

Саакян С.В., Мякошина Е.Б., Кричевская Г.И., Слепова О.С., Пантелеева О.Г., Андрияшин А.Е.,
Хорошилова-Маслова И.П., Захарова Г.П., Майбогин А.М.

ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ И РЕТИНОБЛАСТОМА У ДЕТЕЙ

ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России, 105062, г. Москва

В статье представлены результаты комплексного лабораторного обследования 37 детей с ретинобластомой (РБ). В сыворотке крови с помощью иммуноферментного анализа определяли наличие IgM-, IgA-, IgG-антител к вирусу простого герпеса 1-го и 2-го типов, цитомегаловирусу (ЦМВ), вирусу Эпштейна–Барр (ВЭБ), вирусу герпеса человека (ВГЧ) 6-го типа, токсоплазме гондии, микоплазме гоминис и уреоплазме уреалитикум. В полимеразной цепной реакции определяли наличие ДНК этих патогенов в плазме крови 18 пациентов и биоптатах опухоли 10 глаз. Полученные результаты показали, что дети с РБ инфицированы преимущественно вирусами группы герпеса, среди которых преобладал ЦМВ. В 4 из 5 энуклеированных глаз в ткани опухоли также присутствовала ДНК герпесвирусов (ЦМВ (2 глаза), ВЭБ (1 глаз), ВГЧ-6 (1 глаз)) и уреоплазмы уреалитикум (1 глаз). Нуклеиновая кислота инфекционных микроорганизмов существенно чаще определялась в ткани опухоли, чем в плазме крови (5 из 10, 1 из 18 наблюдений соответственно; $p = 0,023$), что позволяет предположить наличие вируса в глазу и его неблагоприятную роль в патогенезе РБ.

Ключевые слова: ретинобластома; вирусы герпеса человека; цитомегаловирус; вирус Эпштейна–Барр; полимеразная цепная реакция; иммуноферментный анализ.

Для цитирования: Саакян С.В., Мякошина Е.Б., Кричевская Г.И., Слепова О.С., Пантелеева О.Г., Андрияшин А.Е., Хорошилова-Маслова И.П., Захарова Г.П., Майбогин А.М. Вирусные инфекции и ретинобластома у детей. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(3): 132-134.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-3- 132-134

Saakyan S.V., Myakoshina E.B., Krichevskaya G.I., Slepova O.S., Panteleeva O.G., Andryushin A.E.,
Khoroshilova-Maslova I.P., Zakharova G.P., Maybogin A.M.

VIRAL INFECTIONS AND RETINOBLASTOMA IN CHILDREN

Helmholtz Moscow Research Institute of Eye Diseases, Moscow, 105062, Russian Federation

In this work, the results of a comprehensive laboratory examination of 37 children with retinoblastoma were described. The presence of IgM-, IgA-, IgG- antibodies to the herpes simplex virus types 1 and 2, cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr virus (EBV), human herpes virus (HHV) type 6, *Toxoplasma gondii*, *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in the serum was tested using ELISA. In the polymerase chain reaction the DNA of these pathogens were detected in the blood plasma of 18 patients and tumor biopsy specimens from 10 eyes. The results showed that children with RB were predominantly infected by the herpesviruses, among which prevailed CMV. In 4 of 5 enucleated eyes the DNA of herpesvirus [CMV (2 eyes), EBV (1 eye), HHV 6 (1 eye)] and *Ureaplasma urealyticum* (1 eye) were also present in tumor tissue. Nucleic acid of infectious microorganisms were considerably more often detected in the tumor tissue than in plasma (5 of 10, 1 of 18, respectively; $p = 0.023$), suggesting thereby the presence of the virus in the eye and its adverse role in the pathogenesis of the RB.

Key words: retinoblastoma; human herpesvirus; cytomegalovirus; Epstein–Barr virus; human herpesvirus 6; polymerase chain reaction; ELISA.

