕЗУЛЬТАТЫ ИММУНОТИПИРОВАНИЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПЛЕВРАЛЬНОГО ВЫПОТА*

Маркер	% антиген позитивных клеток с низкой экспрессией CD45
В-клеточные антигены	
CD19	0,5
CD20	80,0
CD138	3,7
N-клеточные антигены	
CD7	3,9
CD5	2,6
CD3	2,5
CD4	1,4
CD8	1,8
Миелоидные антигены	
CD13	5,1
CD33	4,5
Моноцитарные антигены	
CD64	4,9
Антигены стволовых клеток	
CD34	2,3
Мегакариоцитарные антигены	
CD61	0,4
Эритроидные антигены	
Glycoforin A	2,7
Другие	
CD38	63,4
HLA-RD	82,7
CD10	0,2

Примечания. * Иммунофенотипически клетки плеврального выпота больного были типичны для PEL.

ших из В-клеток (как правило, KSHV- и EBV-позитивных), прошедших этап созревания в зародышевом центре лимфатического узла. Заболевание встречается достаточно редко, протекает на фоне иммунодефицита различного генеза, чаще всего вызываемого ВИЧ-инфекцией [21]. Случаев, не связанных с ВИЧ-инфекцией, в литературе описано крайне мало — всего 22. В 2006 г. нами был описан 23-й случай [26]. Заболевание было диагностировано у ВИЧ-негативного мужчины 56 лет, имевшего в анамнезе прогрессирующую с 2002 г. кардиомиопатию и диабет 2-го типа. Заключение клиницистов при первичном осмотре больного: асцит, двухсторонний плеврит, спленомегалия. При цитологическом исследовании клеток плевральной жидкости обнаружены опухолевые клетки больших размеров. Они характеризовались выраженной базофилией цитоплазмы и светлым ободком вокруг ядра с множеством маленьких вакуолей (рис. 4, III обложка). В выпотном плевральном супернатанте методом непрямой иммунофлуоресценции обнаружены высокие титры и широкий спектр вирус-специфических антител: к LANA KSHV — 1 : 320; к VCA EBV — 1 : 640 (IgG) и 1 : 20 (IgA) и к EA EBV — 1 : 80 (IgG).

ПЦР-анализ ДНК опухолевых клеток, проведенный с праймерами к генам ORF26, K1 и K2 KSHV, дал положительные результаты со всеми использованными праймерами, что свидетельствовало о наличии вирусных последовательностей в опухолевом материале больного (рис. 5а). В качестве позитивного контроля в этих опытах использовали ДНК KSHV-содержащих клеток линии BCBL1. Кроме того, оказалось, что злокачественные клетки синтезируют одновременно мРНК интер-

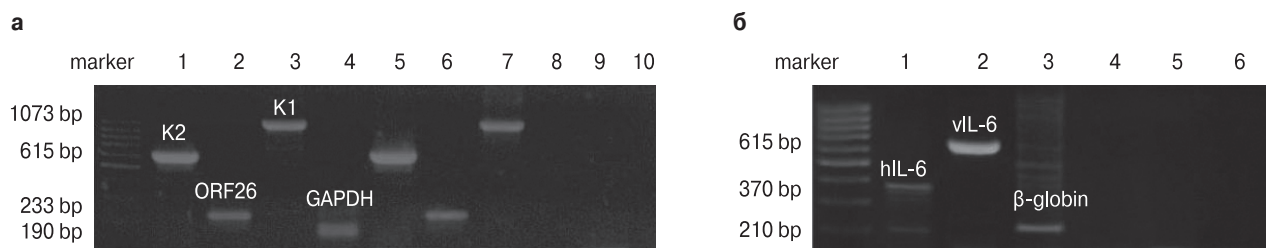


Рисунок 5. Результаты ПЦР-анализа с ДНК из клеток плеврального выпота (с парами праймеров к трем генам KSHV: K1, ORF 26 и K2 (vIL6))

а) ПЦР-анализ последовательностей KSHV в клетках PEL больного. 1–4: DNA больного; 5–7: позитивный контроль (ДНК клеток клеточной линии BCBL-1); 8–10: негативный контроль. Линии 1, 5, 8: использовали праймеры к vIL-6; линии 2, 6, 9: использовали праймеры к ORF26; линии 3, 7, 10: использовали праймеры к K1; линия 4: использовали праймеры к GAPDH.

