

ВИРУС ЭПШТЕЙНА–БАРР У БОЛЬНЫХ РАКОМ НОСОГЛОТКИ И ЗДОРОВЫХ ЛИЦ В ДВУХ ГЕОГРАФИЧЕСКИ РАЗЛИЧНЫХ РЕГИОНАХ РОССИИ

Н.Б. Сенюта, А.В. Игнатова, М.В. Ломая, Е.В. Гончарова, Л.Н. Щербак,
Т.Е. Душенькина, Д.В. Гугунов, А.М. Мудунов, В.Э. Гурцевич

ФГБУ Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина МЗ РФ, Москва, Россия

Резюме. Известно, что вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ), широко распространенный в человеческой популяции, является также этиологическим агентом для широкого спектра злокачественных новообразований. Примечательной особенностью опухолей, ассоциированных с ВЭБ, является их отличающийся уровень заболеваемости в различных географических регионах. На уровне заболеваемости ВЭБ-ассоциированными патологиями оказывает влияние вариабельность многочисленных локусов генома вируса и его онкогена — латентного мембранного белка 1 (LMP1), с которым связан трансформирующий потенциал вируса. Учитывая многонациональный состав населения России, разнообразие географических зон и условий его проживания, представлялось актуальным изучить у жителей из разных географических регионов страны характер их взаимоотношения с ВЭБ. Для решения поставленной задачи антителный ответ к локально циркулирующим штаммам ВЭБ, определяемый методом непрямой иммунофлуоресценции, изучали у представителей Центрального, Северо-Кавказского и Дальневосточного федеральных округов, здоровых и больных различными опухолями головы и шеи. Полученные титры антител сопоставляли с показателями заболеваемости в этих же округах опухолями носоглотки (ОНГ). С целью выяснения наличия структурных модификаций в гене LMP1 у штаммов ВЭБ, циркулирующих в изучаемых географических регионах, указанный ген из биологического материала, собранного от представителей изучаемых групп, был амплифицирован методом «гнездовой» ПЦР и секвенирован. Исследования показали, что уровни гуморального ответа к ВЭБ у представителей, вошедших в исследование регионов, существенно разнятся. При этом было обнаружено, что у жителей Республики Дагестан и Чеченской Республики (представителей Северо-Кавказского федерального округа), имеет место корреляция между усиленным гуморальным ответом к ВЭБ и повышенной заболеваемостью ОНГ. Поскольку среди ОНГ доминирует ВЭБ-ассоциированная форма рака носоглотки (РНГ^{ВЭБ}), то полученные данные позволяют предположить наличие у населения этих республик генетической предрасположенности к повышенной репликации ВЭБ и, соответственно, к повышенной заболеваемости РНГ^{ВЭБ}. Исследование также показало, что представители изученных регионов инфицированы штаммами ВЭБ, образцы LMP1 которых относятся к известным в литературе вариантам, таким как B95.8, China 1, Med+, Med– и NC, но вариант

Адрес для переписки:

Гурцевич Владимир Эдуардович
115478, Россия, Москва, Каширское ш., 24,
ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина МЗ РФ.
Тел.: 8 (499) 324-25-64 (служебн.); 8 910 444-83-52 (моб.).
Факс: 8 (499) 324-12-05.
E-mail: gurtsevitch-vlad-88@yandex.ru

Contacts:

Vladimir E. Gurtsevitch
115478, Russia, Moscow, Kashirskoye highway, 24,
N.N. Blokhin Cancer Research Center.
Phone: +7 (499) 324-25-64 (office); +7 910 444-83-52 (mobile).
Fax: +7 (499) 324-12-05.
E-mail: gurtsevitch-vlad-88@yandex.ru

Библиографическое описание:

Сенюта Н.Б., Игнатова А.В., Ломая М.В., Гончарова Е.В., Щербак Л.Н., Душенькина Т.Е., Гугунов Д.В., Мудунов А.М., Гурцевич В.Э. Вирус Эпштейна–Барр у больных раком носоглотки и здоровых лиц в двух географически различных регионах России // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 1. С. 41–50. doi: 10.15789/2220-7619-2017-1-41-50

