

DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-3-14-24



Маркеры вируса Эпштейна–Барр в оценке клинического состояния российских больных раком носоглотки

К.В. Смирнова^{1,2}, Н.Б. Сенюта¹, И.В. Ботезату¹, А.В. Игнатова^{3,4}, Т.Е. Душенькина¹,
А.А. Золотарев³, А.В. Лихтенштейн¹, В.Э. Гурцевич¹

¹Научно-исследовательский институт канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1;

³ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного образования» Минздрава России; Россия, 125993 Москва, ул. Баррикадная, 2/1, стр. 1;

⁴ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»; Россия, 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

Контакты: Ксения Валерьевна Смирнова skv.lab@yandex.ru

Введение. В эндемичных и неэндемичных по раку носоглотки (РНГ) регионах мира в одинаковой степени широко распространено инфицирование населения вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ). Высокие показатели заболеваемости РНГ в эндемичных странах и низкие в неэндемичных предполагают наличие различных механизмов и условий возникновения опухоли и, возможно, различную клиническую значимость ВЭБ-ассоциированных маркеров для данного новообразования. Однако значимость этих маркеров для определения РНГ в неэндемичных регионах до сих пор остается малоизученной.

Цель исследования – определить клиническую значимость титров IgG/IgA-антител к капсидному антигену ВЭБ и концентраций ДНК этого вируса в плазме крови больных в качестве диагностических и мониторинговых маркеров РНГ в неэндемичном регионе России.

Материалы и методы. Титры ВЭБ-специфических антител определяли методом непрямой иммунофлуоресценции, а концентрацию вирусной ДНК в плазме измеряли с помощью количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени. Объектами исследования стали больные РНГ ($n = 96$), а в группы контроля вошли доноры крови ($n = 171$) и пациенты с другими опухолями головы и шеи ($n = 33$).

Результаты. Титры IgG/IgA-антител к капсидному антигену ВЭБ, являясь важным диагностическим маркером рака носоглотки, не всегда коррелировали с клиническим состоянием больных. Гуморальный ответ на возникающие события часто запаздывал из-за инерции иммунной системы. Показатели же концентрации ДНК ВЭБ в плазме крови пациентов четко отражали динамику патологического процесса, снижались до фоновых значений в состоянии ремиссии и возрастали при прогрессировании заболевания. В отличие от эндемичных регионов корреляция между изучаемыми маркерами ВЭБ и клиническими проявлениями болезни, оцениваемыми в соответствии с классификацией TNM (Tumor, Nodus and Metastasis), нами не обнаружена.

Заключение. В неэндемичных странах, таких как Россия, серологические и молекулярные маркеры ВЭБ могут быть с успехом использованы для первичной диагностики РНГ. Однако для мониторинга заболевания лучше применять показатели концентрации циркулирующей ДНК ВЭБ, которые в отличие от значений титров IgG/IgA-антител к капсидному антигену ВЭБ более точно отражают клиническое состояние пациентов.

Ключевые слова: вирус Эпштейна–Барр, рак носоглотки, титры IgG/IgA-антител к вирусному капсидному антигену, полимеразная цепная реакция в реальном времени, концентрация ДНК вируса Эпштейна–Барр в плазме крови

Для цитирования: Смирнова К.В., Сенюта Н.Б., Ботезату И.В. и др. Маркеры вируса Эпштейна–Барр в оценке клинического состояния российских больных раком носоглотки. Успехи молекулярной онкологии 2021;8(3):14–24. DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-3-14-24.

Markers of Epstein–Barr virus in clinical assessment of Russian patients with nasopharyngeal cancer

K. V. Smirnova^{1,2}, N. B. Senuta¹, I. V. Botezatu¹, A. V. Ignatova^{3,4}, T. E. Dushenkina¹, A. A. Zolotarev³, A. V. Lichtenstein¹, V. E. Gurtsevich¹

¹Research Institute of Carcinogenesis N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1 Ostrovityanova St., Moscow 117997, Russia

³Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Ministry of Health of Russia; Bld. 1, 1/2 Barrikadnaya St., Moscow 125993, Russia;

⁴Peoples' Friendship University of Russia; 6 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117198, Russia

Contacts: Ksenia Valeryevna Smirnova skv.lab@yandex.ru

Introduction. Epstein–Barr virus (EBV) is equally widespread in the endemic and non-endemic world regions for nasopharyngeal cancer (NPC). High incidence of NPC in endemic countries and low in non-endemic countries suggest there are different mechanisms and conditions for tumor occurrence and, possibly, different clinical significance of EBV-associated markers. However, significance of these markers for determining NPC in non-endemic regions is still poorly understood.

Objective – to determine clinical significance of titers of IgG/IgA antibodies to EBV capsid antigen and concentrations of the viral DNA in patients' blood plasma as diagnostic and monitoring markers for NPC in a non-endemic region of Russia.

Materials and methods. Titers of EB-specific antibodies were determined by indirect immunofluorescence, and concentration of the viral DNA in plasma was measured using a quantitative polymerase chain reaction in real time. Study group included patients with NPC ($n = 96$), and control group – blood donors ($n = 171$) and patients with other head and neck tumors ($n = 33$).

Results. Titers of IgG/IgA antibodies to EBV capsid antigen, being an important diagnostic marker of nasopharyngeal cancer, did not always correlate with patients' clinical condition. Humoral response to emerging events often delayed due to inertia of the immune system. Concentration of EBV DNA in patients' blood plasma clearly reflected the dynamics of the pathological process: it decreased to background values in remission and increased while the disease progressed. In contrast to endemic regions, we did not find any correlation between the studied EBV markers and clinical manifestations of the disease, evaluated in accordance with the TNM classification (Tumor, Nodus and Metastasis).

Conclusion. In non-endemic countries, such as Russia, serological and molecular markers of EBV can be successfully used for the primary diagnosis of NPC. However, for the disease monitoring, it is preferable to use the value of the concentrations of circulating EBV DNA, which, in contrast to the values of IgG/IgA antibody titers to VCA EBV, more accurately reflect the patient's clinical condition.

Key words: Epstein–Barr virus, nasopharyngeal cancer, IgG/IgA antibody titers to viral capsid antigen, polymerase chain reaction in real time, plasma Epstein–Barr virus DNA concentration in patients and healthy individuals

For citation: Smirnova K.V., Senuta N.B., Botezatu I.V. et al. Markers of Epstein–Barr virus in clinical assessment of Russian patients with nasopharyngeal cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2021;8(3): 14–24. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-3-14-24.

