

БЕТА-ГЕРПЕС-ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ У ПАЦИЕНТОВ С КОЖНОЙ ФОРМОЙ ОСТРОЙ РЕАКЦИИ «ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА»

В.В. Байков¹, И.С. Моисеев¹, А.Ю. Петрова², Е.В. Лисукова¹, И.Э. Белоусова³, И.О. Смирнова⁴, И.Н. Теличко²

¹ Научно-исследовательский институт детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

² Кожно-венерологический диспансер № 4, Санкт-Петербург, Россия

³ Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Beta herpes viruses in patients with cutaneous graft-versus-host disease

V.V. Baykov¹, I.S. Moiseev¹, A.Yu. Petrova², E.V. Lisukova¹, I.E. Belousova³, I.O. Smirnova⁴, I.N. Telichko²

¹ Science Research Institute of pediatric oncology, hematology and transplantation named after R.M. Gorbacheva, First Saint-Petersburg State Medical University named after academician I.P. Pavlov, Saint-Petersburg, Russia

² Dermatovenereology outpatient clinic № 4, Saint-Petersburg, Russia

³ Military Medical Academy named after S.M. Kirov, Saint-Petersburg, Russia

⁴ Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

Резюме

Кожная реакция «трансплантат против хозяина» является опасным осложнением аллогенной трансплантации костного мозга, в патогенезе и течении которого особую роль уделяют бета-герпес-вирусным поражениям.

Цель исследования — выявить наличие признаков поражения бета-герпес-вирусами в биоптатах кожи пациентов с кожной формой острой реакции «трансплантат против хозяина».

Материалы и методы. Проведена оценка клинических данных больных с кожной формой острой реакции «трансплантат против хозяина» (50 пациентов). В биоптатах кожи методом ПЦР выделена вирусная ДНК цитомегаловируса и герпес вируса 6 типа.

Результаты. При оценке клинических данных совместно с признаками бета-герпес-вирусных поражений была выявлена корреляция между наличием герпес-вируса 6 типа и неблагоприятным прогнозом заболевания.

Заключение. Определение наличия бета-герпес-вирусных поражений в коже пациентов, перенесших аллогенную трансплантацию костного мозга, может являться важным прогностическим фактором течения посттрансплантационного периода.

Ключевые слова: реакция «трансплантат против хозяина», кожа, бета-герпес-вирусная инфекция, цитомегаловирус, герпес-вирус 6 типа.

Введение

Кожная реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ) является опасным осложнением аллогенной трансплантации костного мозга, требующим быстрой и точной диагностики. При

Abstract

Graft-versus-host disease is a major complication of allogenic bone marrow transplantation. Beta herpes viruses' role in pathogenesis and prognosis of graft-versus-host disease is significant.

Objective: To study beta herpes viruses evidence in skin biopsy specimens in graft-versus-host disease patients.

Material and methods: Clinical features of 50 patients with cutaneous graft-versus-host disease were examined. Cytomegalovirus and human herpes virus 6 DNA detection in skin biopsy specimens was performed by PCR.

Results: Correlation between human herpes virus 6 and poor prognosis in graft-versus-host disease patients has been found.

Conclusion: Beta herpes virus detection after allogenic bone marrow transplantation could be important in prognosis of graft-versus-host disease.

Key words: cutaneous graft-versus-host disease, beta herpes viruses, cytomegalovirus, human herpes virus 6.

острой РТПХ наиболее часто поражаются кожа, слизистые оболочки, внутренние органы (печень, желудочно-кишечный тракт). Летальность может достигать 80%, при этом наиболее часто РТПХ начинается с кожных проявлений [1].

В последние годы активно исследуется патогенетическая роль инфекционных процессов в развитии РТПХ. Так, например, реактивация вирусов семейства герпеса в посттрансплантационном периоде считается фактором, влияющим на течение острой РТПХ. Процессы реактивации герпес-вирусных инфекций и развития РТПХ часто протекают параллельно и, вероятно, имеют не только общие клинические проявления, но и сложные патогенетические взаимосвязи.

Известно, что при подборе пары донор – реципиент проводят исследование пациентов на предмет носительства цитомегаловирусной (ЦМВ) инфекции – совпадение пары по ЦМВ-статусу считают более благоприятным. ЦМВ относится к семейству β -Herpesviridae и широко представлен в популяции: по данным серологических исследований, к шестому году жизни более 60% населения инфицированы ЦМВ [2]. Клиническая картина ЦМВ-инфекции разнообразна, инфекция может протекать с поражением слюнных желез (локализованная форма), центральной нервной системы, внутренних органов (печень, легкие, желудочно-кишечный тракт), кожи и слизистых оболочек (генерализованная форма), однако наиболее часто встречается латентное течение. ЦМВ-инфекция является важной причиной летальных исходов после ТКМ. Однако ранняя реактивация ЦМВ-инфекции в посттрансплантационном периоде совместно с развитием хронической РТПХ легкой степени тяжести может являться предиктором стойкого ответа «трансплантат против опухоли» у пациентов с острым миелобластным лейкозом [3].