б) Результат ОТ-ПЦР-анализа на экспрессию генов hIL-6 и vIL-6. 1–3: cDNA больного; 4–6: негативный контроль (бидистиллированная H₂O). Линии 1, 4: использовали праймеры к hIL-6; линии 2, 5: использовали праймеры к vIL-6; линии 3, 6: праймеры к β-глобину.

лейкина человека (hIL6) и ее вирусный гомолог (мРНК vIL6) (рис. 5б), что характерно для этого типа опухоли и совпадает с данными других исследователей. В качестве позитивного контроля на наличие РНК в пробе проводили RT-PCR с праймерами к β-глобину [26].

Иммунофенотипирование клеток плеврального выпота осуществляли тройным иммунофлуоресцентным окрашиванием (CD45PE/Cy5 в каждой пробе) с применением широкой панели моноклональных антител. Для анализа использовали проточный цитометр FACSCAN (BD, Mountain View CA). В-клеточный иммунофенотип был подтвержден экспрессией CD20 на большинстве клеток, хотя антиген CD19 практически отсутствовал. Результаты, представленные в табл. 6, свидетельствуют о том, что фенотип лимфомных клеток больного был достаточно типичен для ПВЛ, не смотря на то, что он характеризовался рядом морфологических особенностей. Так, в опухолевых клетках не была обнаружена экспрессия ряда пан-В-клеточных маркеров. Кроме того, эти клетки характеризовались высокой экспрессией активационного антигена CD38 и молекул HLA-DR. Высокая экспрессия CD20 и отсутствие экспрессии маркера плазматических клеток CD138 (syndecane-1) — характерного маркера при этом заболевании — также не укладываются в классическую картину фенотипа клеток для этой патологии. Исследования показали и отсутствие на опухолевых клетках маркеров Т-клеточной дифференцировки (CD7, CD5, CD4, CD3, CD8), миелоидных и моноцитарных антигенов (CD13, CD33, CD64), маркера NK-клеток CD56 и некоторых других. Тем не менее, по совокупности клинических, вирусологических, морфологических и иммунофенотипических исследований диагноз первичной лимфомы серозных полостей у данного больного не вызывает сомнений и в целом укладывается в описание болезни, данной в классификации ВОЗ (2008).

Болезнь Кастлемана (БК) впервые была описана Бенджамином Кастлеманом в 1956 г. как солитарная гиперплазия лимфатического узла средостения, характеризующаяся аномальными фолликулами с небольшими герминальными центрами и выраженной капиллярной пролиферацией [3]. Современные данные свидетельствуют о том, что БК представляет собой несколько различных клинико-патологических состояний, сложно и зачастую противоречиво интерпретируемых.

В настоящее время описано два основных клинических варианта БК: 1) локализованная форма, которая обычно проявляется в виде гиперплазии изолированного лимфатического узла в богатой лимфатическими узлами области (чаще всего в средостении); этот вариант болезни излечивается хирургическим удалением узла; 2) мультицентрическая болезнь Кастлемана (МБК), которая проявляется как генерализованная лимфоаденопатия с системными симптомами, характеризующаяся более агрессивным клиническим течением и предрасположенностью к злокачественной трансформации [3].

Пониманию патогенеза БК в значительной степени способствовало открытие ассоциации МБК с герпесвирусом саркомы Капоши (KSHV). Этот вирус был обнаружен приблизительно в половине случаев МБК, возникающих у иммунокомпетентных больных и практически у всех лиц, инфицированных HIV, что свидетельствует в пользу патогенетической роли KSHV при данном заболевании. Кроме того, обострение болезни коррелирует с увеличенной нагрузкой KSHV в периферической крови.