ВВЕДЕНИЕ

Вскоре после открытия в 1964 г. вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ) иммунологическими исследованиями было показано, что рак носоглотки (РНГ) сопровождается высокими титрами анти-ВЭБ-антител. Однако возможность применения гуморального ответа на ВЭБ для диагностики, оценки эффективности терапии и прогноза у больных с данным заболеванием долгое время оставалась малоизученной [1]. Существенный прогресс в использовании серологических методов тестирования РНГ произошел в последующие годы. Он был основан на понимании уникальной биологической связи ВЭБ с этой опухолью [2]. Было обнаружено, что клиническое состояние больных РНГ наиболее полно характеризуют титры IgG- и IgA-антител к антигенам ВЭБ. Серологический ответ у больных РНГ был связан с опухолевой нагрузкой: размером новообразования [3, 4], региональным и отдаленным метастазированием [5, 6]. Однако в ряде работ было показано, что обнаруженные у пациентов с данной патологией высокие титры антител к ВЭБ не всегда отражают стадию заболевания, состояния ремиссии или рецидива [7, 8]. Например, при изучении 296 индонезийцев и китайцев с РНГ было обнаружено, что титры IgA-антител к вирусному капсидному антигену (ВКА) ВЭБ не коррелируют ни с размером опу-

холи, ни с вовлеченностью в процесс лимфатических узлов, ни со стадией метастазирования [9]. Более того, было высказано мнение, что серологический ответ неспецифичен для РНГ, поскольку повышенные титры IgA-антител встречаются также у пациентов с аутоиммунными заболеваниями и другими нарушениями иммунитета. Это обстоятельство позволило сделать вывод, что титры ВЭБ-специфических антител не могут выступать самостоятельным маркером РНГ, но являются весьма полезным дополнением к традиционным диагностическим методам исследования [10]. Действительно, в последние годы показано, что сывороточные IgA-антитела к ВКА ВЭБ в сочетании с показателями вирусной ДНК в плазме могут быть использованы в качестве диагностического и прогностического маркера РНГ [11].

После обнаружения ВЭБ в гистологических образцах РНГ [12] и выявления высоких титров ВЭБ-специфических антител в крови больных [13] Y.M. Lo и соавт. разработали и стали широко применять полимеразную цепную реакцию, позволяющую в реальном времени количественно определять концентрацию бесклеточной ДНК ВЭБ в сыворотке/плазме крови [14–16]. Высокие уровни циркулирующей ДНК этого вируса были первоначально выявлены у подавляющего большинства больных РНГ в эндемичных регионах [17].

В дальнейшем было показано, что маркером опухолевой нагрузки у пациентов с данным новообразованием является показатель концентрации вирусной ДНК в 1 мл плазмы, который может быть с успехом использован для диагностики РНГ, оценки эффективности проведенной терапии и прогноза [14, 15]. Действительно, многими исследованиями было подтверждено, что концентрация ДНК в плазме больных РНГ в значительной степени коррелирует с размерами опухоли, реакцией на химиолучевую терапию [18], рецидивом или ремиссией заболевания [19–21].

Тем не менее существуют единичные наблюдения, отрицающие указанную корреляцию. Так, S.J. Stevens и соавт. проанализировали результаты исследования 159 индонезийских больных РНГ и пришли к выводу, что показатели циркулирующей ДНК ВЭБ не зависят от серологических маркеров, а диагностическая ценность ее концентрации в плазме для первичного выявления данного заболевания является ограниченной [22]. J.M. Nicholls и соавт. сообщают, что случаи РНГ с ограниченным опухолевым поражением не могут быть выявлены ни одним из вирусных маркеров ВЭБ, даже в эндемичных регионах [23].

Таким образом, серологический и вирусный маркеры отражают разные биологические события, сопровождающие развитие РНГ. Исходя из этого, сравнение клинической ценности каждого из данных маркеров при различных проявлениях заболевания в эндемичных и неэндемичных регионах является важной задачей в связи с генетическими различиями популяций и, возможно, особенностями характера репликации разных штаммов вируса и иммунного ответа в каждой из этих популяций.

Цель нашего исследования — изучить маркеры ВЭБ, титры IgA- и IgG-антител к ВКА и концентрации вирусной ДНК в плазме у больных РНГ в неэндемичном регионе России при различных состояниях заболевания и определить клиническую значимость каждого из них. В контрольные группы вошли доноры крови и пациенты с опухолями головы и шеи, не ассоциированными с ВЭБ. Результаты проведенных исследований мы сравнивали с данными литературы по эндемичным регионам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клиническая информация и сбор образцов. Мы обследовали 96 больных РНГ, поступивших в Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России. Диагноз устанавливали по совокупности анамнестических данных и результатов эндоскопического и морфологического исследований. Стандартному морфологическому исследованию были подвергнуты образцы биопсийного материала из носоглотки и пораженных шейных лимфатических узлов [24]. Стандартные критерии были также использованы для определения стадии заболевания [25]. Материалом для серологического и молеку-

лярного исследований служила плазма крови больных. Мы изучили гистотипы РНГ, преимущественно ассоциированные с ВЭБ. Соотношение обследованных женщин и мужчин составило 1 : 2,8. Средний возраст больных — 48,4 года. У 18 пациентов было заболевание I–II стадии, у 62 пациентов — III–IV стадии. До лечения плазма была взята у 96 больных, а после лечения — у 44. В процессе терапии у 51 пациента констатировали ремиссию и у 20 пациентов — рецидив заболевания. В контрольные группы вошли 33 пациента с опухолями полости рта, не ассоциированными с ВЭБ (ОПР^{ВЭБ-}) (с раком слизистой оболочки языка, дна полости рта, щеки, нижней челюсти и неба), а также 171 здоровый донор.

Для получения плазмы применяли этилендиамин-тетрауксусную кислоту (ЭДТА). Образцы плазмы центрифугировали при 1800 g в течение 10 мин. Плазменный супернатант до использования хранили при температуре –20 °С. Данное исследование, в которое вошли больные и здоровые люди (по их согласию, в результате случайной выборки), было одобрено комитетом по биомедицинской этике Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России.

Серологический тест на антитела к вирусу Эпштейна–Барр. Титры IgG- и IgA-антител к ВКА ВЭБ в плазме крови больных и здоровых людей определяли методом непрямой иммунофлуоресценции, который считается «золотым стандартом» диагностики ВЭБ-позитивных патологий. Условия проведения теста и анализ полученных результатов были представлены нами ранее [26]. Титры антител были представлены в виде их среднегеометрических значений (СГЗ).

Количественное измерение вирусной ДНК. Число копий ДНК ВЭБ в образцах плазмы крови больных РНГ и ОПР^{ВЭБ-}, а также доноров крови определяли с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени, используя подходы, описанные V.E. Gurtsevitch и соавт. [27].

Статистический анализ. Содержание тотальной и вирусной ДНК в плазме крови лиц, входящих в состав разных групп, сравнивали посредством непараметрического критерия Манна–Уитни. Титры антител представляли в виде их среднегеометрических значений. Статистическую значимость различий частот изучаемых признаков оценивали с помощью критерия χ^2 , для малых выборок рассчитывали точный критерий Фишера. Линейная связь между двумя величинами оценивалась с помощью коэффициента корреляции Пирсона (r-Пирсона), а степень параллелизма между количественными рядами изучаемых признаков — с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена (ρ-Спирмена). Все расчеты проводились с использованием статистических программ Statistica для Windows 6.0, SPSS и GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Как было указано выше, цель работы состояла в изучении у больных РНГ из неэндемичного региона (России) клинической значимости маркеров ВЭБ и определении возможных преимуществ и ограничений их использования. При проведении исследований предстояло выяснить, каковы диагностическая и прогностическая ценность каждого маркера, их корреляция с проявлениями болезни и друг с другом.