Механизмы противоопухолевого действия ЦМВ-инфекции остаются не выясненными. Известно, что миелоидные клетки костного мозга являются резервуаром латентной ЦМВ-инфекции [4]. Существует вероятность, что цитотоксическое действие Т-лимфоцитов, направленное против антигенов ЦМВ, также оказывает повреждающее воздействие на опухолевые клетки. Кроме того, при стимуляции антигенами ЦМВ повышается цитотоксическая активность НК-клеток [5]. Также описано прямое цитопатическое действие ЦМВ на опухолевые клетки костного мозга – эффект «вирус против опухоли» [6]. При исследовании влияния ЦМВ-инфекции на течение РТПХ было выявлено, что повышение количества ДНК ЦМВ в плазме крови больных острой РТПХ более характерно для пациентов с относительно легким течением РТПХ, чем для тяжелых форм [7].

Большой интерес вызывает взаимосвязь РТПХ и инфекции вирусом герпеса человека 6 типа (HHV6). HHV6 также относится к семейству β -Herpesviridae. Инфицирование HHV6 клинически проявляется так называемой внезапной экзантемой детского возраста. К 18-му месяцу жизни

до 90% населения инфицированы HHV6 [8]. Как и другие вирусы семейства герпеса, HHV6 после первичного инфицирования переходит в латентную форму и может реактивироваться у иммунокомпрометированных пациентов. Так, до 67% пациентов, перенесших аллоТКМ, подвержены реактивации HHV6 в первые месяцы посттрансплантационного периода. Патогенетические особенности HHV6 инфекции остаются невыясненными, но известно, что реактивация вируса ассоциирована с явлениями миелосупрессии, развитием пневмонии, поражением центральной нервной системы, лихорадкой и распространенными высыпаниями на коже [9].

Учитывая особенности проявлений ЦМВ и HHV6-инфекции, такие как температурная реакция, распространенная макуло-папулезная сыпь, поражения внутренних органов (легких, печени, желудочно-кишечного тракта), своевременная диагностика бета-герпес-вирусных инфекций в посттрансплантационном периоде имеет значение не только в качестве прогностического фактора, но и, в отличие от поражений вирусами простого герпеса, крайне важна для проведения клинического дифференциального диагноза острой РТПХ [10].

Цель исследования – выявить наличие признаков поражения бета-герпес-вирусами в биоптатах кожи пациентов с кожной формой острой реакции «трансплантат против хозяина».

Задачи исследования

1. Изучить клинические особенности течения кожной формы острой РТПХ.
2. Определить наличие ДНК ЦМВ и HHV6 в биоптатах кожи пациентов с РТПХ.
3. Выявить возможные корреляции бета-герпес-вирусных поражений с клинической картиной РТПХ.

Материалы и методы

Материалом исследования были биоптаты кожи 50 пациентов с кожной формой острой РТПХ (медиана возраста 27), находившихся на лечении в НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова. Диагноз РТПХ устанавливался на основании стандартизированных международных критериев [11]. Заключение по биоптатам кожи было сформулировано на основе консенсуса двух специалистов-патоморфологов. Ретроспективно были изучены карты стационарных больных: учитывали пол и возраст пациентов, наличие клинико-гематологической ремиссии на момент аллоТКМ, степень родства

донора костного мозга, режим кондиционирования, сроки развития РТПХ, клиническую степень тяжести РТПХ, характер элементов кожной сыпи, наличие температурной реакции, наличие ДНК ЦМВ в плазме периферической крови больных, вовлечение внутренних органов, исход заболевания.

