

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-116-123>

Молекулярный профиль вируса Эпштейна–Барр у представителей четырех этносов России: типы вируса, вариабельность гена *LMP1* и злокачественные опухоли

К.В. Смирнова^{1,2}, А.К. Лубенская¹, Н.Б. Сенюта¹, Т.Е. Душенькина¹, В.Э. Гурцевич¹

¹Научно-исследовательский институт канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115452 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»; Россия, 117998 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

Контакты: Владимир Эдуардович Гурцевич gurtsevitch-vlad-88@yandex.ru

Введение. Обнаружение 2 типов вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ) – ВЭБ 1-го (ВЭБ-1) и 2-го (ВЭБ-2) типов, – различающихся по трансформирующим способностям, стимулировало их изучение в различных популяциях с целью выяснения связи со злокачественными новообразованиями.

Цель исследования – изучение ВЭБ-1 и ВЭБ-2 у представителей четырех этносов России, сиквенсный анализ онкогена *LMP1* в изолятах вируса и поиск корреляции между типами ВЭБ и заболеваемостью определенными типами злокачественных опухолей.

Материалы и методы. Из тотальной ДНК, полученной из смывов полости рта адыгейцев, калмыков, татар и славян, жителей республик Адыгея, Калмыкия и Татарстан и Московской области, амплифицировали ДНК ВЭБ; ее наличие и концентрацию анализировали методом гнездовой полимеразной цепной реакции и каждый продукт исследовали на тип вируса и вариант *LMP1*. Типы ВЭБ, обнаруженные у представителей этих 4 этносов, сопоставляли с показателями заболеваемости населения названных республик и Московской области злокачественными опухолями, среди которых могут встречаются ВЭБ-ассоциированные случаи.

Результаты. Обнаружено, что более высокая заболеваемость раком желудка и лимфомами у населения Татарстана и Московской области (по сравнению с населением Адыгеи и Калмыкии) коррелировала с доминированием у представителей этих этносов – татар и славян – ВЭБ 1-го типа, обладающего трансформирующим потенциалом *in vitro*. У адыгейцев преобладал нетрансформирующий тип ВЭБ-2, а калмыки были инфицированы обоими типами вирусов примерно в равном соотношении. Однако различия между показателями заболеваемости опухолями в сравниваемых группах оказались статистически недостоверными ($p > 0,05$). Обнаруженный спектр вариантов *LMP1*, а также результаты их сиквенсного анализа свидетельствуют о генетическом родстве штаммов ВЭБ, циркулирующих в изучаемых этносах.

Заключение. Изучение изолятов ВЭБ, впервые проведенное у представителей 4 этносов одной страны, показало различие в распределении в них типов этого вируса, но связи с заболеваемостью опухолями не выявило.

Ключевые слова: вирус Эпштейна–Барр, типы вируса Эпштейна–Барр, латентный мембранный белок 1, сиквенсный анализ, адыгейцы, калмыки, татары, славяне, полимеразная цепная реакция в реальном времени, злокачественные опухоли

Для цитирования: Смирнова К.В., Лубенская А.К., Сенюта Н.Б. и др. Молекулярный профиль вируса Эпштейна–Барр у представителей четырех этносов России: типы вируса, вариабельность гена *LMP1* и злокачественные опухоли. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(4):116–23. DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-116-123>

Molecular profile of Epstein–Barr virus in representatives of four ethnic groups of Russia: virus types, *LMP1* gene variability and malignancies

K. V. Smirnova^{1,2}, A. K. Lubenskaya¹, N. B. Senyuta¹, T. E. Dushenkina¹, V. E. Gurtsevitch¹

¹Research Institute of Carcinogenesis of the N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;

²The Peoples' Friendship University of Russia; 6 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117998, Russia

Contacts: Vladimir Eduardovich Gurtsevitch gurtsevitch-vlad-88@yandex.ru

Rationale. The discovery of two Epstein–Barr virus (EBV) types, EBV-1 and EBV-2, which differ in their transforming abilities stimulated their study in various populations in order to elucidate the relationship with malignant neoplasms. **Aim.** To study EBV-1 and EBV-2 in representatives of four ethnic groups of Russia, sequence analysis of the *LMP1* oncogene in virus isolates, and search for a correlation between the types of EBV and the incidence of certain types of malignant tumors in four ethnic groups.

Materials and methods. From total DNA obtained from oral washings of Adygeans, Kalmyks, Tatars and Slavs, representatives of 3 Russian republics and the Moscow region, EBV DNA was amplified; its presence and concentration were analyzed by nested PCR, and each product was examined for the virus type and *LMP1* variant. Types of EBV found in representatives of In four ethnic groups were compared with the incidence rates of malignant tumors, among which EBV-associated cases may occur, in population of three republics and the Moscow region.

Results. It was observed that higher gastric cancer and lymphomas morbidity among Tatarstan and Moscow region populations (compared to populations of Adygea and Kalmykia) correlated with predominance in these ethnic groups – Tatars and Slavs – EBV-1 type having transforming potential *in vitro*. In Adygeis, non-transforming EBV-2 type was prevalent, and Kalmyks were infected with both types in approximately equal proportion. However, differences between tumor morbidities between the compared groups were statistically insignificant ($p > 0.05$). The identified spectrum of *LMP1* variants, as well as the results of their sequencing, show genetic relations between EBV strains circulating in the studied ethnic groups.