For citation: Saakyan S.V., Myakoshina E.B., Krichevskaya G.I., Slepova O.S., Panteleeva O.G., Andryushin A.E., Khoroshilova-Maslova I.P., Zakharova G.P., Maybogin A.M. Viral infections and retinoblastoma in children. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(3): 132-134. (In Russ.).

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-3- 132-134

For correspondence: Elena B. Myakoshina, Candidate of Medicine, Research Scientist, Department of Ocular Oncology and Radiology, Helmholtz Moscow Research Institute of Eye Diseases, Moscow, 105062, Russian Federation, E-mail: myakoshina@mail.ru

Funding. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 11 November 2015
Accepted 19 November 2015

Введение

Ретинобластома (РБ) – злокачественная опухоль сетчатки у детей [1–5]. В настоящее время существует гипотеза о возникновении наследственной двусторонней формы РБ вследствие мутации гена *RBI* [6]. Монокулярная форма РБ рассматривается многими авторами как спорадическое заболевание, причины возникновения которого до сих пор не

изучены. Многие вирусы способны вызывать злокачественную трансформацию клеток хозяина [7–13]. Например, описаны лимфома орбиты, вызванная герпесвирусом человека 4 (HHV-4, или вирус Эпштейна–Барр) (Herpesvirales, Herpesviridae, Lymphocryptovirus) [9], и экстранодальная маргинальноклеточная лимфома, вызванная *Chlamydoiphila psittaci* [10].

Для корреспонденции: Мякошина Елена Борисовна, канд. мед. наук, научный сотрудник отдела офтальмоонкологии и радиологии ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России, 105062, г. Москва, E-mail: myakoshina@mail.ru

Целенаправленное изучение влияния инфекционных агентов на развитие РБ до настоящего времени не проводили.

Цель исследования – определить наличие ДНК возбудителей распространенных хронических офтальмотропных инфекций в плазме крови и биоптатах опухоли у детей с РБ для оценки возможного их влияния на бластогенез.

Материал и методы

Обследовали оба глаза у 37 детей (14 девочек и 23 мальчика) в возрасте от 5 до 69 (в среднем $39 \pm 1,1$) мес с бинокулярной (3) и монокулярной (34) формами РБ. Опухолевое поражение диагностировали в 40 из 74 исследуемых глаз.

Всем пациентам под наркозом осуществляли комплексное офтальмологическое обследование с использованием ретинальной педиатрической камеры Ret Cam, ультразвукового исследования, оптической когерентной томографии.

В настоящее время принята международная классификация РБ (ICRB, 2001 Амстердам), предусматривающая разделение опухоли на **группу А** (маленькие интратретинальные опухоли, не распространяющиеся на центральную ямку сетчатки и диск зрительного нерва (ДЗН), размером 3 мм и менее, ограниченные сетчаткой и расположенные минимум в 3 мм от фovea и в 1,5 мм от ДЗН), **группу В** (все остальные, отдельно лежащие опухоли, ограниченные сетчаткой, не вошедшие в группу А, с наличием связанной с опухолью жидкости в субретинальном пространстве, менее чем в 3 мм от опухоли при отсутствии субретинальных опухолевых отсеков), **группу С** (отдельные локализованные опухоли с минимальным обсеменением субретинального пространства или стекловидного тела менее чем в 3 мм от очага опухоли, с наличием жидкости в субретинальном пространстве, занимающей до 1/4 площади сетчатки), **группу D** (диффузно-распространенная опухоль со значительным обсеменением субретинального пространства или стекловидного тела в виде «сальных» отсеков или аваскулярных опухолевых масс с полной отслойкой сетчатки), **группу E** (наличие опухоли, прилежащей к хрусталику, расположенной впереди от передней поверхности стекловидного тела, захватывающей цилиарное тело или передний сегмент глаза, сопровождающейся неоваскулярной глаукомой, непрозрачностью стекловидного тела из-за кровоизлияния, некрозом опухоли с асептическим целлюлитом орбиты, фтизисом глаза, отсутствием шансов на сохранение зрения).