Прежде всего нас интересовало, существует ли корреляция между гуморальным ответом на вирус и вирусной нагрузкой в плазме. Анализ титров IgG- и IgA-антител к ВКА и соответствующих им чисел копий ДНК ВЭБ у 96 больных РНГ, осуществленный с помощью расчета г-Пирсона, показал, что искомая корреляция отсутствует ($p = 0,3655$). Согласно данным литературы, гуморальный и молекулярный маркеры ВЭБ зачастую по-разному и несинхронно реагируют на меняющееся состояние опухолевого процесса. Это связано с различной природой этих маркеров. Известно, что ДНК ВЭБ в плазме больных РНГ состоит из коротких фрагментов ДНК вируса (в основном <181 п. н.), которые выделяются клетками опухоли в результате их апоптоза и некроза [28]. Возникновение IgA-антител к ВКА является следствием иммунной реакции слизистой оболочки на репликацию ВЭБ.

Поиски взаимозависимости титров IgG-антител к вирусному капсидному антигену (ВКА) и раннему антигену (РА), с одной стороны, и IgA-антител и тех же антигенов, с другой, у вышеуказанных 96 больных РНГ были проанализированы с помощью р-Спирмена. Результаты проведенного расчета свидетельствуют о том, что каждый из перечисленных серологических маркеров реагирует в комплексе с остальными маркерами и что между ними существует высокая степень корреляции ($p < 0,0001$) (рис. 1). Таким образом, изучение у больных РНГ серологических (титров антител) и молекулярных (концентрации ДНК ВЭБ) маркеров ВЭБ показало отсутствие корреляции между ними и их самостоятельную значимость для оценки клинического состояния.

Маркеры вируса Эпштейна–Барр у больных раком носоглотки в ответ на терапию. Результаты изучения содержания у больных с первично установленным диагнозом «РНГ» ВЭБ-специфических антител и концентрации вирусной ДНК до и после терапии представлены в табл. 1. У 96 больных до лечения обнаружены высокие СГЗ титров IgG-антител к ВКА. У 44 из них после проведения терапии они существенно и статистически достоверно снизились (434 и 278 соответственно; $p < 0,05$). После лечения было выявлено также снижение СГЗ титров IgA-антител к ВКА (101 и 64 соответственно; $p < 0,05$). Медиана концентраций ДНК ВЭБ (рассчитываемая на число копий вирусной ДНК в 1 мл плазмы) у больных РНГ после терапии также значительно уменьшилась по сравнению с медианой до нее (1895 и 497 мл соответственно). Однако в связи с высокими значени-

ями циркулирующей ДНК ВЭБ у отдельных пациентов, не ответивших позитивно на проведенное лечение, различие между значениями медиан оказалось статистически недостоверным ($p > 0,05$). Согласно данным, представленным в таблице, группы больных ОПР^{ВЭБ} и доноров крови, рассматриваемые в качестве контрольных, характеризовались крайне низкими показателями гуморального ответа на ВЭБ и фоновыми значениями вирусной ДНК. Различия между соответствующими показателями у представителей этих групп не были статистически значимыми.

Маркеры вируса Эпштейна–Барр у больных раком носоглотки в состояниях ремиссии и рецидива. Для того, чтобы определить информативность ВЭБ-маркеров при различных клинических состояниях, титры ВЭБ-специфических антител и показатели концентраций вирусной ДНК были исследованы у пациентов с РНГ в состояниях ремиссии и рецидива (табл. 2). Анализ показал, что титры IgG- и IgA-антител к ВКА ВЭБ у больных, находящихся в состоянии как ремиссии, так и рецидива, в равной степени высокие, а различие между их СГЗ статистически недостоверно (268 и 239 соответственно; $p > 0,05$). Медианы концентраций ДНК ВЭБ в 1 мл плазмы у этих пациентов в состоянии ремиссии (17 копий/мл) и при рецидиве (2008 копий/мл) характеризовались высоким уровнем статистически достоверного различия ($p < 0,0001$). Эти результаты продемонстрировали значительную клиническую информативность вирусной ДНК, ее способность отражать

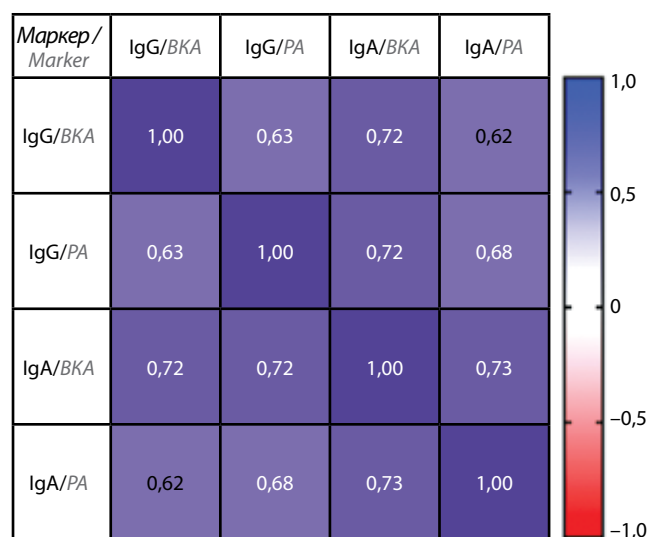


Рис. 1. Тепловая карта корреляционной матрицы. Значения IgG- и IgA-антител к вирусному капсидному антигену (ВКА) и раннему антигену (РА) вируса Эпштейна–Барр противопоставляются друг другу для анализа их корреляции. Любое значение коэффициента ранговой корреляции Спирмена >0 указывает на наличие корреляции. Ее степень повышается при приближении этого коэффициента к 1

Fig. 1. Heatmap of the correlation matrix. The IgG and IgA of antibody values to viral capsid antigen (VCA) and EA (early antigen) of Epstein–Barr virus are located opposed to each other to analyze their correlation. Any value of Spearman's rank correlation coefficient greater than zero indicates the presence of a correlation. The degree of correlation increases as this coefficient approaches 1

Таблица 1. Результаты изучения содержания специфических антител к вирусу Эпштейна—Барр у больных с первично установленным диагнозом «рак носоглотки», больных с опухолями головы и шеи, не ассоциированными с этим вирусом, и доноров крови

Table 1. The amount of specific antibodies to the Epstein—Barr virus in patients with nasopharyngeal cancer as primary diagnosis, as well as patients with head and neck tumors not associated with the virus, and blood donors

Показатель Parameter	Пациенты с раком носоглотки Patients with nasopharyngeal carcinoma		<i>p</i>	Пациенты с ОПР ^{ВЭБ} — Patients with TOC ^{EBV} —	Доноры крови Blood donors	<i>p</i>
	До лечения Before treatment	После лечения After treatment				
Число наблюдений Number of observations	96	44	—	33	171	—
СГЗ IgG-антител к ВКА GMT IgG antibody titers to the VCA	434	287	<0,05	33	52	>0,05
СГЗ IgA-антител к ВКА GMT IgA antibody titers to the VCA	101	64	<0,05	2	1	>0,05
Медиана (межквартильный интервал) Median (interquartile range)	1895 (334—14992)	497 (22—13537)	>0,05	1 (1—39)	1 (1—1)	>0,05

Примечание. ОПР^{ВЭБ} — опухоли полости рта, не ассоциированные с вирусом Эпштейна—Барр; СГЗ — среднее геометрическое значение титров антител; ВКА — вирусный капсидный антиген.