Conclusion. Study of EBV isolates for the first time performed in 4 ethnic groups of this country showed differences in distribution of the types of this virus but there was no correlation with tumor morbidity.

Keywords: Epstein–Barr virus, Epstein–Barr virus types, latent membrane protein 1, sequence analysis, Adyghe, Kalmyks, Tatars, Slavs, real-time polymerase chain reaction, malignant tumors

For citation: Smirnova K.V., Lubenskaya A.K., Senyuta N.B. et al. Molecular profile of Epstein–Barr virus in representatives of four ethnic groups of Russia: virus types, *LMP1* gene variability and malignancies. *Uspehi Molekularnoj Onkologii* = Advances in Molecular Oncology 2023;10(4):116–23. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2023-10-4-116-123>

ВВЕДЕНИЕ

Открытие двух генотипов вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ) – ВЭБ 1-го (ВЭБ-1) и 2-го (ВЭБ-2) типов – стимулировало их изучение в различных популяциях с целью выяснения связи со злокачественными новообразованиями. Эти типы различаются по гену *EBNA-2*, у которого между 1-м и 2-м типом имеется только 54 % гомологии. Более детальный анализ геномов ВЭБ показал, что у двух типов вируса большинство изменений локализуется в последовательностях не только *EBNA2*, но и генов *EBNA3A*, *-B* и *-C* [1]. Фенотипическое же различие между этими типами вируса заключается в способности ВЭБ-1, в отличие от ВЭБ-2, трансформировать В-лимфоциты *in vitro* [2]. Недавние эксперименты показали, что хотя лимфобластные клеточные линии (LCL), инфицированные ВЭБ-2, растут медленнее, чем инфицированные ВЭБ-1, оба типа вируса у мышей СВН индуцируют В-клеточные лимфомы [3].

Дальнейшее изучение названных типов ВЭБ позволило выявить их различия не только по трансформирующим активностям, но и по степени убиквитарности в разных группах населения. Действительно, число зараженных лиц каждым типом этого вируса в разных популяциях существенно варьирует. Сводные данные многих исследований показывают, что население европеоидной расы инфицировано ВЭБ-1 примерно в 74 % случаев, ВЭБ-2 – в 19 %, обоими типами вируса – в 11 %. Изучение здоровых лиц азиатского происхождения продемонстрировало анало-

гичное распределение пациентов в зависимости от наличия у них того или иного типа ВЭБ с еще большим преобладанием ВЭБ-1 (85, 4 и 11 % соответственно) [4–6]. Однако существуют данные, свидетельствующие о довольно широком распространении ВЭБ-2 среди определенных групп населения. В частности, D. van Baarle и соавт. выявили, что у 50 % пациентов, на протяжении длительного времени асимптоматически инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), присутствует ВЭБ-2 [7]. У больных неходжкинской лимфомой, у которых наблюдались прогрессирование ВИЧ-инфекции и синдром приобретенного иммунного дефицита (СПИД), инфицирование ВЭБ-2 оказалось еще выше: 62 и 53 % соответственно. Вирус Эпштейна–Барр 2-го типа встречался и у здоровых лиц. В США в смывах полости рта у случайно отобранных доноров г. Мемфиса в 41 % случаев обнаружен ВЭБ-1, в 50 % – ВЭБ-2 [8].

На основе генетического разнообразия гена *LMP1*, который демонстрирует большую степень полиморфизма, чем большинство других генов вируса, изоляты ВЭБ вне зависимости от типа были отнесены к различным вирусным штаммам [9]. В ходе изучения взаимосвязи между типом ВЭБ и наличием делеций в гене *LMP1* было обнаружено, что почти все изоляты китайского происхождения относятся к ВЭБ-1 и содержат делецию 30 п. н. с характерными а. к. заменами в его белковом варианте (*LMP1*) [10]. Однако, в отличие от китайских изолятов, вирусные изоляты, полученные от лиц из других географических регионов,

демонстрировали преимущественную ассоциацию делеции 30 п. н. в *LMP1* с ВЭБ-2. Эта связь была особенно очевидной в Африке, где широко распространен ВЭБ-2. Превалирование этого типа ВЭБ с делецией 30 п. н. в гене *LMP1* выявлено также в японской популяции [11]. Существует мнение, что большинство молекулярных полиморфизмов, обнаруженных в изолятах ВЭБ здоровых носителей вируса, с одинаковой частотой встречаются и в вирус-ассоциированных опухлях лиц того же географического региона [12].

На основании имеющихся данных литературы можно сделать вывод, что различная распространенность ВЭБ-1 и ВЭБ-2 среди населения разных стран, здоровых лиц и больных злокачественными опухолями, обусловлена многими факторами, но, по-видимому, главным образом генетическими особенностями популяций. Исходя из этого, изучение опухоль-специфических свойств каждого из типов вируса имеет смысл проводить среди этносов, представляющих генетически однородные группы населения.