Молекулярно-биологические исследования показали, что в образцах лимфопротератов больных МБК, как и СК, экспрессированы многие латентные и литические гены KSHV (табл. 1) [8, 13]. Эти гены кодируют такие белки как v-cyclin (плеотропный циклин, который совместно с cdk 6 способен фосфорилировать

и инактивировать широкий набор мишеней, включая pRbx, p27, гистон H1 и cdc25A); vBcl-2 (сиквенсный и функциональный гомолог белка Bcl-2, ингибирует апоптоз); и vGPCR (индуцирует экспрессию провоспалительных цитокинов и ростовых факторов, таких как IL-1b, IL-6, IL-8, TNF α и через сигнальные пути AP-1 и NF- κ B — основной ростовой фактор фибробластов; ответственен за ангиогенез). Другие белки, кодируемые генами KSHV, такие как K1 (индуцирует активацию транскрипционных факторов AP-1, NF-AT и NF- κ B; обладает трансформирующей способностью), vIRF (ингибирует транскрипционную активность p53 и p53-опосредованный апоптоз), vFLIP (мощный активатор сигнального пути NF- κ B, обладает антиапоптотическими функциями), также вносят существенный вклад в патологический процесс. Их действие способствует выживанию В-лимфоцитов, подавлению апоптоза в Т-клетках, что способствует ускользанию вируса от иммунного ответа, препятствуя тем самым негативному регуляторному воздействию со стороны клеточных белков. Вирусные белки индуцируют также фосфорилирование белка ретинобластомы (pRb), что позволяет преодолевать опосредованный pRb арест клеток. Случаи болезни Кацлемана зарегистрированы и в России [1, 19, 20].

Молекулярная характеристика изолятов HHV-8 в России. Молекулярные исследования образцов KSHV из различных географических регионов мира выявили их генетическую неоднородность. Поскольку геном KSHV чрезвычайно стабилен, то изучению подвергались наиболее вариабельные гены K1 и K14/K15 [12]. Как было указано выше, ген K1 кодирует конститутивно активный белок, который приводит в действие многочисленные внутриклеточные сигнальные пути, индуцирует активацию целого спектра транскрипционных факторов; обладает трансформирующей способностью [23]. Ген K14/K15 кодирует белок, который изучен пока недостаточно. Функционально он напоминает LMP-2A и LMP-1 ВЭБ, обладает иммуномодулирующей активностью. Его С-терминальная область содержит консервативные мотивы (SH2 и SH3), которые взаимодействуют с адапторными молекулами клетки TRAF1–3 [23]. Сиквенсный анализ белков, кодируемых геном K1, позволил выделить 5 основных подтипов вируса (А–Е).

Было установлено, что подтипы А и С наиболее часто встречаются в США, странах Европы, Ближнего Востока и некоторых странах Азии; подтипы В и А5 — в Африке и Французской Гвиане; подтипы D — на Тайване, островах Тихого Океана и Австралии; Е — среди американских индейцев Бразилии и Эквадора, обитающих в районе реки Амазонки. Кроме того,

из редко встречающихся подтип Z изолирован среди школьников Замбии, а F — в Уганде. У белка, кодируемого геном K14/K15, выявлены две дивергированные аллели (Р — преобладающая и М — минорная), у которых обнаружены только 30% идентичности по аминокислотному сиквенсу [8, 18].

В наших исследованиях полный сиквенсный анализ гена K1 был проведен для 37 образцов вируса. При этом оказалось, что 30 из них относятся к подтипу А (у одного обнаружена уникальная делеция 19 аминокислот в области VR2), а 7 — к подтипу С. При сиквенсном анализе гена K14.1/K15 было обнаружено, что к минорному (М) подтипу относятся 9 образцов и 23 — к преобладающему (Р). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о генетическом родстве вариантов KSHV российского происхождения с вариантами вируса, персистирующими в странах Европы, Ближнего Востока, Азии и США [4, 14, 15].