Note. TOC^{EBV} — not Epstein—Barr virus associated tumors of oral cavity; GMT — geometrical mean titers; VCA — viral capsid antigen.

Таблица 2. Результаты исследования содержания антител к вирусу Эпштейна—Барр в плазме крови и показателей концентраций вирусной ДНК

Table 2. The amount of antibodies to the Epstein — Barr virus in the blood plasma and viral DNA concentration in patients with nasopharyngeal cancer in remission and recurrence

Клиническое состояние Clinical state	Число пациентов Number of patients	СГЗ IgG-анти- тел к ВКА GMT IgG VCA	<i>p</i>	СГЗ IgA-антител к ВКА GMT IgA VCA	<i>p</i>	М (межквартильный интервал) M (interquartile range)	<i>p</i>
Ремиссия Remission	51	268	>0,05	70	>0,05	17 (1—432)	<0,0001
Рецидив Relapse	20	239		60		2008 (231—48006)	

СГЗ — среднее геометрическое значение; ВКА — вирусный капсидный антиген; М — медиана числа копий ДНК вируса Эпштейна—Барр в 1 мл плазмы.

Note. GMT — geometrical mean titers; VCA — viral capsid antigen; M — median of Epstein—Barr virus DNA number copies per 1 ml of plasma.

такие процессы, происходящие в организме больных РНГ, как ремиссия и рецидив, в то время как ВЭБ-специфические антитела такой способностью не обладали.

Динамика маркеров вируса Эпштейна—Барр у больных раком носоглотки. Индивидуальную реакцию изучаемых маркеров на различные проявления опухолевого процесса можно наблюдать на примере отдельных больных. На рис. 2 приведены данные 4 больных РНГ, находящихся в стадии ремиссии после лечения. Вирусную нагрузку в плазме и титры IgA-антител к ВКА, наиболее часто используемых в качестве серологического маркера РНГ в эндемичных регионах [4], сравнивали на разных этапах течения болезни. При первичном тестировании в 1-м и 4-м случаях в плазме пациентов выявлены высокие концентрации ДНК ВЭБ (10929 и 17680 копий/мл соответственно) и высокие титры IgA-антител к ВКА (1: 80 и 1: 320 соот-

ветственно) (см. рис. 2а, з). После курса лечения содержание вирусной ДНК в обоих случаях резко снизилось: в 1-м — до 0 копий/мл (см. рис. 2а), а во 2-м — до 444 копий/мл (см. рис. 2з). Титры же антител в 1-м наблюдении остались на прежнем уровне (1: 80), а во 2-м снизились лишь на одно разведение (1 : 160). Последующие исследования показали, что в ответ на терапию число копий ДНК ВЭБ в плазме обоих больных сократилось практически до фоновых значений и сохранилось таким к концу 42-месячного наблюдения в 1-м случае и 68-месячного наблюдения во 2-м случае. Титры антител, сохранившиеся к указанным срокам наблюдения, в обоих случаях также существенно снизились — до 1 : 20.

Аналогичную динамику вирусной нагрузки в плазме мы наблюдали и в 3-м случае, хотя первичное тестирование выявило не столь высокую, как в 1-м и 4-м случаях, концентрацию ДНК ВЭБ (542 копии/мл).

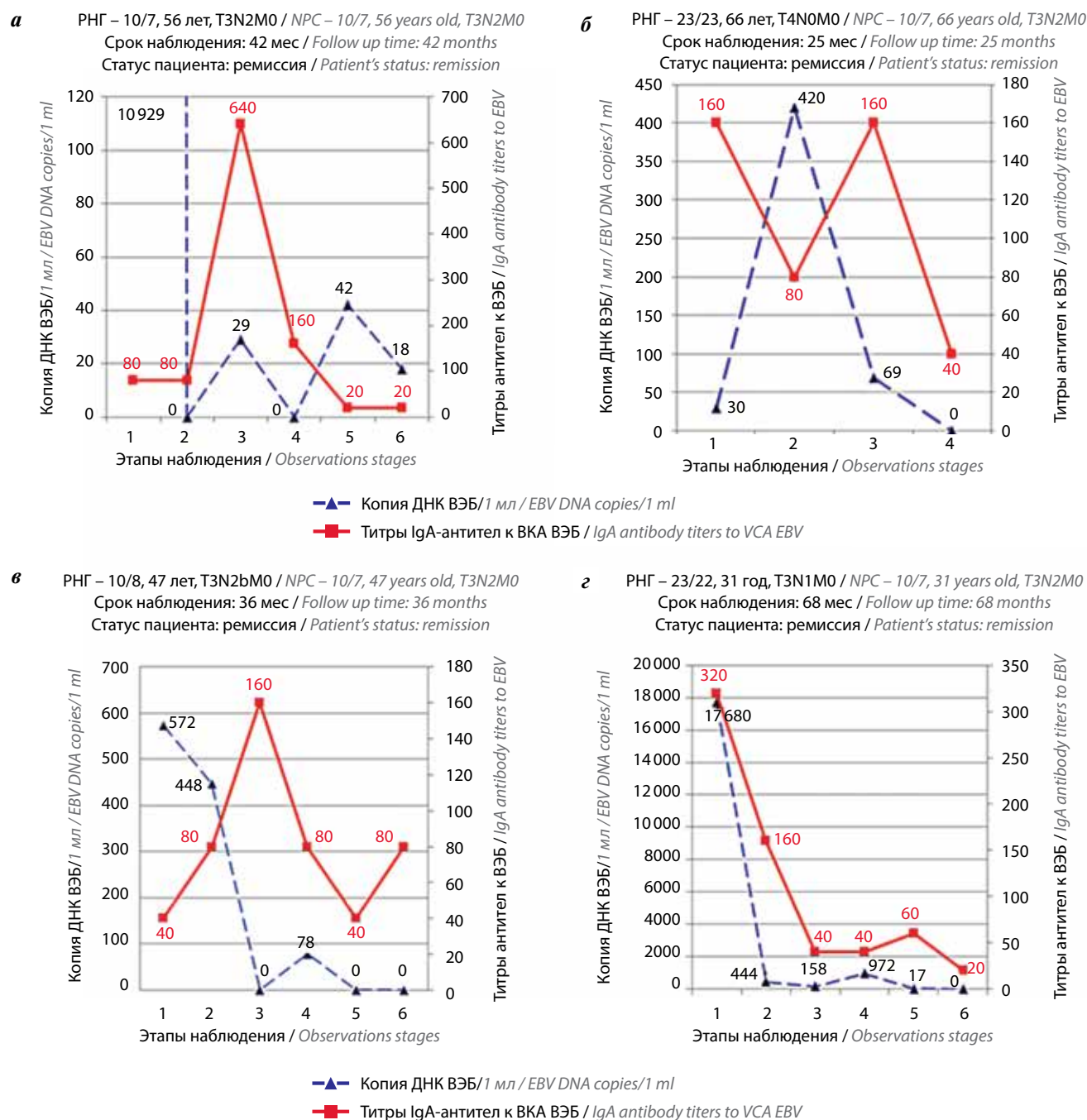


Рис. 2. Динамика изменения титров IgA-антител к вирусному капсидному антигену и концентраций ДНК вируса Эпштейна–Барр в плазме крови больных раком носоглотки с позитивным ответом на терапию (состояние ремиссии): а – 1-й случай; б – 2-й случай; в – 3-й случай; г – 4-й случай. ВЭБ – вирус Эпштейна–Барр; ВКА – вирусный капсидный антиген; РНГ – рак носоглотки