Цель исследования — изучение распространенности типов ВЭБ у представителей 4 этносов России (адыгейцев, калмыков, татар и славян), различающихся генетически, и что важно, из разных климатогеографических территорий страны. Задачи исследования состояли в сиквенсном анализе гена *LMP1* в циркулирующих штаммах вируса и определении вариантов его онкобелка, а также в поиске корреляции между обнаруженными типами ВЭБ у представителей 4 этносов и показателями заболеваемости новообразованиями, среди которых встречаются ВЭБ-ассоциированные случаи.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. Изучены смывы полости рта представителей 4 этносов России: 59 адыгейцев (25 мужчин и 34 женщины из г. Майкоп, Республика Адыгея), 49 калмыков (19 мужчин и 31 женщины из г. Элиста, Республика Калмыкия), 60 татар (15 мужчин и 45 женщин из г. Казань, Республика Татарстан) и 40 славян (19 мужчин и 21 женщины из Московской области (МО)). Все участники исследования были практически здоровыми лицами и являлись представителями соответствующего этноса не менее чем в 3 поколениях. Каждый смыв состоял из суспензии клеток, полученных индивидуально после полоскания полости рта в течение 30 с 15 мл стерильного физиологического раствора. Образцы смывов, собранные в герметично закрывающиеся пластиковые пробирки, хранились при температуре +4 °C не более 2 сут до исследования.

Экстракция ДНК и амплификация гена *LMP1*. Из клеток смывов полости рта, собранных после центрифугирования, выделяли тотальную ДНК методом фенол-хлороформной депротеинизации. Наличие и концентрацию ДНК ВЭБ, амплифицированную из образцов тотальной ДНК, анализировали методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ), описанным нами ранее [13]. Амплификацию гена *LMP1* проводили

в 2 этапа с внешними и внутренними праймерами по ранее принятой нами методике [14]. Каждый ПЦР-продукт очищали на мини-колонке QIAGEN (QIAquick PCR Purification kit, cat. 28104, Германия) согласно инструкции производителя. Для реакции использовали примерно 100–200 нг ПЦР-продукта, концентрацию ДНК оценивали визуально в агарозном геле. Для положительного контроля применяли ДНК, выделенную из используемой в качестве стандарта клеточной линии B95–8, а для отрицательного контроля — воду.

Типирование вируса Эпштейна–Барр методом гнездовой полимеразной цепной реакции гена *EBNA-2*. Типирование изолятов ВЭБ на ВЭБ-1 и ВЭБ-2 проводили с помощью гнездовой ПЦР, следуя описанному ранее методу [15] с незначительными модификациями. Используемые праймеры продемонстрировали высокую специфичность и отсутствие перекрестной реактивности с геномом человека и другими вирусами или микроорганизмами [16].

Количественное измерение вирусной ДНК. Число копий ДНК ВЭБ в смывах полости рта изучаемых лиц определяли с помощью ПЦР-РВ по методике, описанной в работе Y.M. Lo и соавт. [17]. Для определения числа копий использовали ДНК диплоидных клеток Namalwa, содержащих 2 интегрированных вирусных генома; при этом исходили из соотношения 3,3 пг геномной ДНК — 1 копия вирусной ДНК [18]. Детали проведения реакции описаны нами ранее [19].

Секвенирование продуктов полимеразной цепной реакции *LMP1*. Ампликоны *LMP1* секвенировали в обоих направлениях. Секвенирование проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator, v. 3.1 (США) с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3100-Avant (США). Обработку данных секвенирования выполняли с помощью программ Chromas 230 и Vector NT (Invitrogen, США).

Классификация *LMP1*. Нуклеотидные последовательности образцов *LMP1*, амплифицированные из изолятов ВЭБ смывов полости рта и транслированные в аминокислотные последовательности, подверглись анализу с помощью известной в литературе классификации R.N. Edwards и соавт. [20].

Статистический анализ. Число копий ДНК ВЭБ в смывах полости рта лиц в исследуемых группах оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни. Результаты представлены в виде медиан с межквартильным интервалом (25-й и 75-й процентиля). С помощью точного теста Фишера рассчитывали значение *p* при сравнении числа лиц, инфицированных ВЭБ-1 или ВЭБ-2; различия считали статистически значимыми при *p* ≤ 0,05. Вычисления проводили с помощью статистических пакетов Statistica for Window 10.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Инфицированность вирусом Эпштейна–Барр полости рта. В нашем исследовании распространенность ВЭБ-1

и ВЭБ-2 впервые была изучена у представителей 4 этносов из одной и той же страны, России: адыгейцев, калмыков, татар и славян. Полученные результаты свидетельствуют о том, что представители всех этносов являются вирусоносителями ВЭБ, поскольку у большинства из них в смывах полости рта обнаружены копии ДНК данного вируса. При этом концентрации ВЭБ были невысокими (табл. 1). Об этом свидетельствуют медианы чисел копий ДНК вируса на 1 клетку смыва (от 0,0000 до 0,0109), различия между которыми у представителей этнических групп были статистически недостоверными ($p < 0,05$).

Типы вируса Эпштейна–Барр. ДНК ВЭБ, амплифицированную из тотальной ДНК клеточной суспензии смывов полости рта участников исследования, тестировали на принадлежность к ВЭБ-1 или ВЭБ-2. Пример тестирования вируса представлен на рис. 1.

Результаты тестирования показали, что ВЭБ-1 доминировал в группах славян и татар (81 % (30/37) и 83 % (30/37) соответственно), а в группе адыгейцев преобладал ВЭБ-2 (81 % (48/52)) (рис. 2). В группе калмыков соотношение лиц, инфицированных каждым типом вируса, было практически одинаковым (ВЭБ-1 – 51 % (25/49), ВЭБ-2 – 49 % (24/49)). В группах калмыков, славян и татар инфицированы обоими типами ВЭБ оказались по 1 испытуемому.