Опухоль группы А диагностировали в 2 глазах, группы В – в 5, группы С – в 2, группы D – в 7, группы E – в 24 (по международной АВС-классификации, 2001).

По показаниям проводили энуклеацию 10 глаз с далекозашедшей стадией РБ. Одновременно брали биоптат опухоли для исследования в полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Диагноз РБ подтвердили гистологически.

Комплексное лабораторное обследование выполняли для выявления системных и локальных (внутриглазных) инфекций, их активности. Сыворотки крови всех 37 детей исследовали в иммуноферментном анализе (ИФА) на наличие IgM-, IgA-, IgG- антител к вирусу простого герпеса 1-го и 2-го типов (ВПГ-1, ВПГ-2), цитомегаловирусу (ЦМВ), вирусу Эпштейна–Барр (ВЭБ), вирусу герпеса человека 6-го типа (ВГЧ-6), токсоплазме гондии, токсокаре канис, микоплазме гоминис и уреоплазме уреалитикум. В ПЦР в реальном времени определяли наличие ДНК этих патогенов в плазме крови (18 пациентов) и биоптатах опухоли (10 глаз). В ИФА и ПЦР использовали коммерческие сертифицированные наборы производства ЗАО «Вектор-Бест», пос. Кольцово.

Результаты

Результаты исследований показали наличие IgG-антител к ВПГ-1 и ВПГ-2 в сыворотке крови у 13 (35,1%) из 37 пациентов, причем у детей моложе 8 мес при однократном обследовании было трудно отличить перенесенную инфекцию от трансплацентарно переданных материнских антител, что

потребовало наблюдения в динамике. IgM-ВПГ-антитела (маркеры первичной инфекции) не выявлены; IgG-антитела к ранним антигенам ВПГ (маркеры активации инфекции) детектировали у 10 детей старше 1 года.

В сыворотке 22 (59,5%) из 37 детей обнаружили IgG-антитела к ЦМВ (в 1,5 раза чаще, чем к ВПГ).

Серопозитивными к ВЭБ оказались 11 (29,7%) из 37 детей, маркеры атипичной реактивации установлены у 3 (8,1%) из них.

IgG-антитела к токсоплазме обнаружили только у 1 (2,7%) из 37 пациентов в очень низком недиагностическом титре (16 МЕ/мл).

Инфицированность токсокарой выявили у 4 (10,8%) из 37 детей. Диагностический уровень антител к ней (1:800) отмечен только у 1 мальчика в возрасте 26 мес, у которого позднее РБ подтвердили гистологически.

Хламидийную инфекцию обнаружили у 3 (8,1%) детей в возрасте от 12 до 19 мес, причем у 2 из них титры IgG-антител были высокие (1:80), а у 1 – низкие (1:10). Редко выявляли антитела к уреоплазме (1 (2,7%) из 37 детей) и микоплазме (2 (5,4%) из 37 детей). Заражение возбудителями урогенитальных инфекций происходило, вероятнее всего, во время родов или в постнатальном периоде при тесном контакте с матерью.

При проведении ПЦР в 5 из 10 биоптатов опухоли выявляли инфекционную ДНК: ЦМВ (2 глаза), ВЭБ (1 глаз), ВГЧ-6 (1 глаз), уреоплазмы уреалитикум (1 глаз); одновременно ДНК двух или более патогенов в одной опухоли не обнаруживали. В целом геномы микроорганизмов в ткани опухоли определяли достоверно чаще, чем в плазме крови (5 из 10, 1 из 18 наблюдений соответственно; $p = 0,023$).