Fig. 2. Dynamics of IgA antibody titers viral capsid antigen and Epstein–Barr virus DNA concentrations in blood plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma with a positive response to therapy (state of remission): а – case 1; б – case 2; в – case 3; г – case 4. EBV – Epstein–Barr virus; VCA – viral capsid antigen; NPC – nasopharyngeal carcinoma

При этом IgA-антитела к ВКА антитела вели себя парадоксальным образом: относительно невысокие титры при исходном исследовании (1 : 40) при снижении концентрации вирусной ДНК после терапии нарастали и при нулевом ее значении достигли максимального показателя (1 : 160). Затем титры антител начали снижаться (1 : 80, 1 : 40), но к завершающему этапу наблюдения (36 мес) при нулевых значениях вирусной

ДНК вновь поднялись до 1 : 80. В отличие от других наблюдений во 2-м случае при первичном обследовании были выявлены низкая концентрация вирусной ДНК (30 копий/мл) и относительно высокие титры ВЭБ-специфических антител (1 : 160). Второй этап тестирования после курса терапии выявил увеличение числа копий вирусной ДНК (420 копий/мл) и некоторое снижение показателей титров антител (1 : 80). В даль-

нейшем уменьшение вирусной нагрузки до нулевых значений сопровождалось подъемом титров антител (1 : 160) и их снижением до 1 : 40 к концу 25-месячно-

го наблюдения. Важно отметить, что гуморальный ответ на ВЭБ в каждом случае запаздывал по отношению к показателям вирусной нагрузки в плазме. При

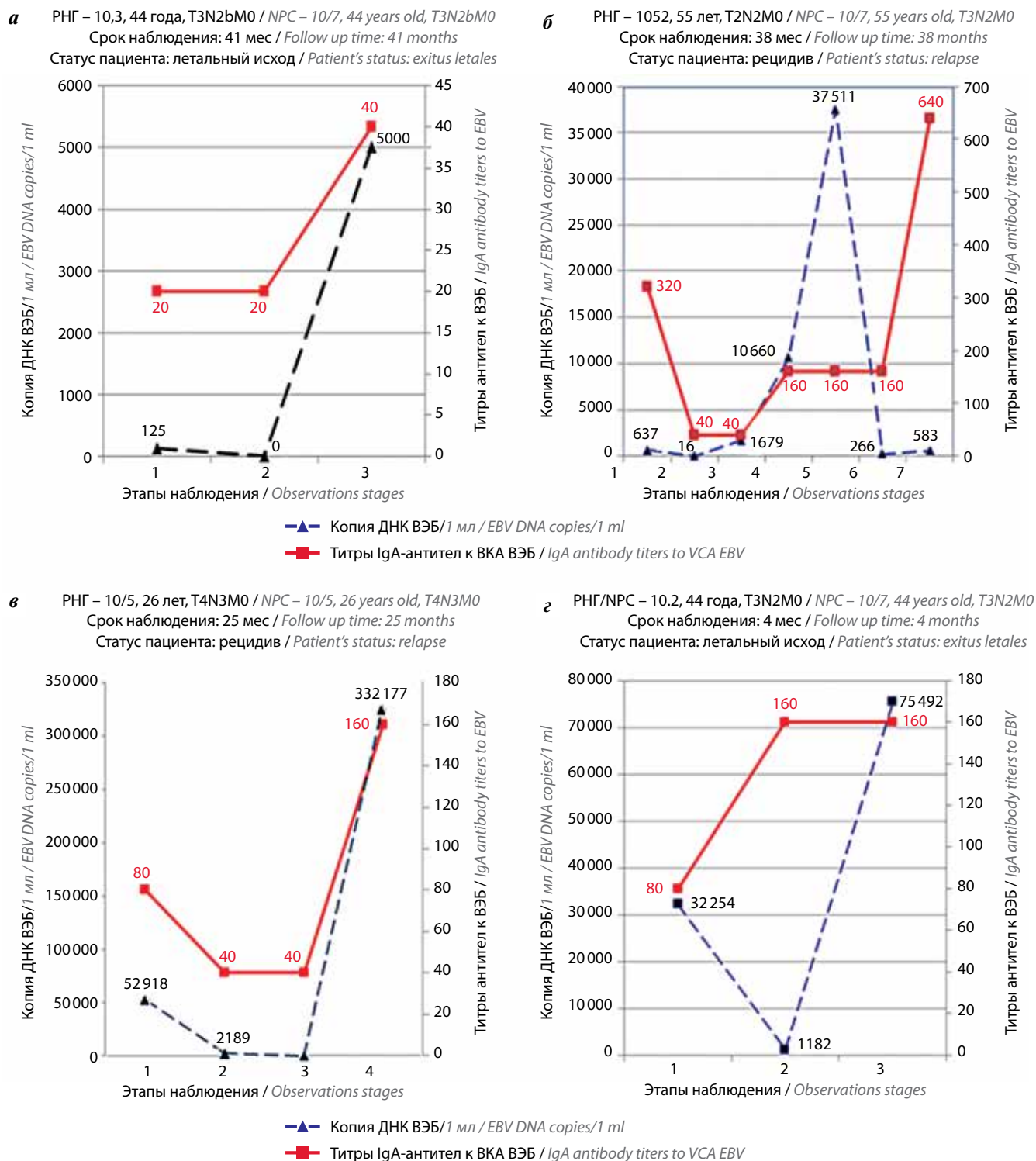


Рис. 3. Динамика титров IgA-антител к вирусному капсидному антигену и концентраций ДНК вируса Эпштейн–Барр в плазме крови больных раком носоглотки с негативным ответом на терапию (рецидив/летальный исход): а – 5-й случай; б – 6-й случай; в – 7-й случай; г – 8-й случай. ВЭБ – вирус Эпштейна–Барр; ВКА – вирусный капсидный антиген; РНГ – рак носоглотки

Fig. 3. Dynamics of IgA antibody titers viral capsid antigen and Epstein–Barr virus DNA concentrations in blood plasma patients with nasopharyngeal carcinoma with a positive effect on therapy (state of relapse/exitus letales): а – case 5; б – case 6; в – case 7; г – case 8. EBV – Epstein–Barr virus; VCA – viral capsid antigen; NPC – nasopharyngeal carcinoma

этом снижение титров антител происходило непосредственно, чередуясь в ряде случаев с их резким увеличением (в 1–3-м случаях).