Полиморфизм образцов гена LMP1 вируса Эпштейна–Барр. Нуклеотидные последовательности гена LMP1, транслированные в аминокислотные, позволяли для каждого образца онкобелка LMP1 установить его вариант на основе классификации R.N. Edwards и соавт. [20]. Обнаруженные варианты LMP1, а также результаты их секвенирования представлены в табл. 2. Согласно приведенным в ней данным низко трансформирующий вариант В-95.8 был характерен для

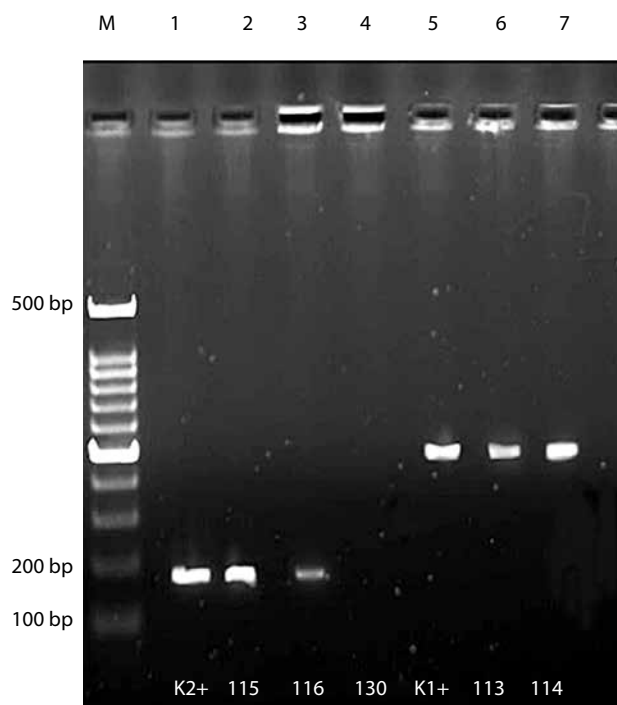


Рис. 1. Результаты обнаружения вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ) и его типирования на ВЭБ 1-го (ВЭБ-1) и 2-го (ВЭБ-2) типов с помощью гнездовой полимеразной цепной реакции (ПЦР). Ожидаемые размеры продуктов гнездовой ПЦР составляли 497 п. н. (ВЭБ-1) и 165 п. н. (ВЭБ-2). Дорожки: М – 100 bp маркер; 1 – позитивный контроль на ВЭБ-2; 2 и 3 – образцы 115 и 116 ВЭБ-2-положительны; 4 – образец 130 ВЭБ-1-и ВЭБ-1-отрицателен; 5 – положительный контроль на ВЭБ-1; 6 и 7 – образцы 113 и 114 ВЭБ-1-положительны

Fig. 1. Results of identification of Epstein–Barr virus (EBV) and its typing for type 1 EBV (EBV-1) and type 2 EBV (EBV-2) using nested polymerase chain reaction (PCR). Anticipated sizes of nested PCR products were 497 bp (EBV-1) and 165 bp (EBV-2). Lanes: M – 100 bp marker; 1 – positive control for EBV-2; 2 and 3 – samples 115 and 116 are EBV-1 positive; 4 – sample 130 is EBV-1 and EBV-2 negative; 5 – positive control for EBV-1; 6 and 7 – samples 113 and 114 are EBV-1 positive

Таблица 1. Инфицированность вирусом Эпштейна–Барр полости рта адыгейцев, калмыков, татар и славян

Table 1. Epstein–Barr virus infection of the oral cavity of Adygeans, Kalmyks, Tatars and Slavs

Представители этносов России Representatives of Russian ethnic groups	Число обследованных лиц, n Number of investigated persons, n	М/Ж M/F	Средний возраст, лет Average age, years	Число копий ДНК вируса на 1 клетку смыва полости рта, медиана (межквартильный интервал) Number of virus DNA copies per cell of oral washings, median (interquartile range)
Адыгейцы (Республика Адыгея) Adygeans (Republic of Adygeya)	58	24/34	41,4	0,0000 (0,0001–0,0041)
Калмыки (Республика Калмыкия) Kalmyks (Republic of Kalmykia)	48	18/29	21,4	0,0109 (0–0,2211)
Татары (Республика Татарстан) Tatars (Republic of Tatarstan)	60	15/45	21,5	0,000 (0–0,0090)
Славяне (Московская область) Slavs (Moscow Region)	40	21/19	47,5	0,0100 (0–0,2570)

Примечание. М – мужчины; Ж – женщины.

Note. M – men; W – women.