Citation:

Senyuta N.B., Ignatova A.V., Lomaya M.V., Goncharova E.V., Scherback L.N., Dushenkina T.E., Gugunov D.V., Mudunov A.M., Gurtsevitch V.E. Epstein–Barr virus in the population of two geographically different regions of Russia // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2017, vol. 7, no. 1, pp. 41–50. doi: 10.15789/2220-7619-2017-1-41-50

LMP1, специфически ассоциированный с РНГ^{ВЭБ}, выявлен не был. Проведенное исследование впервые выявило генетическую разнородность штаммов ВЭБ, циркулирующих среди населения различных географических регионов страны, и наличие корреляции между уровнями гуморального ответа к ВЭБ и заболеваемостью опухолями носоглотки, включая РНГ^{ВЭБ}.

Ключевые слова: вирус Эпштейна–Барр, гуморальный ответ, рак носоглотки, онкоген LMP1.

EPSTEIN–BARR VIRUS IN THE POPULATION OF TWO GEOGRAPHICALLY DIFFERENT REGIONS OF RUSSIA

Senyuta N.B., Ignatova A.V., Lomaya M.V., Goncharova E.V., Scherback L.N., Dushenkina T.E., Gugunov D.V., Mudunov A.M., Gurtsevitch V.E.

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health, Moscow, Russian Federation

Abstract. It is well known that the Epstein–Barr virus (EBV) being widely spread in the human population is also the etiologic agent for a number of malignancies. A notable feature of tumors associated with EBV is their different incidence in various geographical regions, that, as suggested, related with mutational events in multiple loci of the EBV genome and its oncogene, the latent membrane protein 1 (LMP1), associated with the transforming potential of the virus. Given the multi-ethnic composition of Russian population and the diversity of geographical areas and conditions of their residence, it was relevant to examine the representatives of different geographical regions for the nature of their relationship with EBV. To solve this task the antibody response to locally circulating EBV strains, determined by indirect immunofluorescence, was studied in residents of the Central, North Caucasus and Far Eastern Federal Districts, represented by healthy individuals and patients with various head and neck tumors. The levels of antibody titers obtained were compared with the incidence rates of nasopharyngeal tumors (NPT) in population of above Districts. In order to determine possible structural modifications in LMP1 gene of EBV strains persisting in selected geographic regions, samples of the gene have been amplified from a biological material collected by “nested” PCR and sequenced. The results obtained have shown that levels of antibody response to EBV among representatives of the regions included in the study vary significantly. It was found that in residents of the Dagestan and the Chechen Republics, the inhabitants of the North Caucasus Federal District, the correlation between enhanced humoral response to EBV and increased incidence of NPT was detected. Since among NPT the EBV-associated form of nasopharyngeal carcinoma (NPC^{EBV}) is dominated, the findings allow us to suggest that the population of these Republics have genetic predisposition to increased EBV replication and, consequently, an elevated incidence of NPC^{EBV}. The study also showed that representatives of the regions tested are infected with EBV strains, LMP1 variants of which such as B95.8, China 1, Med+, Med– and NC, are known in the literature. However, LMP1 variant, specifically associated with NPC^{EBV}, has not been identified. This study showed for the first time the genetic heterogeneity of EBV strains circulating among population of different geographical regions of the country, and the existence of correlation between antibody response to EBV and the incidence of nasopharyngeal tumors, including NPC^{EBV}.

Key words: Epstein–Barr virus, antibody response, nasopharyngeal cancer, LMP1 oncogene.

Введение

Известно, что вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ) латентно инфицировано примерно 95% населения планеты, и в то же время он причастен к возникновению целого ряда злокачественных новообразований человека лимфоидного и эпителиального происхождения. К их числу относят лимфому Беркитта, рак носоглотки, определенные гистологические варианты лимфомы Ходжкина и рака желудка, назальные НК/Т-клеточные лимфомы, лейомиосаркому, многочисленные лимфомы, возникающие на фоне иммунодефицитного состояния и др.