Результаты ПЦР-исследования плазмы и ткани опухоли совпали у 1 ребенка (16 мес): в обоих образцах присутствовала ДНК ЦМВ. Серологический анализ выявил хроническую ЦМВ-инфекцию (высокие уровни IgG-ЦМВ-антител) с наличием антител-маркеров реактивации вируса, в стекловидном теле больного глаза также обнаружили IgG-антитела к ЦМВ. Следует подчеркнуть, что этот ребенок был по данным серологии инфицирован только ЦМВ. Полученные результаты позволяют предположить у него не только системную хроническую ЦМВ-инфекцию, но и, возможно, внутриглазную репликацию вируса (наличие ДНК ЦМВ в опухолевой ткани и IgG-противовирусных антител в стекловидном теле), что могло неблагоприятно сказаться на динамике опухолевого роста.

ДНК ВЭБ обнаружили в ткани опухоли у ребенка (32 мес) с серологическими маркерами реактивации хронических ЦМВ- и ВЭБ-инфекций. Еще у 1 мальчика (14 мес) в опухоли присутствовала ДНК ВГЧ 6-го типа, антитела к другим герпесвирусам в сыворотке не выявляли.

Трудно объяснить результаты обследования девочки 7 мес, серонегативной ко всем исследованным возбудителям, у которой в биоптате опухоли была обнаружена ДНК уреоплазмы уреалитикум. Хотя в литературе имеются сообщения о противоречивых результатах серологии и ПЦР при диагностике ВГЧ-6-инфекции [14], в подобных случаях нельзя полностью исключить ложноположительный ответ в ПЦР-анализе.

Обсуждение

В настоящее время активно обсуждается роль вирусов в бластогенезе. Имеются сообщения о детекции генома вируса папилломы человека (ВПЧ) в тканях опухоли при раке гортани [17], ВЭБ и ВПЧ при раке органов полости рта [18, 19], уреоплазмы уреалитикум при раке шейки матки [20]. Другие исследователи полагают, что малигнизация опухолей простаты повышается у людей с генетическими особенностями ответа на инфекцию и воспаление [21].

РБ – злокачественная опухоль сетчатки, наблюдаемая у детей раннего возраста. Ее возникновению способствует мутация в одном из аллелей гена-супрессора опухолевого роста (*Rb1*).

Двусторонние формы РБ обусловлены наследственными факторами, односторонние относят к спорадическим заболеваниям, причины возникновения которых не вполне ясны [1–5, 16].

Белок РБ, кодируемый геном *Rb1*, существенно влияет на регуляцию роста и дифференцировки клеток, являясь супрессором опухолевого роста. Установлено, что некоторые вирусы, в частности ЦМВ, оказывают супрессивное действие на белок РБ, значительно увеличивая риск возникновения опухоли [12]. Ранее мы обнаружили, что в группе детей с РБ число пациентов, инфицированных ЦМВ, в 2 раза больше по сравнению с детьми с воспалительными заболеваниями глаз аналогичного возраста [15]. Результаты проведенных исследований показали, что дети с РБ инфицированы преимущественно ВГЧ, среди которых преобладает ЦМВ. Помимо этого, серологические маркеры реактивации ВЭБ выявляли только у детей с РБ [8].

Инфицированность токсокарой определяли у 4 (10,8%) из 37 детей. Клинически некоторые формы глазного токсокароза напоминают РБ, серологический анализ на токсокароз входит в комплекс их дифференциальной диагностики [15]. Очевидно, этот тест выявляет токсокарозную инфекцию, но не является абсолютным доказательством токсокарозной этиологии заболевания. Глистная инвазия, влияя на иммунную систему ребенка, может, по-видимому, способствовать более агрессивному течению опухолевого процесса.

В 4 из 5 энуклеированных глаз в ткани опухоли также присутствовала ДНК герпесвирусов и только в одном случае – ДНК уреоплазмы уреаплазматиком. Нуклеиновая кислота инфекционных микроорганизмов существенно чаще определялась в ткани опухоли, чем в плазме крови (5 из 10, 1 из 18 наблюдений соответственно; $p = 0,023$), что позволяет предположить наличие вируса в глазу и его неблагоприятную роль в патогенезе РБ.