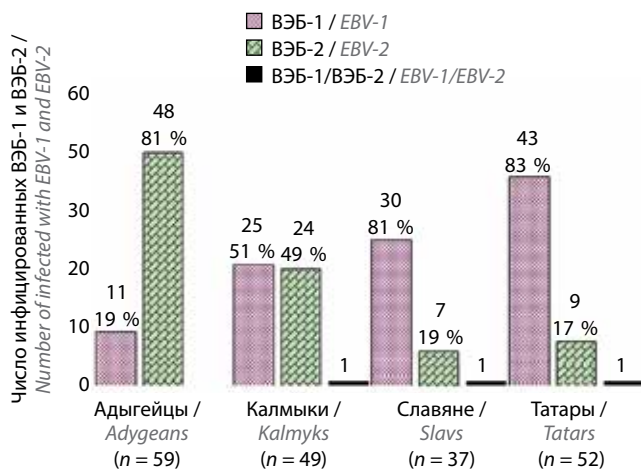


Рис. 2. Соотношение вируса Эпштейна–Барр 1-го (ВЭБ-1) и 2-го (ВЭБ-2) типов в смывах полости рта этнических адыгейцев, калмыков, татар и славян. Цифры над столбиками указывают число обследованных, у которых обнаружен ВЭБ

Fig. 2. The detected ratio of the Epstein–Barr virus of the first (EBV-1) and second (EBV-2) types in oral washings of ethnic Adygeans, Kalmyks, Tatars and Slavs. The number of infected with detected EBV types

100 % изолятов адыгейцев. Этот же вариант LMP1 был широко представлен у калмыков (75,9 %; 22/29) и сла-

вян (82,5 %; 33/40), в меньшей степени — у татар (34,1 %; 14/41). Вариант China1 (аналог высокотрансформирующего китайского варианта Cao) выявлен у представителей калмыков в 17,2 % (5/29), славян — в 7,5 % (3/40) и татар — в 9,8 % (4/41). У представителей этих же этнических групп обнаружен вариант Mediterranean— (Med—) в 3,4 % (1/29), 2,5 % (1/40) и 14,6 % (6/41) случаев соответственно, а вариант North Carolina (NC) — только у калмыков (в 3,4 % (1/29) случаев) и славян (7,5 % (3/40) случаев).

У представителей татар из 41 образца по той же классификации варианты LMP1 были определены в 24 случаях. При этом, как показано в табл. 2, вариант LMP1-B95.8 обнаружен в 34,1 % (14/41) случаев, LMP1-China-1 — в 9,8 % (4/41) и Med— — в 14,6 % (6/41).

Остальные 17 из 41 (41,5 %) образцов LMP1 не могли быть интерпретированы с помощью упомянутой классификации, что позволило отнести их к образцам вне классификации. В составе 24 идентифицированных вариантов LMP1 обнаружены 8 образцов (8/24; 3,0 %), которые характеризовались сочетанным содержанием делеций 5 а. к. в кодонах 312–316 и 382–386, не характерных ни для одного из известных нам вариантов LMP1. Эта группа, относящаяся к конкретному этносу —

Таблица 2. Полиморфизм LMP1 в изолятах вируса Эпштейна–Барр из смывов полости рта адыгейцев, калмыков, татар и славян

Table 2. LMP1 polymorphism in Epstein–Barr virus isolates from oral washings of Adygeans, Kalmyks, Tatars and Slavs

Обследованные лица Investigated persons	Число выделенных образцов LMP1, абс. (%) Number of obtained LMP1 samples, abs. (%)	Варианты LMP1 по классификации R.N. Edwards и соавт. [18], n (%) LMP1 variants by classification of R.N. Edwards et al. [18], n (%)				Варианты LMP1, не входящие в классификацию R.N. Edwards и соавт. [18], n (%) LMP1 variants out of classification of R.N. Edwards et al. [18], n (%)	Мутации в областях CTAR гена LMP1, n (%) Mutations in CTAR regions of the LMP1 gene, n (%)		
		B95.8	China-1	Med—	NC—		CTAR1 191–232	CTAR2 351–386	CTAR3 275–330
Адыгейцы (Республика Адыгея) Adygeans (Republic of Adygeya) (n = 58)	29/58 (50,0)	29/29 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	—	S229T 2/29 (6,9)	S366T 1/29 (3,4)	S309T/N 2/29 (6,9)
Калмыки (Республика Калмыкия) Kalmyks (Republic of Kalmykia) (n = 48)	29/50 (58,0)	22/29 (75,9)	5/29 (17,2)	1/29 (3,4)	1/29 (3,4)	—	S229T 2/29 (6,9)	S366A/T 6/29 (20,7)	S309/N 8/29 (16,9) Q322E/T 7/29 (24,1)
Татары (Республика Татарстан) Tatars (Republic of Tatarstan) (n = 60)	41/60 (69,5)	14/41 (34,1)	4/41 (9,8)	6/41 (14,6)	0 (0)	17/41 (41,5 %)	S229T 8/41 (19,5)	S366A/T 22/41 (53,6)	S309N 2/41 (4,9) Q322N/E 9/41 (22,0)
Славяне (Московская область) Slavs (Moscow region) (n = 40)	40/40 (100)	33/40 (82,5)	3/40 (7,5)	1/40 (2,5)	3/40 (7,5)	—	0 (0)	S366/T 19/40 (47,5) L338S 7/40 (17,5)	S309N; 4/40 (10,0) Q322N/E/T 7/40 (17,5) E328Q 4/12 (30,0)

татарам — и обозначенная как LMP1-Tat^K (Татарстан-Казань), заслуживает дальнейшего изучения.