Важно отметить, что в инфицированном организме вирус, как правило, избегает своего распознавания иммунной системой. Это про-

исходит, прежде всего, благодаря экспрессии в В-лимфоцитах памяти (место персистенции вируса) ограниченного числа вирусных генов, нарушению механизма экспрессии вирусных антигенов на поверхности В-лимфоцитов, а также повреждению иммунного ответа на инфицированные вирусом клетки [17]. Примечательной особенностью ассоциированных с ВЭБ злокачественных новообразований является их отличающийся уровень заболеваемости в различных географических регионах, подразделяемых на эндемичные, не эндемичные и регионы с промежуточным уровнем заболеваемости [21]. Причины наблюдаемого феномена до сих пор мало изучены. Среди возможных факторов, влияющих на частоту заболеваний, рассматривают вредные факторы окружающей среды, HLA-генотип хозяина, а также струк-

турные особенности и биологические свойства штаммов ВЭБ. Исследования показали, что существует два генотипа вируса, ВЭБ-1 и ВЭБ-2, встречающиеся в различных географических регионах с неодинаковой частотой [4]. Их основное фенотипическое различие состоит в том, что ВЭБ-1 трансформирует В-лимфоциты человека в лимфобластоидную клеточную линию более эффективно, то есть обладает более выраженным трансформирующим потенциалом по сравнению с ВЭБ-2 [4]. Дальнейшее изучение изменчивости вирусных изолятов привело к идентификации полиморфизма в BamHI-F области генома ВЭБ [13]. В отличие от прототипного штамма вируса B95.8 («F-тип»), обнаружен штамм ВЭБ, содержащий в этой же области генома дополнительный сайт рестрикции BamHI («f» вариант). Указанный штамм доминировал у больных раком носоглотки (РНГ) из южных провинций Китая, но обнаруживался крайне редко в клетках спонтанных лимфобластоидных линий, выделенных от здоровых южно-китайских и или североамериканских доноров [12].

При изучении сиквенсов изолятов ВЭБ различного географического и этнического происхождения обнаружены существенные вариации в многочисленных локусах вирусного генома, влияющих на трансформирующий потенциал вируса. В частности, неодинаковый онкогенный потенциал ВЭБ в различных географических регионах может быть связан с полиморфизмом основного онкогена ВЭБ, латентного мембранного белка 1 (LMP1). Онкобелок, кодируемый известным в литературе вариантом LMP1 «Сао», LMP1-Сао, в отличие от его прототипного варианта LMP1-B95.8, содержит характерную делецию 10 аминокислот (30 п.н.) и дополнительно 26 аминокислотных замен [1]. Доказано, что функционально LMP1-Сао по сравнению с LMP1-B95.8 обладает более выраженным трансформирующим потенциалом *in vitro* [19], а также повышенной туморогенностью, сниженной иммуногенностью и усиленной сигнальной активностью [1, 15, 22]. Показано также, что нуклеотидные замены в генах, кодирующих различные варианты LMP1, как правило, расположены в областях, контролирующей стадии транскрипции или трансляции. В составе белка — это аминокислоты, которые влияют на функциональную активность, иммуногенность, время полужизни или трансформирующий потенциал LMP1 [15, 22]. Активация LMP1 целого ряда транскрипционных факторов (NF-κB, AP-1, STAT) изменяет профиль внутриклеточной активности ряда сигнальных путей [20]. В частности, этот онкобелок подавляет (как правило, опосредовано) экспрессию ряда ключевых опухолевых супрессоров (p53,

RASSF1A), нарушает работу проверочных точек клеточного цикла G1-S, обеспечивая выживание поврежденных клеток [5, 14]. LMP1 индуцирует также экспрессию провоспалительных цитокинов, наделяет инфицированные клетки резистентностью к апоптозу, вызывает эпителиально-мезенхимальный переход (EMT), усиливает подвижность клеток, их инвазию и метастазирование, селективно подавляет либо активирует экспрессию ряда клеточных микро-РНК и т.д. [9, 23]. Под влиянием LMP1 вирусных изолятов различного клинического и географического происхождения уровни активации транскрипционных факторов и, соответственно, каскады сигнальных путей, могут быть существенно модифицированы [18].