При неблагоприятном течении болезни, иногда заканчивающейся летальным исходом, нагрузка вирусной ДНК в плазме крови более точно, чем IgA-антитела к ВКА, отражала динамику опухолевого процесса (рис. 3). В 3 случаях (5-м, 6-м и 7-м) исходная концентрация циркулирующей ДНК ВЭБ после 1-го, а иногда 2-го этапа терапии существенно снижалась, порой до нулевых значений (5-й и 7-й случаи). Титры вирус-специфических антител при этом вели себя по-разному: оставались на прежнем уровне, иногда существенно снижались или нарастали (8-й случай). Число копий вирусной ДНК в стадии болезни, предшествующей летальному исходу, достигали больших значений: 5000, 322 177 и 75 492 (5-й, 7-й и 8-й случаи соответственно). При этом титры антител также достигали относительно высоких значений (1 : 40, 1 : 160 и 1 : 160 соответственно). В случае возникновения рецидива (6-й случай) невысокие концентрации вирусной ДНК в плазме, сначала снижающиеся в ответ на проведенную терапию даже до минимальных значений (377 и 16 копий/мл), стали активно увеличиваться (1678 и 10 660 копий/мл). Достигнув максимума (37 511 копий/мл) после нескольких курсов химиолучевой терапии, концентрация вирусной ДНК резко снизилась до 266 и 583 копий/мл, что отражает наступление этапа ремиссии. Титры IgA-антител, высокие при первичном обследовании больного (1 : 320), во время рецидива опухолевого процесса, не увеличились, а снизились до уровня 1 : 40 и затем поднялись до 1 : 160. Однако после терапии, в отличие от резкого падения концентрации циркулирующей ДНК в период наступившей ремиссии, титры антител

резко поднялись до значения 1 : 640, по-видимому, в ответ на выброс вирусных белков, большей частью разрушенных терапией опухолевых клеток.

Маркеры вируса Эпштейна–Барр при различных TNM-стадиях рака носоглотки. В отличие от большинства данных по эндемичным регионам [29, 30] поиски зависимости между показателями маркеров ВЭБ и степенью манифестации опухолевого процесса, оцениваемого по классификации TNM, у российских больных РНГ привели к неоднозначным, а порой парадоксальным результатам (табл. 3). Концентрация вирусной ДНК в плазме крови больных коррелировала лишь с размерами опухоли. Медиана числа копий ДНК ВЭБ в 1 мл плазмы у пациентов с заболеванием T3–T4 стадии была выше, чем у пациентов с РНГ T1–T2 стадией (4729 и 1764 соответственно), хотя различие оказалось статистически недостоверным. Иную картину наблюдали при сопоставлении показателей вирусной нагрузки в плазме с размерами поврежденных опухолевым процессом лимфатических узлов и его распространенностью (стадиями заболевания). У больных с заболеванием в стадиях N2–N3 и III–IV медианы числа копий ДНК ВЭБ в 1 мл плазмы были ниже, чем у больных с заболеванием в стадиях N0–N1 и I–II (различия статистически недостоверны). Обратная зависимость обнаружена и между серологическими ответами на ВЭБ и анализируемыми проявлениями опухолевого процесса: более тяжелое течение болезни сопровождалось более низкими значениями титров IgG- и IgA-антител к ВКА. Более того, их СГЗ у пациентов с РНГ T1–T2 стадии статистически достоверно отличались от таковых у больных с заболеванием T3–T4 стадии. Исключение составили лишь СГЗ титров IgA-антител к ВКА в группе больных с РНГ N2–N3 стадии,

Таблица 3. Зависимость между серологическими и молекулярными маркерами вируса Эпштейна–Барр у пациентов с раком носоглотки и степенью манифестации опухолевого процесса

Table 3. Relationship between serological and molecular markers of Epstein–Barr virus in patients with nasopharyngeal carcinoma and degree of tumor manifestation

Стадия Stage	Случаи, n Cases, n	Копии ДНК вируса Эпштейна–Барр Epstein–Barr virus DNA copies	p	СГЗ IgG-антител к ВКА GMT IgG VCA	p	СГЗ IgA-антител к ВКА GMT IgA VCA	p
		М (межквартильный интервал) M (interquartile range)					
T1–T2	37	1764 (132–14 150)	>0,05	512	<0,05	125	<0,05
T3–T4	43	4729 (644–19 082)		236		64	
N0–N1	40	5944 (394–22 991)	>0,05	415	>0,05	94	>0,05
N2–N3	40	2575 (242–10 910)		387		111	
I–II	18	8099 (1445–36 102)	>0,05	471	>0,05	122	>0,05
III–IV	62	2575 (332–14 499)		400		103	

Примечание. СГЗ – среднее геометрическое значение; ВКА – вирусный капсидный антиген; М – медиана числа копий ДНК вируса Эпштейна–Барр в 1 мл плазмы.

Note. GMT – geometrical mean titers; VCA – viral capsid antigen; M – median of Epstein–Barr virus DNA number copies per 1 ml of plasma.

которые оказались более высокими, чем у больных с РНГ N0–N1 стадии (111 и 94 соответственно; $p > 0,05$). Наблюдаемый феномен, возможно, связан с особенностями иммунного статуса пациентов с более выраженными проявлениями заболевания или отражает специфику механизма ВЭБ-ассоциированного канцерогенеза РНГ в эндемичном регионе. Справедливость высказанных предположений может быть подтверждена только дополнительными исследованиями.

ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение клинической значимости маркеров ВЭБ для определения РНГ в эндемичных странах является важной задачей. При этом довольно сложно сформировать репрезентативную группу пациентов для исследования в связи с низкой заболеваемостью данным видом опухолей. Мы изучили маркеры ВЭБ при различных клинических состояниях РНГ у 96 российских больных. К сожалению, не всех пациентов удалось проследить в динамике, поскольку многие из них после постановки диагноза и позитивного ответа на проведенную терапию направлены в региональные онкологические клиники/диспансеры для продолжения лечения и часто были недостижимы.

Проведенные исследования показали, что для первичной диагностики РНГ, кроме общепринятых клинических методов диагностики, в качестве дополнительных целесообразно использовать серологический и молекулярный методы, базирующиеся на определении титров IgG/IgA-антител к ВКА и показателя концентрации вирусной ДНК в плазме. Наличие данной опухоли может подтверждаться повышенным значением, по крайней мере, одного из двух маркеров ВЭБ. Было обнаружено, что в отличие от серологических маркеров вирусная нагрузка в плазме крови отражает динамику опухолевого процесса, в то время как серологический ответ в связи с его инерционностью такой способностью не обладает.

Высокая информативность вирусной ДНК в качестве маркера РНГ была подтверждена при изучении больных, находящихся в состояниях ремиссии и рецидива. Медиана числа копий ДНК ВЭБ в плазме пациентов, позитивно отреагировавших на терапию и перешедших в состояние ремиссии, была существенно и статистически достоверно ниже таковой у больных, находящихся в состоянии рецидива. При этом титры ВЭБ-специфических антител у первых зачастую были высокими, а у вторых проявляли тенденцию к снижению. Несогласованность серологического ответа к ВЭБ у больных РНГ и проявлений опухолевого процесса можно обнаружить и в других исследованиях [22].

Неспособность ВЭБ-специфических антител в отличие от циркулирующей вирусной ДНК четко ре-

агировать на различные проявления РНГ была подтверждена рядом исследователей, причем прежде всего из эндемичных стран. Т.Т. Ыр и соавт. не обнаружили различий в уровнях гуморального ответа на ВЭБ у больных РНГ в состояниях ремиссии и рецидива [31]. Было высказано предположение, что наблюдаемый феномен связан с выявлением у пациентов с РНГ из эндемичных регионов высоких локальных уровней цитокинов, таких как интерлейкин 10 и других иммуномодулирующих цитокинов и факторов роста, способствующих нарушению регуляции иммунного ответа и его подавлению [32].