Сиквенсный анализ трех транс-активирующих доменов С-терминальной области изучаемых образцов LMP1 показал наличие в этих доменах важных ключевых мутаций. В частности, в домене STAR1 у образцов LMP1, принадлежащих представителям адыгейцев, калмыков и татар, выявлена мутация в кодоне 229 (S→T) в 6,9; 6,9 и 19,5 % случаев соответственно. В домене STAR2 образцы LMP1 у представителей всех 4 изучаемых этносов содержали мутации в кодоне 366 (S→A/T) в диапазоне в 3,4–53,6 % случаев. В домене STAR3 образцы LMP1 представителей всех этносов также содержали мутацию в кодоне 309 (S→T/N) с частотой 4,9–16,9 % случаев. В этом же домене у представителей калмыков, татар и славян выявлена мутация в кодоне 322 (Q→N/E/T) (в 24,1; 22,0 и 17,5 % случаев соответственно) и только в группе славян в 30 % случаев (4/12) обнаружена мутация в кодоне 328 (E→Q). На основании данных полиморфизма и результатов сиквенсного анализа образцов LMP1 представителей адыгейцев, калмыков и татар можно сделать вывод, что циркулирующие в этих группах штаммы ВЭБ обладают генетическим родством. Несмотря на то что штаммы ВЭБ славянского происхождения характеризовались отсутствием в LMP1 мутаций в домене STAR1 и увеличенным числом мутаций в доменах STAR2 и STAR3, с учетом остальных показателей их

также можно отнести к штаммам, генетически близким к таковым у представителей 3 других этносов.

Типы вируса Эпштейна–Барр и заболеваемость опухолями. Для определения того, влияют ли типы ВЭБ на уровень злокачественных новообразований, показатели заболеваемости у населения 3 республик и МО опухолями, среди которых встречаются ВЭБ-ассоциированные новообразования, сравнивали с данными распространенности типов ВЭБ у представителей этих этносов (адыгейцев, калмыков, татар и славян).

В состав анализируемых новообразований были включены опухоли желудка, полости рта, глотки и лимфомы, среди которых встречаются ВЭБ-ассоциированные случаи. Результаты анализа представлены на рис. 3. Стандартизованные показатели заболеваемости на 100 тыс. населения за 2020 г. [21] опухолями полости рта и глотки у населения 3 республик и МО были невысокими: от 7 до 38 на 100 тыс. человек. Заболеваемость лимфомами и раком желудка характеризовалась значительно более высокими показателями. При этом их значения для населения Республики Татарстан (95 и 121 случай соответственно) и МО (103 и 125 случаев соответственно) коррелировали с доминированием у представителей этих регионов трансформирующего *in vitro* ВЭБ-1. В Республике Адыгея, представители которой инфицированы преимущественно нетрансформирующим типом ВЭБ (ВЭБ-2), и Республике Калмыкия, представители которой инфицированы обоими типами вируса в равных соотношениях, наблюдались более низкие показатели заболеваемости этими же формами опухоли (81 и 72 случая и 50 и 63 случая на 100 тыс. населения соответственно). Однако статистический анализ показал, что различия между показателями заболеваемости лимфомами и раком желудка у населения Республики Татарстан и МО, с одной стороны, и республик Адыгея и Калмыкия, с другой, были статистически недостоверными ($p > 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

В проведенном исследовании инфицированность ВЭБ-1 и ВЭБ-2 была впервые изучена у представителей 4 этносов, живущих в республиках Адыгея, Калмыкия, Татарстан и МО, расположенных на территориях, различающихся географически и климатически. Неодинаковый характер инфицированности двумя типами ВЭБ, обнаруженный у здоровых представителей данных этносов, и отсутствие (кроме единичных случаев) в этих группах лиц с двойной инфекцией позволяют предположить, что на процесс распространения типов ВЭБ оказывает влияние совокупность факторов. Среди них большую роль, по-видимому, играют генетические особенности популяций, типы главного комплекса гистосовместимости, состояние иммунной системы, факторы окружающей среды, особенности быта и, не исключено, кулинарные предпочтения. Вероятно, по этой же причине население европеоидной расы инфицировано преимущественно ВЭБ-1,

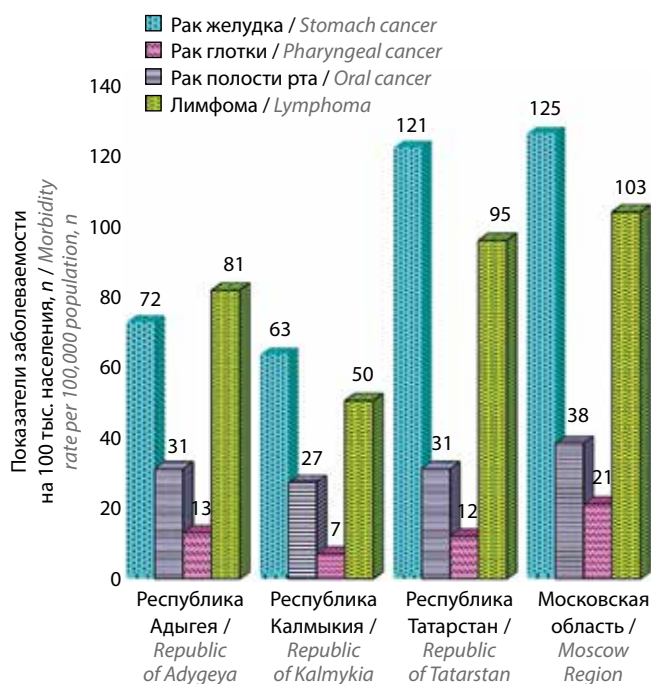


Рис. 3. Показатели заболеваемости злокачественными опухолями, в том числе ассоциированными с вирусом Эпштейна–Барр, у населения республик Адыгея, Калмыкия, Татарстан и Московской области [21]
Fig. 3. Incidence rates of malignant tumors with Epstein–Barr virus-associated cases in population of the Republics of Adygeya, Kalmykia, Tatarstan and the Moscow Region [21]