Многочисленными работами также доказано, что возникновение ряда ассоциированных с ВЭБ новообразований сопровождается повышенными титрами гуморальных антител к ВЭБ, которые поднимаются до высоких уровней еще в доклинической фазе болезни. При этом, обнаружение антител, относящихся, в частности, к глобулину класса А (IgA) против капсидного антигена ВЭБ (ВКА), широко используется для скрининга РНГ в эндемичных по этому заболеванию южных провинциях Китая, Гонконга, Сингапура и Малайзии [18].

Как известно, Россия — многонациональное государство с обширной территорией, расположенной в различных географических и климатических зонах. Населяющие страну многочисленные этносы, отличаются генетически, условиями быта и факторами воздействия окружающей среды. Учитывая вышесказанное, объектом нашего изучения стали представители Центрального (ЦФО) и Северо-Кавказского (СКФО) федеральных округов — регионов, отличающихся по географическому расположению, климатическим условиям и этническому составу населения. Цель исследования состояла в изучении у представителей этих регионов, уровней серологического ответа к ВЭБ, поиске зависимости между показателями иммунного ответа к вирусу и заболеваемостью опухолями носоглотки, включая опухоли, ассоциированные с ВЭБ, а также в анализе вариантов онкогена LMP1 в штаммах вируса, циркулирующих в изучаемых популяциях.

Материалы и методы

Исследуемый материал. Объектом для изучения стали образцы крови и/или смыва ротоглотки от здоровых лиц/доноров крови и больных ВЭБ-ассоциированными формами РНГ (РНГ^{ВЭБ}) и другими опухолями головы и шеи (ДОГШ), не ассоциированными с этим вирусом. В исследовании участвовали представите-

ли Москвы и Московской области, а также других областей Центрального федерального округа (ЦФО) России. Вторую группу составили представители Северо-Кавказского федерального округа (СКФО) — жители республик Дагестан и Чечня. Забор биологического материала от больных и здоровых лиц осуществлялся с их согласия и был одобрен Комитетом по этике при ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина МЗ РФ.

Экстракция ДНК и амплификация гена LMP1. Из собранного биологического материала ДНК выделяли методом фенол-хлороформной депротенинизации. Наличие и концентрацию ДНК в выделенных образцах анализировали методом ПЦР в реальном времени, описанном нами ранее [19]. Амплификацию LMP1 проводили в два этапа с внешними и внутренними праймерами по принятой нами методике [6, 8]. Каждый ПЦР-продукт очищали на мини-колонке “QIAGEN” согласно инструкции производителя. На реакцию брали примерно 100–200 нг ПЦР-продукта, а концентрацию ДНК оценивали визуально в агарозном геле. В качестве положительного контроля использовали 1 мкг ДНК, выделенной из используемой в качестве стандарта клеточной линии В95.8, а в качестве отрицательного контроля — воду.

Секвенирование ПЦР-продуктов LMP1. Ампликоны LMP1 секвенировали в обоих направлениях. Секвенирование проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3100-Avant. Обработку данных секвенирования проводили с помощью программ Chromas 230 и Vector NTI.

Классификация LMP1. Нуклеотидные последовательности изолятов LMP1, амплифицированные из изучаемых образцов крови/смыслов ротоглотки и транслированные в аминокислотные последовательности, подверглись классификации на основании обнаруживаемых в этих последовательностях точковых мутаций, ведущих к заменам отдельных аминокислот, формированию делеций и дупликаций. При этом за основу была принята известная в литературе классификация Edwards et al. [3], сформированная на базе сиквенсного анализа транслированных последовательностей гена LMP1, полученных от больных ВЭБ-ассоциированной патологией и здоровых вирусоносителей из различных географических регионов мира. В классификации Edwards et al. обозначение вариантов LMP1 отражало их географическое происхождение: Alaskan (Ala), China 1 (Ch1), China 2 (Ch2), China 3 (Ch3), Mediterranean+ (Med+), Mediterranean– (Med–) и North Carolina (NC). Важно отметить, что вариант China1 является аналогом высоко опухоленного варианта LMP1-Сао.