Как показали последние исследования, особенность формирования иммунного ответа у отдельных групп лиц или целых этносов может определяться уровнем циркулирующего в организме магния, контролируемого соответствующими генами. Имеются доказательства того, что у больных РНГ, у которых обнаружены варианты гена *NIPAL1*, уровень циркулирующего магния снижен как в семейных, так и в спорадических случаях РНГ. Кроме того, выявлено, что другой ген транспорта магния, *MAGT1*, отменяет его поток в NK- (natural killer cells) и CD8-T-клетки, что способствует неконтролируемой репликации ВЭБ [33, 34]. Согласно результатам исследований, указанные гены, регулирующие транспорт магния, могут быть важными детерминантами риска развития РНГ, поскольку определяют способность хозяина создавать эффективный иммунный ответ на ВЭБ, с которым тесно связано возникновение данной опухоли [35].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что серологические и молекулярные маркеры ВЭБ, титры ВЭБ-специфических антител и концентрация циркулирующей вирусной ДНК могут выступать эффективным дополнительным инструментом диагностики РНГ, определения у больных состояния ремиссии или рецидива и в эндемичных странах. Однако необходимо отметить, что указанные маркеры ВЭБ не могут заменить эндоскопию и компьютерную и магнитно-резонансную томографию носоглотки, которые являются «золотым стандартом» диагностики рецидива или метастазирования РНГ. В то же время частота визуализации носоглотки указанными методами в соответствии с определяемыми уровнями ДНК ВЭБ в плазме и титрами вирус-специфических антител может быть сокращена, а интервал времени между вышеупомянутыми исследованиями увеличен, что делает наблюдение за больными РНГ с помощью маркеров ВЭБ более простым и экономически эффективным. Такое использование данных маркеров будет способствовать улучшению и терапевтического эффекта, и прогноза заболевания.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Klein G. The biology and serology of Epstein–Barr virus (EBV) infections. *Bull Cancer* 1976;63(3):399–410.
- Low W.K., Leong J.L., Goh Y.H. et al. Diagnostic value of Epstein–Barr viral serology in nasopharyngeal carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000;123(4):505–7. DOI: 10.1067/mhn.2000.108201.
- Cao S.M., Liu Z., Jia W.H. et al. Fluctuations of Epstein–Barr virus serological antibodies and risk for nasopharyngeal carcinoma: a prospective screening study with a 20-year follow-up. *PLoS One* 2011;6(4):e19100. DOI: 10.1371/journal.pone.0019100.
- Chien Y.C., Chen J.Y., Liu M.Y. et al. Serologic markers of Epstein–Barr virus infection and nasopharyngeal carcinoma in Taiwanese men. *N Engl J Med* 2001;345(26):1877–82. DOI: 10.1056/NEJMoa011610.
- Ji M.F., Wang D.K., Yu Y.L. et al. Sustained elevation of Epstein–Barr virus antibody levels preceding clinical onset of nasopharyngeal carcinoma. *Br J Cancer* 2007;96(4):623–30. DOI: 10.1038/sj.bjc.6603609.
- Zhao F.P., Liu X., Zhong Z.M. et al. Positivity of both plasma Epstein–Barr virus DNA and serum Epstein–Barr virus capsid specific immunoglobulin A is a better prognostic biomarker for nasopharyngeal carcinoma. *BBA Clin* 2014;2:88–93. DOI: 10.1016/j.bbacli.2014.10.003.
- Fan H., Nicholls J., Chua D. et al. Laboratory markers of tumor burden in nasopharyngeal carcinoma: a comparison of viral load and serologic tests for Epstein–Barr virus. *Int J Cancer* 2004;112(6):1036–41. DOI: 10.1002/ijc.20520.
- Tan G.W., Sivanesan V.M., Abdul Rahman F.I. et al. A novel and non-invasive approach utilising nasal washings for the detection of nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 2019;145(8):2260–6. DOI: 10.1002/ijc.32173.
- Fachiroh J., Paramita D.K., Hariwiyanto B. et al. Single-assay combination of Epstein–Barr virus (EBV) EBNA1- and viral capsid antigen-p18-derived synthetic peptides for measuring anti-EBV immunoglobulin G (IgG) and IgA antibody levels in sera from nasopharyngeal carcinoma patients: options for field screening. *J Clin Microbiol* 2006;44(4):1459–67. DOI: 10.1128/JCM.44.4.1459-1467.2006.
- Wyatt D.E., Brooker D.S., Connolly J.H. et al. Prognostic value of Epstein–Barr virus serology in patients with nasopharyngeal carcinoma. *J Infect* 1993;26:171–5. DOI: 10.1016/0163-4453(93)92842-k.
- Liu W., Chen G., Gong X. et al. The diagnostic value of EBV-DNA and EBV-related antibodies detection for nasopharyngeal carcinoma: a meta-analysis. *Cancer Cell Int* 2021;21(1):164. DOI: 10.1186/s12935-021-01862-7.
- Fahraeus R., Fu H.L., Ernberg I. et al. Expression of Epstein–Barr virus-encoded proteins in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 1988;42(3):329–38. DOI: 10.1002/ijc.2910420305.
- Tsang R.K., Vlantis A.C., Ho R.W. et al. Sensitivity and specificity of Epstein–Barr virus IGA titer in the diagnosis of nasopharyngeal carcinoma: a three-year institutional review. *Head Neck* 2004;26(9):598–602. DOI: 10.1002/hed.20022.
- Lo Y.M., Chan L.Y., Lo K.W. et al. Quantitative analysis of cell-free Epstein–Barr virus DNA in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 1999;59(6):1188–91.
- Lo Y.M., Chan A.T., Chan L.Y. et al. Molecular prognostication of nasopharyngeal carcinoma by quantitative analysis of circulating Epstein–Barr virus DNA. *Cancer Res* 2000;60(24):6878–81.
- Lo Y.M., Leung S.F., Chan L.Y. et al. Plasma cell-free Epstein–Barr virus DNA quantitation in patients with nasopharyngeal carcinoma. Correlation with clinical staging. *Ann N Y Acad Sci* 2000;906:99–101. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06597.x.
- Hong R.L., Lin C.Y., Ting L.L. et al. Comparison of clinical and molecular surveillance in patients with advanced nasopharyngeal carcinoma after primary therapy: the potential role of quantitative analysis of circulating Epstein–Barr virus DNA. *Cancer* 2004;100(7):1429–37. DOI: 10.1002/CNCR.20129.
- Hsu C.L., Chang K.P., Lin C.Y. et al. Plasma Epstein–Barr virus DNA concentration and clearance rate as novel prognostic factors for metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Head Neck* 2012;34(8):1064–70. DOI: 10.1002/hed.21890.
- Chan J.Y., Wong S.T. The role of plasma Epstein–Barr virus DNA in the management of recurrent nasopharyngeal carcinoma. *Laryngoscope* 2014;124(1):126–30. DOI: 10.1002/lary.24193.
- Ferrari D., Codeca C., Bertuzzi C. et al. Role of plasma EBV DNA levels in predicting recurrence of nasopharyngeal carcinoma in a Western population. *BMC Cancer* 2012;12:208. DOI: 10.1186/1471-2407-12-208.
- Leung S.F., Chan A.T., Zee B. et al. Pretherapy quantitative measurement of circulating Epstein–Barr virus DNA is predictive of posttherapy distant failure in patients with early-stage nasopharyngeal carcinoma of undifferentiated type. *Cancer* 2003;98(2):288–91. DOI: 10.1002/cncr.11496.
- Stevens S.J., Verkuijlen S.A., Hariwiyanto B. et al. Diagnostic value of measuring Epstein–Barr virus (EBV) DNA load and carcinoma-specific viral mRNA in relation to anti-EBV immunoglobulin A (IgA) and IgG antibody levels in blood of nasopharyngeal carcinoma patients from Indonesia. *J Clin Microbiol* 2005;43(7):3066–73. DOI: 10.1128/JCM.43.7.3066-3073.2005.
- Nicholls J.M., Lee V.H., Chan S.K. et al. Negative plasma Epstein–Barr virus DNA nasopharyngeal carcinoma in an endemic region and its influence on liquid biopsy screening programmes. *Br J Cancer* 2019;121(8):690–8. DOI: 10.1038/s41416-019-0575-6.
- Shanmugaratnam K. Histological typing of nasopharyngeal carcinoma. *IARC Sci Publ* 1978;20:3–12.
- Beahrs O.H. Clinical staging of cancer of the head and neck. *Surg Clin North Am* 1977;57(4):831–6. DOI: 10.1016/S0039-6109(16)41292-2.
- Gurtsevitch V., Ruiz R., Stepina V. et al. Epstein–Barr viral serology in nasopharyngeal carcinoma patients in the USSR and Cuba, and its value for differential diagnosis of the disease. *Int J Cancer* 1986;37(3):375–81. DOI: 10.1002/IJC.2910370308.
- Gurtsevitch V.E., Senyuta N.B., Ignatova A.V. et al. Epstein–Barr virus biomarkers for nasopharyngeal carcinoma in non-endemic regions. *J Gen Virol* 2017;98(8):2118–27. DOI: 10.1099/JGV.0.000889.
- Chan K.C., Chan A.T., Leung S.F. et al. Investigation into the origin and tumoral mass correlation of plasma Epstein–Barr virus DNA in nasopharyngeal carcinoma. *Clin Chem* 2005;51(11):2192–5. DOI: 10.1373/CLINCHEM.2005.054783.
- Leung S.F., Tam J.S., Chan A.T. et al. Improved accuracy of detection of nasopharyngeal carcinoma by combined application of circulating Epstein–Barr virus DNA and anti-Epstein–Barr viral capsid antigen IgA antibody. *Clin Chem* 2004;50(2):339–45. DOI: 10.1373/CLINCHEM.2003.022426.
- Liu Y., Huang Q., Liu W. et al. Establishment of VCA and EBNA1 IgA-based combination by enzyme-linked immunosorbent assay as preferred screening method for nasopharyngeal carcinoma: a two-stage design with a preliminary performance study and a mass screening in southern China. *Int J Cancer* 2012;131(2):406–16. DOI: 10.1002/ijc.26380.
- Yip T.T., Ngan R.K., Fong A.H. et al. Application of circulating plasma/serum EBV DNA in the clinical management of nasopharyngeal carcinoma. *Oral Oncol* 2014;50(6):527–38. DOI: 10.1016/J.ORALONCOLOGY.2013.12.011.