а население некоторых стран Африки — ВЭБ-2 [22]. Этими же факторами, по-видимому, обусловлены многообразие морфологических форм опухолей, ассоциированных с ВЭБ, и преобладание некоторых из них у определенных групп населения или целых этносов. Оказывает ли каждый из типов вируса влияние на клиническое течение ВЭБ-ассоциированных опухолей, их чувствительность к проводимой терапии и прогноз — вопросы, которые требуют дальнейшего изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявленное своеобразие распределения ВЭБ-1 и ВЭБ-2 у представителей 4 этносов не обнаружило связи с заболеваемостью ВЭБ-ассоциированными опухолями у населения республик Адыгея, Калмыкия, Татарстан и МО, представляющих изучаемые этносы. Однако необходимо отметить, что попытки обнаружить существование вариантов ВЭБ, специфически связанных с конкретными опухолями, предпринима-

лись многими исследователями, но до сих пор ни к чему не привели. Тем не менее полностью исключить существование штаммов ВЭБ, этиологически причастных к возникновению определенных новообразований человека, нельзя. Изолированный от китайского больного раком носоглотки штамм ВЭБ М-81, обладающий высокой склонностью к эпителиотропизму, может стать одним из вирусов, ассоциированных с опухолями эпителиального происхождения [23]. В связи с этим поиски вариантов ВЭБ и его типов, специфических для определенных типов опухолей среди различных этносов, представляются задачей оправданной, хотя и довольно сложной из-за гетерогенности генов ВЭБ. Обнаружение в России типов ВЭБ с конкретной органной онкотропностью является, на наш взгляд, актуальным вопросом, поскольку в перспективе его решение способствовало бы созданию эффективной вакцины для борьбы с соответствующими новообразованиями.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Sample J., Young L., Martin B. et al. Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their *EBNA-3A*, *EBNA-3B*, and *EBNA-3C* genes. *J Virol* 1990;64(9):4084–92. DOI: 10.1128/JVI.64.9.4084-4092.1990
- Rickinson A.B., Young L.S., Rowe M. Influence of the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA 2 on the growth phenotype of virus-transformed B cells. *J Virol* 1987;61(5):1310–7. DOI: 10.1128/JVI.61.5.1310-1317.1987
- Romero-Masters J.C., Huebner S.M., Ohashi M. et al. B cells infected with type 2 Epstein-Barr virus (EBV) have increased NFATc1/NFATc2 activity and enhanced lytic gene expression in comparison to type 1 EBV infection. *PLoS Pathog* 2020;16(2):e1008365. DOI: 10.1371/journal.ppat.1008365. eCollection 2020
- Correa R.M., Fellner M.D., Alonzo L.V. et al. Epstein-Barr virus (EBV) in healthy carriers: distribution of genotypes and 30 bp deletion in latent membrane protein-1 (LMP-1) oncogene. *J Med Virol* 2004;73(4):583–8. DOI: 10.1002/jmv.20129
- Apolloni A., Sculley T.B. Detection of A-type and B-type Epstein-Barr virus in throat washings and lymphocytes. *Virology* 1994;202(2):978–81. DOI: 10.1006/viro.1994.1422
- Srivastava G., Wong K.Y., Chiang A.K. et al. Coinfection of multiple strains of Epstein-Barr virus in immunocompetent normal individuals: reassessment of the viral carrier state. *Blood* 2000;95(7):2443–5. DOI: 10.1182/blood.V95.7.2443
- van Baarle D., Hovenkamp E., Kersten M.J. et al. Direct Epstein-Barr virus (EBV) typing on peripheral blood mononuclear cells: no association between EBV type 2 infection or superinfection and the development of acquired immunodeficiency syndrome-related non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1999;93(11):3949–55. DOI: 10.1182/blood.V93.11.3949
- Sixbey J.W., Shirley P., Chesney P.J. et al. Detection of a second widespread strain of Epstein-Barr virus. *Lancet* 1989;2(8666):761–5. DOI: 10.1016/S0140-6736(89)90829-5
- Walling D.M., Brown A.L., Etienne W. et al. Multiple Epstein-Barr virus infections in healthy individuals. *J Virol* 2003;77(11):6546–6550. DOI: 10.1128/jvi.77.11.6546-6550.2003
- Cheung S.T., Leung S.F., Lo K.W. et al. Specific latent membrane protein 1 gene sequences in type 1 and type 2 Epstein-Barr virus from nasopharyngeal carcinoma in Hong Kong. *Int J Cancer* 1998;76(3):399–406. DOI: 10.1002/(sici)1097-0215(19980504)76:3<399::aid-ijc18>3.0.co;2-6
- Oshima M., Azuma H., Okuno A. High prevalence of Epstein-Barr virus type A strain with the 30 b.p. deletion of the latent membrane protein-1 gene in a Japanese population. *Pediatr Int* 1999;41(5):490–5. DOI: 10.1046/j.1442-200x.1999.01122.x
- Khanim F., Yao Q.Y., Niedobitek G. et al. Analysis of Epstein-Barr virus gene polymorphisms in normal donors and in virus-associated tumors from different geographic locations. *Blood* 1996;88(9):3491–501. DOI: 10.1182/blood.V88.9.3491.bloodjournal8893491
- Смирнова К.В., Сеньюта Н.Б., Ботезату И.В. и др. Вирус Эпштейна-Барр у этнических татар: инфицированность и сиквенсные варианты онкогена LMP1. *Успехи молекулярной онкологии* 2018;5(3):65–74. Smirnova K.V., Senyuta N.B., Botezatu I.V. et al. Epstein-Barr virus in the ethnic Tatars population: the infection and sequence variants of LMP1 oncogene. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2018;5(3):65–74. (in Russ). DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-3
- Hahn P., Novikova E., Scherback L. et al. The LMP1 gene isolated from Russian nasopharyngeal carcinoma has no 30-bp deletion. *Int J Cancer* 2001;91(6):815–21. DOI: 10.1002/1097-0215(200002)9999:9999<::aid-ijc1122>3.0.co;2-w
- Rocio H., White L.R., Stefanoff C.G. et al. Epstein-Barr Virus (EBV) detection and typing by PCR: a contribution to diagnostic screening of EBV-positive Burkitt's lymphoma. *Diagn Pathol* 2006;1:17. DOI: 10.1186/1746-1596-1-17
- Salahuddin S., Khan J., Azhar J.B. et al. Prevalence of Epstein-Barr virus genotypes in Pakistani lymphoma patients. *Asian Pac J Cancer Prev* 2018;19(11):3153–9. DOI: 10.31557/APJCP.2018.19.11.3153
- Lo Y.M., Chan L.Y., Chan A.T. et al. Quantitative and temporal correlation between circulating cell-free Epstein-Barr virus DNA and tumor recurrence in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 1999;59(21):5452–55.
- Lawrence J.B., Villave C.A., Singer R.H. Sensitive, high-resolution chromatin and chromosome mapping in situ: presence