Таким образом, первый опыт комплексного лабораторного обследования сыворотки крови в ИФА на наличие офтальмотропных инфекций у 37 детей с РБ и ПЦР в реальном времени с выявлением ДНК этих патогенов в плазме крови (18) и биоптатах опухоли (10) показал преимущественную инфицированность вирусами группы герпеса, среди которых преобладал ЦМВ. Кроме того, в половине случаев в биоптате опухоли также выявляли ДНК герпесвирусов, что позволило нам предположить их возможное влияние на бластогенез.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 4–6, 9–13, 20, 21 с.м. REFERENCES)

1. Бровкина А.Ф. *Офтальмоонкология*. М.: Медицина; 2002.
2. Саакян С.В. *Ретинобластома (клиника, диагностика, лечение)*. М.: Медицина; 2005.
3. Пантелеева О.Г. *Ретинобластома: прогностическая значимость клинических симптомов, эффективность комбинированного лечения*: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. М.; 1997.
7. Копнин Б.П. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза. *Биохимия*. 2000; 65(1): 5–33.
8. Кричевская Г.И., Слепова О.С., Саакян С.В., Мякошина Е.Б., Денисова Е.В. К вопросу о роли инфекций в патогенезе ретинобластомы. *Российский офтальмологический журнал*. 2013; (2): 37–41.
14. Миронкова Е.А., Макаров П.В., Слепова О.С., Гундорова Р.А., Кугушева А.Э., Демкин В.В. и др. Инфицированность донорского материала вирусами группы герпеса как возможная причина развития болезни трансплантата при сквозной кератопластике. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2012; XIV(4): 48–51.
15. Катаргина Л.А., Хватова А.В. *Эндогенные увеиты у детей и подростков*. М.: Медицина; 2000.
16. Скрыбина О.А. *Иммунодиагностика и иммунокоррекция T-активных ретинобластом у детей*: Дисс. ... канд. мед. наук. М.; 1990.
17. Шилова О.Ю., Уразова Л.Н., Мухамедов М.Р., Черемисина О.В., Евтушенко В.А., Чойзонов Е.Л. Рак гортани: ретроспективное исследование. *Сибирский онкологический журнал*. 2009; (прил. 2): 227–8.

18. Светицкий П.В., Златник Е.Ю., Зыкова Т.А., Нистратов Г.П., Аединова И.В., Волкова В.Л. и др. Течение рака органов полости рта с учетом ассоциированности с вирусом Эпштейна–Барр, папилломы человека и уровня некоторых цитокинов. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2014; (11): 120–2.
19. Нистратов Г.П., Светицкий П.В., Зыкова Т.А., Аединова И.В., Волкова В.Л., Баужадзе М.В. и др. Влияние вирусов Эпштейна–Барр и папилломы человека на течение рака органов полости рта. *Современные проблемы науки и образования*. 2014; (6). Available at: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=16497>