На материале биоптатов кожи пациентов с РТПХ было произведено иммуногистохимическое исследование с использованием антител к ядерным белкам ЦМВ (клоны DDG9+CCN2, DAKO) и ПЦР-исследование на предмет наличия или отсутствия ДНК ЦМВ и HHV6. Выделение молекулы ДНК проводили путем депарафинизации гистологических блоков, тканевого лизиса с последующей двукратной очисткой и осаждением в центрифуге с помощью набора «QiaAmp DNA mini kit» производства Qiagen (Германия), согласно инструкции производителя. ПЦР-анализ проводили в режиме автоматической амплификации на приборе Rotor-Gene Q брлех производства Qiagen (Германия), используя комплекты реагентов для выявления ДНК ЦМВ и HHV6 в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции с гибридно-флуоресцентной детекцией, АмплиСенс® CMV-FL и HHV6-скрин-титр-FL производства «Интерлабсервис» (Россия). Продукты амплификации анализировали с помощью детекции флуоресценции (программа Rotor-Gene Q брлех Priority Package Plus, Австралия). Успешной считали амплификацию, если кривая выходила в логарифмическую фазу до 30-го цикла амплификации. Согласно инструкции, в качестве контроля были использованы внутренний отрицательный и внутренний положительный контрольные образцы. По результатам ПЦР-анализа пациенты были разделены на группы по наличию ДНК ЦМВ и HHV6 в биопсийном материале. Полученные данные были обработаны с помощью программного пакета IBM SPSS Statistics, достоверность различий между группами оценивалась с помощью критерия χ^2 . Результаты для качественных признаков представлены в виде доли (в процентах). Различия считались достоверными при значении $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При оценке общей структуры клинических признаков острой РТПХ с поражением кожи были получены следующие результаты: среди 50 пациентов с кожной формой острой РТПХ 52% пациентов были мужского пола и 48% женского. Медиана возраста составила 27 лет. На момент проведения аллотКМ 52% больных находились в клинико-гематологической ремиссии. 70% пациентов имели неродственного донора, у 30% пациентов аллотКМ была родственной. Миелоаблативный режим кондиционирования был использован в 48% случаев.

У 46% больных острая РТПХ развилась в течение первых 30 дней посттрансплантационного периода, у 54% – позже. Острая РТПХ 1–2-й степени диагностирована у 52% больных, у 48% тяжесть РТПХ достигала 3–4-й степени. 68% больных имели температурную реакцию. У 24% пациентов при ПЦР-исследовании плазмы периферической крови была выявлена ДНК ЦМВ. У 28% пациентов было выявлено поражение внутренних органов, связанное с РТПХ: 18% страдали острой РТПХ с поражением желудочно-кишечного тракта и 10% – острой РТПХ с поражением печени. По окончании госпитализации 48% пациентов продолжали болеть, 32% выписаны с улучшением состояния и 20% погибли.

При морфологическом исследовании биоптатов не выявлено признаков цитопатических эффектов ДНК-содержащих вирусов. При иммуногистохимическом исследовании ни в одном наблюдении не обнаружено клеток с экспрессией ядерных белков ЦМВ.

ДНК ЦМВ обнаружена в биоптатах кожи 3 из 50 больных с острой РТПХ: один пациент страдал острым миелобластным лейкозом, второй – острым лимфобластным лейкозом, третий – апластической анемией. При разделении пациентов на группы ЦМВ(+) и ЦМВ(-) выявлено, что в группе ЦМВ(+) наблюдалась РТПХ легкой степени тяжести, при этом летальных исходов зафиксировано не было. У всех пациентов группы ЦМВ(+) в момент госпитализации был выявлен положительный титр ДНК ЦМВ в плазме периферической крови. ДНК HHV6 была обнаружена у семи пациентов, на основании данного признака больные были разделены на группы HHV6(+) и HHV6(-). Все больные группы HHV6(+) страдали острыми лейкозами: четыре пациента – острым миелобластным, три пациента – острым лимфобластным. При сравнении групп по всем клиническим признакам достоверные отличия были обнаружены только в исходе заболевания: среди пациентов группы HHV6(+) 43% умерли, в то время как в группе HHV6(-) летальный исход зафиксирован у 16% больных ($p < 0,05$).

При морфологическом исследовании биоптатов кожи не определялись признаки цитопатических эффектов, свойственных ДНК-содержащим вирусам семейства герпеса. Иммуногистохимическое исследование ни в одном наблюдении не обнаружило клеток с экспрессией ядерных белков ЦМВ, в том числе в наблюдениях с положительным результатом ПЦР.

При анализе клинических данных выявлено, что у пациентов группы ЦМВ(+) течение РТПХ было более легким, а прогноз – благоприятным, но из-за недостаточной численности этой группы (трое больных из 50) результаты оказались статистически незначимыми. При несомненной важности реактивации ЦМВ в посттрансплантационном

периоде, обнаружение вирусной ДНК в органах-мишенях РТПХ, включая кожу, не обладает достаточной чувствительностью. По данным Appleton, только у 1 из 56 больных с подтвержденной ЦМВ-инфекцией (ПЦР-анализ образцов периферической крови) были выявлены фрагменты вирусной ДНК в биоптатах кожи [7]. Иммуногистохимическое обнаружение ЦМВ в биоптатах кожи больных РТПХ также не дает убедительных результатов: по данным Horn, ни у одного из 21 больного РТПХ с доказанной реактивацией ЦМВ-инфекции не было выявлено позитивное окрашивание антителами к ЦМВ в парафиновых срезах [12].