and orientation of two closely integrated copies of EBV in a lymphoma line. *Cell* 1988;52(1):51–61.

DOI: 10.1016/0092-8674(88)90530-2

19. Botezatu I.V., Kondratova V.N., Shelepov V.P., Lichtenstein A.V. DNA melting analysis: application of the “open tube” format for detection of mutant KRAS. *Anal Biochem* 2011;419(2):302–8. DOI: 10.1016/j.ab.2011.08.015

20. Edwards R.H., Seillier-Moiseiwitsch F., Raab-Traub N. Signature amino acid changes in latent membrane protein 1 distinguish Epstein–Barr virus strains. *Virology* 1999;261(1):79–95. DOI: 10.1006/viro.1999.9855

21. Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петрова. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал

ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2021. Malignant neoplasms in Russia in 2020 (morbidity and mortality). Ed. by A.D. Kaprin, V.V. Starinskii, G.V. Petrova. M.: P.A. Herzen Moscow State Medical Research Institute – branch of the Federal State Budgetary Institution “NMIC of Radiology” of the Ministry of Health of Russia, 2021. (In Russ.).

22. Young L.S., Yao Q.Y., Rooney C.M. et al. New type B isolates of Epstein–Barr virus from Burkitt’s lymphoma and from normal individuals in endemic areas. *J Gen Virol* 1987;68(Pt. 11):2853–62. DOI: 10.1099/0022-1317-68-11-2853
23. Tsai M.H., Raykova A., Klinke O. et al. Spontaneous lytic replication and epitheliotropism define an Epstein–Barr virus strain found in carcinomas. *Cell Rep* 2013;5(2):458–70. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.09.012

Вклад авторов

К.В. Смирнова: организация исследования, анализ полученных данных, редактирование;

А.К. Лубенская: детекция типов ВЭБ, определение концентрации ДНК ВЭБ в плазме;

Н.Б. Сенюта: систематизация результатов исследования, анализ гуморального ответа к ВЭБ;

Т.Е. Душенькина: сбор и обработка биологического материала, проведение реакции иммунофлуоресценции;

В.Э. Гурцевич: идея, написание текста статьи, подготовка таблиц и рисунков.

Authors’ contribution

K.V. Smirnova: organization of research, analysis of the obtained data, editing;

A.K. Lubenskaya: detection of EBV types, determination of EBV DNA concentration in plasma;

N.B. Senyuta: systematization of research results, analysis of the humoral response to VEB;

T.E. Dushenkina: collection and processing of biological material, conducting an immunofluorescence reaction;

V.E. Gurevich: the idea, article writing, preparing tables and figures.

ORCID авторов / ORCID of authors

К.В. Смирнова / K.V. Smirnova: <https://orcid.org/0000-0001-6209-977X>

А.К. Лубенская / A.K. Lubenskaya: <https://orcid.org/0000-0003-3953-7449>

Н.Б. Сенюта / N.B. Senyuta: <https://orcid.org/0000-0001-8915-8274>

Т.Е. Душенькина / T.E. Dushenkina: <https://orcid.org/0000-0001-8279-514X>

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 проведено без спонсорской поддержки.

Funding. The study was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике Научно-исследовательского института канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина».

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with the rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia.

All patients signed an informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 19.06.2023. **Принята к публикации:** 18.09.2023.

Article submitted: 19.06.2023. **Accepted for publication:** 18.09.2023.