Терапия СК. Мишенями при лечении СК являются KSHV, HIV (у больных СПИД-ассоциированной формой опухоли), а также процессы ангиогенеза и клеточной дифференцировки. По литературным данным терапия СК проводится как традиционными химиопрепаратами (винбластин, винкристина, блеомицин, доксорубицин), так и препаратами нового поколения (липосомальными антрациклинами и паклитакселем), которые вводят внутрь опухолевых узлов и внутривенно. В ряде случаев опухолевые узлы подвергают хирургическому удалению. В последнее время широко назначают и анти-герпесвирусную терапию такими препаратами, как ганцикловир, цидофовир, адефовир и фоскарнет. Антигерпесвирусную терапию применяют и у лиц из групп риска: шприцевых наркоманов, гомосексуалистов, лиц, инфицированных ВИЧ, и имевших интимный контакт с больными СК. У больных СПИД обязательным является дополнительное проведение высокоактивной антиретровирусной терапии, при этом назначают HAART, анти-CD20 моноклональные антитела (ритуксимаб), а также широкий спектр ингибиторов протеазы ВИЧ, таких как индинавир, саквинавир, ритонавир и нельфинавир. Эти препараты также оказывают негативное воздействие на ангиогенез, опухолевый рост и инвазию, воспаление, процессирование и презентацию антигенов, а также выживание клеток и т.д. В США для лечения СК назначают комплексную терапию. При этом используют Alitretinoin gel для наружного применения и химиотерапию такими препаратами, как липосомальный даунорубин, полиэтиленгликоль (ПЭГ)/липосомальный доксорубин, полиэтиленгликолизированный антрациклин, паклитаксель, а также интерферон-альфа для системного введения [6, 27]. Для направленного угнетения процессов

инвазии и метастазирования в терапии СК стали использовать ингибиторы цинк-зависимых протеинкиназ (Matrix metalloproteinases, MMPs), а также анти-ангиогенные агенты: AGM 1470, thalidomid, glufanide disodium и др. [17]. Ведутся поиски терапевтических препаратов, направленных на ингибирование лимфангиогенеза [16]. Аналогичные подходы клиницисты пытаются применить и в терапии при других патологических состояниях, ассоциированных с KSHV, — ПВЛ и МБК.

Заключение

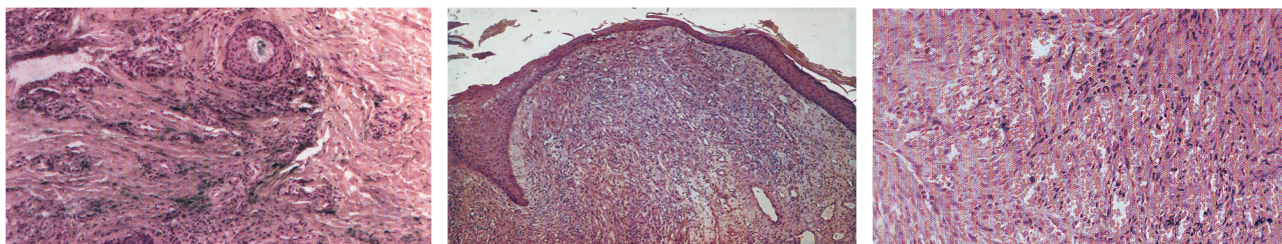
Проведенные исследования показали, что:

- население страны в разной степени инфицировано KSHV. Показатели инфицированности колебались от низких (4%) до значительных (25,1%) в зависимости от места проживания обследуемых лиц и воздействия целого ряда факторов, еще не до конца изученных;
- все 3 основные клинические формы СК, диагностируемые в России, в высокой степени ассоциированы с KSHV, хотя и не в 100% случаев. На основании этих данных факт обнаружения маркеров вируса у больных с опухолевыми поражениями кожи или слизистой может играть важную роль для диагностики СК;
- среди больных другими формами опухоли и не онкологических больных выявлены отдельные группы лиц с высоким уровнем инфицированности вирусом, что является фактором риска для возникновения СК;
- обнаружено, что простата, особенно у больных карциномой простаты и СК, может быть серьезным источником вируса и интимные контакты с этими больными должны быть ограничены;
- молекулярные варианты изолятов KSHV, циркулирующие в стране, относятся к двум основным генетическим подгруппам (А и С), широко представленным в Европейских странах и США, что указывает на общее происхождение вируса в этих странах.