Исследование HHV6 в тканях пациентов, перенесших аллотКМ, по-видимому, является перспективным методом оценки прогноза течения посттрансплантационного периода. Известно, что летальность, не связанная с рецидивом основного заболевания, значительно увеличивается среди пациентов с HHV6-положительным статусом [13]. По результатам настоящего исследования прогноз среди пациентов группы HHV6(+) был достоверно хуже, чем среди больных группы HHV6(-): более 40% пациентов, в биопсийном материале которых была выявлена ДНК HHV6, погибли. Несмотря на отсутствие достоверных различий в группах HHV6(+) и HHV6(-) по тяжести течения РТПХ, в литературе существуют данные о значительном влиянии HHV6 на данный показатель. Так, было продемонстрировано, что при исследовании с помощью иммуногистохимии и ПЦР периферической крови и биоптатов кожи пациентов больных с РТПХ, HHV6 был выявлен более чем у 70% больных: у 92% пациентов с тяжелой формой и у 56% — с легким течением [14]. В последние годы активно исследуется роль HHV6 как предиктора РТПХ: наличие HHV6 в периферической крови пациентов с неродственной аллотКМ или немиелоаблативным режимом кондиционирования в анамнезе трансплантации, достоверно повышает риск развития РТПХ 3–4-й стадии [15, 16]. Особое внимание уделяют срокам реактивации герпес-вирусных инфекций: выявлено, что при обнаружении HHV6 на 30-й день после ТКМ риск развития острой РТПХ возрастает независимо от других условий [17].

Литература

- Jacobsohn D.A., Vogelsang G. Acute graft versus host disease // *Orphanet Journal of Rare Diseases*. — 2007. — Vol. 4. — N.2. — P. 35
- Lancini D., Flower R., Hogan C. Cytomegalovirus disease in immunocompetent adults // *The Medical Journal of Australia*. — 2014. — Vol. 201. — N.10. — p. 578-580.
- Jang J.E., Cheong J.W., Hyun S.Y., Kim Y.D., Kim Y.R., Kim J.S., Min Y.H. Early CMV replication and subsequent chronic GVHD have a significant anti-leukemic effect after allogeneic HSCT in acute myeloid leukemia // *Annals of hematology*. — 2015. — Vol. 94. — N.2. — p. 275-282.
- Hermouet S., Rose T.M., Greenblatt R.J., Corre I., Garand R., Neves A.M., Bataille R., Casey J.W. Qualitative and quantitative analysis of human herpesviruses in chronic and acute B cell lymphocyticleukemia and in multiple myeloma // *Leukemia*. — 2003. — Vol. 17. — p. 185-195.
- Elmaagacli A.H., Koldehoff M., Hegerfeldt Y., Trenschel R., Ditschkowski M., Christoph S., Gromke T., Kordeas L., Ottinger H.D., Ross R.S., Horn P.A., Schnittger S., Beelen D.W. Early human cytomegalovirus replication after transplantation is associated with a decreased relapse risk: evidence for a putative virus-versus-leukemia effect in acute myeloid leukemia patients // *Blood*. — 2011. — Vol. 118. — p. 1402-1412.
- Barrett A.J. CMV: when bad viruses turn good // *Blood*. — 2011. — Vol. 118. — N.5. — p. 1193-1194.
- Appleton A.L., Peiris J.S., Taylor C.E., Wilkes J., Green M.A., Pearson A.D., Proctor S.J., Hamilton P.J., Cant A.J. Role of target organ infection with cytomegalovirus in the pathogenesis of graft-versus-host disease // *Bone Marrow Transplantation*. — 1995. — Vol. 15. — N.4. — p. 557-561.
- Pichereau C., Janin A., Scieux C., Peffault de Latour R., Xhaard A., Robin M., Ribaud P., Agbalika F., Chevret S., Socie G. The complex relationship between human herpesvirus 6 and acute graft-versus-host disease // *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. — 2012. — Vol. 18. — N.1. — p. 141-144.
- Wang L.R., Zhang M.J., Lu D.P. Correlations of human herpesvirus 6B and CMV infection with acute GVHD in recipients of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation // *Bone Marrow Transplantation*. — 2008. — Vol. 42. — N.10. — p. 673-677.
- Yoshikawa T., Ohashi M., Suga S., Asano Y., Miyazaki H., Hirano M., Suzuki K., Matsunaga K., Horibe K., Kojima S., Kudo K., Kato K., Matsuyama T., Nishiyama Y. Correlation between HHV-6 infection and skin rash after allogeneic bone marrow transplantation // *Bone Marrow Transplantation*. — 2001. — Vol. 28. — N.1. — p. 77-81.
- Przepiora D., Martin P. Consensus Conference on Acute GVHD Grading // *Bone Marrow Transplantation*. — 1995. — Vol. 15. — N.6. — p. 825-828.
- Horn T.D., Vogelsang G.B., Wingard J.R., Santos G.W. Cutaneous graft-versus-host reaction lacks evidence of cutaneous cytomegalovirus by the immunoperoxidase technique // *Journal of Investigative Dermatology*. — 1989. — Vol. 93. — N.1. — p. 92-95.
- de Pagter P.J., Visscher H., de Vos M., Bierings M., van Loon A.M., Uiterwaal C.S., van Baarle D., Sanders E.A., Boelens J. Human herpes virus 6 plasma DNA positivity after hematopoietic stem cell transplantation in children: an important risk factor for clinical outcome // *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. — 2008. — Vol. 14. — N.7. — p. 831-839.
- Appleton A.L., Peiris J.S., Taylor C.E., Wilkes J., Green M.A., Pearson A.D., Kelly P.J., Malcolm A.J., Proctor S.J. Human herpes virus-6 infection in marrow graft recipients: role in pathogenesis of graft-versus-host disease. Newcastle upon Tyne Bone Marrow Transport Group // *Bone Marrow Transplantation*. — 1995. — Vol. 16. — N.6. — p. 777-782.
- Dulery R., Dewilde A., Rossignol J., Boyle E.M., Gay J., de Berranger E., Coiteux V., Jouet J.P., Duhamel A., Yakoub-Agha I. Early human herpesvirus type 6 reactivation after allogeneic stem cell transplantation: a large-scale clinical study // *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. — 2012. — Vol. 18. — N.7. — p. 1080-1089.
- de Pagter P.J., Keukens L., Schutten M., Cornelissen J.J., van Baarle D., Fries E., Sanders E.A., Minnema M.C., van der Holt B.R., Meijer E., Boelens J.J. Human herpes virus 6 reactivation: important predictor for poor outcome after myeloablative, but not non-myeloablative allo-SCT // *Bone Marrow Transplantation*. — 2013. — Vol. 48. — N.11. — p. 1460-1464.