32. Tan E.L., Looi L.M., Sam C.K. Evaluation of plasma Epstein-Barr virus DNA load as a prognostic marker for nasopharyngeal carcinoma. Singapore Med J 2006;47(9):803–7.
33. Chaigne-Delalande B., Li F.Y., O'Connor G.M. et al. Mg^{2+} regulates cytotoxic functions of NK and CD8 T cells in chronic EBV infection through NKG2D. Science 2013; 341(6142):186–91. DOI: 10.1126/SCIENCE.1240094.
34. Li F.Y., Chaigne-Delalande B., Kanellopoulou C. et al. Second messenger role for Mg^{2+} revealed by human T-cell immunodeficiency. Nature 2011;475(7357):471–6. DOI: 10.1038/NATURE10246.
35. Yu G., Hsu W.L., Coghil A.E. et al. Whole-exome sequencing of nasopharyngeal carcinoma families reveals novel variants potentially involved in nasopharyngeal carcinoma. Sci Rep 2019;9(1):9916. DOI: 10.1038/S41598-019-46137-4.

Вклад авторов

К.В. Смирнова: идея и дизайн исследования, анализ полученных результатов, редактирование рукописи;
 Н.Б. Сенюта: сбор и систематизация клинических данных, анализ реакции иммунофлуоресценции;
 И.В. Ботезату: определение концентрации ДНК ВЭБ в образцах плазмы крови больных РНГ и контрольных лиц методом ПЦР в реальном времени;
 А.В. Игнатова, А.А. Золотарев: информация о больных РНГ и их клиническое сопровождение;
 Т.Е. Душенькина: постановка реакции иммунофлуоресценции;
 А.В. Лихтенштейн: анализ корреляции концентрацией ДНК ВЭБ в плазме с клиническим состоянием больных РНГ; оформление рисунков;
 В.Э. Гурцевич: организация исследования, оформление таблиц, написание рукописи.

Authors' contributions

K.V. Smirnova: idea and design of the study, analysis of the results obtained, editing the manuscript;
 N.B. Senuta: collection and systematization of clinical data, analysis of the reaction of immunofluorescence;
 I.V. Botezat: determination of EBV DNA concentration in blood plasma samples from NPC patients and control persons by real-time PCR;
 A.V. Ignatova, A.A. Zolotarev: information about NPC patients and their clinical follow-up;
 T.E. Dushenkina: test of immunofluorescence;
 A.V. Lichtenstein: analysis of the correlation between plasma EBV DNA concentration and clinical state of NPC patients; decoration of drawings;
 V.E. Gurtsevitch: organization of the research, drawing up tables, writing a manuscript.

ORCID авторов / ORCID of authors

К.В. Смирнова / K.V. Smirnova: <https://orcid.org/0000-0001-6209-977X>
 Н.Б. Сенюта / N.B. Senuta: <https://orcid.org/0000-0001-8915-8274>
 И.В. Ботезату / I.V. Botezat: <https://orcid.org/0000-0002-0297-4963>
 Т.Е. Душенькина / T.E. Dushenkina: <https://orcid.org/0000-0001-8279-514X>
 А.В. Лихтенштейн / A.V. Lichtenstein: <https://orcid.org/0000-0002-0190-5069>
 В.Э. Гурцевич / V.E. Gurtsevitch: <https://orcid.org/0000-0003-1840-4364>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование выполнено в рамках экспериментального государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации при координации ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровья» Минздрава России.

Financing. Research is conducted under the auspices of the experimental governmental assignment of the Ministry of Health of the Russian Federation and coordinated by the Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Ministry of Health of the Russia.

Информированное согласие. Все участники исследования подписали информированное согласие.

Informed consent. All participants in the study had written informed consent.

Статья поступила: 05.04.2021. **Принята к публикации:** 09.09.2021.

Article submitted: 05.04.2021. **Accepted for publication:** 09.09.2021.