Список литературы

1. Михайлов А.М., Бессмельцев С.С., Пожариский К.М., Костина О.Я., Коваль О.П., Матюхина Л.М., Криволапов Ю.А., Трофимов В.И., Лапин С.В. Болезнь Каслмана и РОEMS-синдром // *Клин. онкогематология*. — 2010. — Т. 3, № 3. — С. 259–269.
2. Ablashi D.V., Chatlynne L.G., Whitman J.E. Jr., Cesarman E. Spectrum of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, or human herpesvirus 8, diseases // *Clin. Microbiol. Rev.* — 2002. — Vol. 15. — P. 439–464.
3. Ballon G., Cesarman E. Castleman's disease // *Viral and immunological malignancies* / Ed. by P.A. Volberding, J.M. Palevsky, C.C. Walsh. — Hamilton: BC Decker Inc., 2006. — P. 108–121.
4. Cassar O., Bassot S., Plancoulaine S., Quintana-Murci L., Harmant C., Gurtsevitch V., Senyuta N.B., Yakovleva L.S., The G. de, Gessain A. Human herpesvirus 8, Southern Siberia // *Emerg. Infect. Dis.* — 2010. — Vol. 16. — P. 580–582.
5. Chang Y., Cesarman E., Pessin M.S., Lee F., Culpepper J., Knowles D.M., Moore P.S. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma // *Science*. — 1994. — Vol. 266. — P. 1865–1869.
6. Cinelli R., Vaccher E., Tirelli U. Clinical features and management of Kaposi's sarcoma // *Viral and immunological malignancies* / Ed. by P.A. Volberding, J.M. Palevsky, C.C. Walsh. — Hamilton: BC Decker Inc., 2006. — P. 89–107.
7. Diamond C., Brodie S.J., Krieger J.N., Huang M.L., Koelle D.M., Diem K., Muthui D., Corey L. Human herpesvirus 8 in the prostate glands of men with Kaposi's sarcoma // *J. Virol.* — 1998. — Vol. 72. — P. 6223–6227.
8. Engelmann I., Henke-Gendo C., Schulz T.F. Human Herpesvirus 8/Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus biology / Ed. by P.A. Volberding, J.M. Palevsky, C.C. Walsh. — Hamilton: BC Decker Inc, 2006. — P. 40–66.
9. Galetskii S.A., Kadyrova E.L., Kozyrev I.L., Molochkov A.V., Seniuta N.B., Shakhgil'dian V.I., Kravchenko A.V., Budoragin E.S., Chistiakova I.A., Lezvinskaia E.M., Kazantseva I.A., Samsonov V.A., Molochkov V.A., Gurtsevich V.E. [PCR diagnosis of sequences of a novel human herpes virus type 8 in patients with Kaposi sarcoma in Russia] // *Vopr. Virusol.* — 2000. — Vol. 45. — P. 13–17.
10. Gurtsevich V.E., Iakovleva L.S., Kadyrova E.L., Chernova V.A., Molochkov A.V., Kosukhina N.V., Agrba V.Z., Molochkov V.A. [Antibodies to herpesvirus type 8 in Kaposi's sarcoma patients and controls in Russia] // *Vopr. Virusol.* — 2003. — Vol. 48. — P. 19–22.
11. Gurtsevich V.E., Kadyrova E.L., Chernova V.A., Demidov L.V., Gruzdev B.M., Gessain A., Iakovleva L.S. [Search for HHV-8 associated diseases reservoir and spread paths of HHV-8 in Russia] // *Vopr. Virusol.* — 2004. — Vol. 49. — P. 20–24.
12. Hayward G.S., Zong J.C. Modern evolutionary history of the human KSHV genome // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* — 2007. — Vol. 312. — P. 1–42.
13. Jarviluoma A., Ojala P.M. Cell signaling pathways engaged by KSHV // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2006. — Vol. 1766. — P. 140–158.
14. Kadyrova E., Lacoste V., Duprez R., Pozharissky K., Molochkov V., Huerre M., Gurtsevitch V., Gessain A. Molecular epidemiology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 strains from Russian patients with classic, posttransplant,