17. Gotoh M., Katagiri S., Suguro T., Asano M., Kitahara T., Akahane D., Okabe S., Tauchi T., Ito Y., Ohyashiki K. Human herpesvirus 6 reactivation on the 30th day after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation can predict grade 2-4 acute graft-versus-host disease // Transplant Infectious Disease. — 2014. — Vol. 16. — N.3. — p. 440-449.

neic hematopoietic stem cell transplantation can predict grade 2-4 acute graft-versus-host disease // Transplant Infectious Disease. — 2014. — Vol. 16. — N.3. — p. 440-449.

Авторский коллектив:

Байков Вагим Валентинович — профессор кафедры патологической анатомии первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, сотрудник научно-исследовательского института детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой, д.м.н.; тел.: 8(812)499-70-43, e-mail: baikov02@mail.ru

Моисеев Иван Сергеевич — заведующий лабораторией трансплантологии научно-исследовательского института детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой, к.м.н.; тел.: 8(812)233-34-80, e-mail: moisiv@mail.ru

Петрова Анна Юрьевна — врач-дерматовенеролог Кожно-венерологического диспансера № 4; тел.: 8(812)432-73-25, e-mail: anna.petrova@doctor.com

Лисукова Елена Владимировна — старший научный сотрудник научно-исследовательского института детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой, к.м.н.; тел.: 8(812) 233-34-80, e-mail: igor.lisukov@mail.ru

Белоусова Ирена Эдуардовна — доцент кафедры кожных и венерических болезней Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, д.м.н.; тел.: 8(812)329-71-36, e-mail: irena.belousova@mail.ru

Смирнова Ирина Олеговна — профессор кафедры инфекционных болезней, эпидемиологии и дерматовенерологии медицинского факультета Санкт-Петербургского государственного университета, д.м.н.; тел.: 8(812)321-37-80, e-mail: driosmirnova@yandex.ru

Теличко Игорь Николаевич — главный врач Кожно-венерологического диспансера № 4, д.м.н., профессор; тел.: 8(812)432-73-25, e-mail: itelichko@yandex.ru