REFERENCES

1. Brovkina A.F. *Ophthalmooncology [Oftal'moonkologiya]*. Moscow: Meditsina; 2002. (in Russian)
2. Saakyan S.V. *Retinoblastoma (clinical features, diagnosis, treatment) [Retinoblastoma (klinika, diagnostika, lechenie)]*. Moscow: Meditsina; 2005. (in Russian)
3. Panteleeva O.G. *Retinoblastoma: Prognostic Significance of Clinical Symptoms, the Efficacy of Combined Treatment*: Diss. Moscow; 1997. (in Russian)
4. Aerts I., Le Rouic L.L., Gauthier-Villars M., Brisse H., Doz F., Desjardins L. Retinoblastoma. *Orphanet J. Rare Dis.* 2006; 1 (31): 1750–9.
5. Doz F. Retinoblastoma: a review. *Arch. Pediatr.* 2006; 13 (10): 1329–37.
6. Knudson A.G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1971; 68 (4): 820–3.
7. Kopnin B.P. Targets of Oncogenes and Tumor Suppressors: Key for Understanding Basic Mechanisms of Carcinogenesis. *Biochemistry (Moscow)*. 2000; 65(1): 2–28.
8. Krichevskaya G.I., Slepova O.S., Saakyan S.V., Myakoshina E.B., Denisova E.V. The role of infection in the pathogenesis of retinoblastoma. *Rossiyskiy oftal'mologicheskii zhurnal*. 2013; (2): 37–41. (in Russian)
9. Auw-Hädrich C., Göbel N., Illerhaus G. Infection agents in ocular adnexal tumours. *Klin. Monbl. Augenheilkd.* 2010; 227 (7): 530–7.
10. Goebel N., Serr A., Mittelviehhaus A.H., Reinhard T., Bogdan C., Auw-Hädrich C. Chlamydia psittaci, Helicobacter pylori and ocular adnexal lymphoma – is there an association? The German experience. *Leuk. Res.* 2007; 31 (10): 1450–2.
11. Orjuela M.A., Castaneda V.P., Ridaura C., Lecona E., Leal C., Abramson D.H. et al. Prevalence of human papilloma virus in tumor tissue from children with retinoblastoma: an alternative mechanism for tumor development. *Clin. Cancer Res.* 2000; 6(10): 4010–6.
12. Sage J. The retinoblastoma tumor suppressor and stem cell biology. *Genes Dev.* 2012; 26 (13): 1409–20.
13. Liu X., Tang X., Zhang S., Wang Y., Wang X., Zhao C. et al. Methylation and expression of retinoblastoma and transforming growth factor- β 1 genes in Epstein-Barr virus-associated and negative gastric carcinomas. *Gastroenterol. Res. Pract.* 2012; 2012: 906017.
14. Mironkova E.A., Makarov P.V., Slepova O.S., Gundorova R.A., Kugusheva A.E., Demkin V.V. et al. HIV status of the donor material by the herpes viruses as a possible cause of the disease transplant in penetrating keratoplasty. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov*. 2012; XIV(4): 48–51. (in Russian)
15. Katargina L.A., Khvatova A.V. *Endogenous Uveitis in Children and Adolescents [Endogennye uveity u detey i podrostkov]*. Moscow: Meditsina; 2000. (in Russian)
16. Skryabina O.A. *Immunodiagnosics and Immunotherapy of T-active Retinoblastoma in Children*: Diss. Moscow; 1990. (in Russian)
17. Shilova O.Yu., Urazova L.N., Mukhamedov M.R., Cheremisina O.V., Evtushenko V.A., Choyzonzov E.L. Laryngeal cancer: a retrospective study. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal*. 2009; (Suppl. 2): 227–8. (in Russian)
18. Svetitskiy P.V., Zlatnik E.Yu., Zykova T.A., Nistratov G.P., Aedinova I.V., Volkova V.L. et al. For cancer of the oral cavity with regard to Association with the Epstein-Barr, human papilloma and the level of some cytokines. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*. 2014; (11): 120–2. (in Russian)
19. Nistratov G.P., Svetitskiy P.V., Zykova T.A., Aedinova I.V., Volkova V.L., Bauzhadze M.V. et al. The effect of Epstein-Barr and human papilloma on the course of cancer of the oral cavity. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2014; (6). Available at: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=16497> (in Russian)
20. Xiaolei C., Taot H., Zongli S., Hongying Y. The role of ureaplasma urealyticum infection in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 2014; 35(5): 571–5.
21. Yow M.A., Tabrizi S.N., Severi G., Bolton D.M., Pedersen J., Longano A. et al. Detection of infectious organisms in archival prostate cancer tissues. *BMC Cancer*. 2014; 14: 579–82.