- and AIDS-associated Kaposi's sarcoma // *J. Med. Virol.* — 2003. — Vol. 71. — P. 548–556.
15. Lacoste V., Kadyrova E., Chistiakova I., Gurtsevitch V., Judde J.G., Gessain A. Molecular characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus-8 strains from Russia // *J. Gen. Virol.* — 2000. — Vol. 81. — P. 1217–1222.
 16. Lorusso G., Vannini N., Sogno I., Generoso L., Garbisa S., Noonan D.M., Albin A. Anti-angiogenic activity of a novel class of chemopreventive compounds: oleanic acid terpenoids // *Recent. Results Cancer Res.* — 2009. — Vol. 181. — P. 209–212.
 17. Martellotta F., Berretta M., Vaccher E., Schioppa O., Zanet E., Tirelli U. AIDS-related Kaposi's sarcoma: state of the art and therapeutic strategies // *Curr. HIV Res.* — 2009. — Vol. 7. — P. 634–638.
 18. Martin J.N. Epidemiology of Kaposi's sarcoma — associated herpesvirus infection // *Viral and immunological malignancies* / Ed. by P.A. Volberding, J.M. Palevsky, C.C. Walsh. — Hamilton: BC Decker Inc, 2006. — P. 67–88.
 19. Melikian A.L., Egorova E.K., Karagulian S.R., Silaev M.A., Kaplanskaia I.B., Kremenetskaia A.M. [Tumor development from follicular dendritic cells in hyaline-vascular variant of Castleman's disease] // *Ter. Arkh.* — 2009. — Vol. 81. — P. 75–77.
 20. Melikian A.L., Kaplanskaia I.B., Korneva E.P., Frank G.A. [Castleman's disease] // *Ter. Arkh.* — 2005. — Vol. 77. — P. 48–53.
 21. Parekh S., Sparano J.A. Primary effusion lymphomas: biology and management // *Viral and immunological malignancies* / Ed. by P.A. Volberding, J.M. Palevsky, C.C. Walsh. — Hamilton: BC Decker Inc., 2006. — P. 122–129.
 22. Pica F., Volpi A. Transmission of human herpesvirus 8: an update // *Curr. Opin. Infect. Dis.* — 2007. — Vol. 20. — P. 152–156.
 23. Rezaee S.A., Cunningham C., Davison A.J., Blackburn D.J. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus immune modulation: an overview // *J. Gen. Virol.* — 2006. — Vol. 87. — P. 1781–1804.
 24. Russo J.J., Bohenzky R.A., Chien M.C., Chen J., Yan M., Maddalena D., Parry J.P., Peruzzi D., Edelman I.S., Chang Y., Moore P.S. Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8) // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 1996. — Vol. 93. — P. 14862–14867.
 25. Schulz T.F. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8): epidemiology and pathogenesis // *J. Antimicrob. Chemother.* — 2000. — Vol. 45, Suppl. T3. — P. 15–27.
 26. Shirokov D., Kadyrova E., Anokhina M., Kondratyeva T., Gourtsevich V., Tupitsyn N. A case of HHV-8-associated HIV-negative primary effusion lymphoma in Moscow // *J. Med. Virol.* — 2007. — Vol. 79. — P. 270–277.
 27. Sunil M., Reid E., Lechowicz M.J. Update on HHV-8-associated malignancies // *Curr. Infect. Dis. Rep.* — 2010. — Vol. 12. — P. 147–154.



а

б

в

Рисунок 1. Морфология различных поражений при СК (фотографии Elizabeth Hujek, MD, PhD)

а) гистологическая картина пятна: хаотическая пролиферация сосудов (гематоксилин-эозин, x100)

б) гистологическая картина бляшки (гематоксилин-эозин, x60)

в) гистологическая картина опухолевого узла: веретеновидные клетки вокруг примитивных сосудистых пространств (гематоксилин-эозин, x250)



а

б

в

Рисунок 2. Кожные поражения у больных СК (фотографии Susan E. Krown, MD, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center)

а) многочисленные пятна; б) многочисленные пятна, бляшки и опухолевые узлы; в) поражения сливного характера.

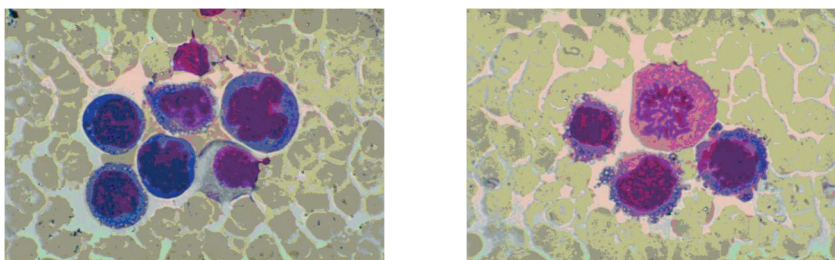


а

б

Рисунок 3. Экстракожные поражения у больных СК (фотографии Susan E. Krown, MD, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center)

а) поражения языка; б) поражения десны.



а

б

Рисунок 4. Клетки плеврального выпота больного (центрифужный препарат, окраска по Лейшману, x1000)