Серологический тест на антитела к ВЭБ. Количественное определение титров IgG- и IgA-антител к капсидному антигену ВЭБ (ВЭБ/ВКА) осуществляли непрямой методом иммунофлуоресценции, используя конъюгированные FITC козы антитела против IgG и IgA человека (Jackson Immune Research Laboratories, Inc.). Для тестирования сывороток/плазмы крови на наличие ВЭБ-специфических антител использовали клеточную линию P3HR1, продуцирующую вирус и синтезирующую его капсидный антиген (ВКА), и не продуцирующую вирус клеточную линию Raji, синтезирующую после обработки индукторами ранний антиген (РА) вируса. Для усиления экспрессии вирусных антигенов, клеточную линию Raji, обрабатывали ТРА (12-О-тетрадеcanoил-форбол-13-ацетат) в концентрации 20 нг/мл в сочетании с бутиратом натрия в дозе 3 мкМ/мл в течение 3–5 дней, а клеточную линию P3HR1 обрабатывали одним ТРА в течение 3–6 дней в той же дозе. Клеточные линии культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% эмбриональной сыворотки Gibco, при 37°C и 5% CO₂. Приготовленные таким образом пулы клеток наносили на предметные стекла, фиксировали их и использовали в качестве антигена. При определении титров антител применяли 2-кратные разведения сывороток/плазмы крови. Серологический ответ для каждой группы изучаемых лиц оценивали по среднему геометрическому значению (СГЗ) титров антител.

Статистический анализ. Точный тест Фишера был использован для сравнения достоверности различий между процентным содержанием вариантов LMP1 в биологических образцах сравниваемых групп. Значения p менее 0,05 ($p < 0,05$) указывало на наличие существенных различий.

Результаты

Гуморальный ответ к вирусу Эпштейна–Барр у больных РНГ, ДОГШ и у здоровых лиц — представителей различных регионов России

Проведенные исследования показали, что наиболее низкий уровень иммунореактивности к антигенам ВЭБ был зарегистрирован у здоровых лиц — московских доноров крови (табл. 1). В двух группах больных ДОГШ из Москвы и Московской области и СКФО СГЗ титров антител к тестируемым антигенам ВЭБ также были невысокими, что закономерно для опухолей, не ассоциированных с вирусом; их показатели были одного порядка и различия между ними были статистически недостоверными ($p > 0,05$). У больных РНГ^{ВЭБ} из Москвы и Московской области показатель СГЗ титров IgG-антител к ВКА был в 15,9 раз выше, чем у доноров крови и практически в 2 раза выше, чем у больных той же формой опухоли из других

Таблица 1. Гуморальный ответ к вирусу Эпштейна–Барр у больных РНГ*, ДОГШ и у здоровых лиц, представителей двух географически удаленных регионов России**

Table 1. Antibody response to Epstein–Barr virus in patients with NPC*, OHNT** and in blood donors, representatives of two geographical remote regions of Russia

Группы Groups	Геометрические значения титров антител Geometric mean antibody titers				
	Число случаев Number of cases	IgG		IgA	
		ВКА VCA	РА EA	ВКА VCA	РА EA
Доноры крови, Москва Moscow blood donors	25	22,1	10,0	1	1
Больные раком носоглотки Nasopharyngeal carcinoma patients					
ЦФО-Москва/CFD-Moscow	10	3,4	139,2	85,7	48,2
ЦФО-МиМО/CFD-M&MR	15	351,0	127,0	66,5	45,3
ЦФО-ДО/CFD-OR	10	179,7	43,9	44,9	33,3
СКФО/NCFD	28	641,0	168,1	136,7	90,4
Больные другими опухолями головы и шеи Other head and neck tumor patients					
ЦФО-МиМО/CFD-M&MR	25	47,3	1,9	1,4	1,1
СКФО/NCFD	11	60,9	3,4	1,5	1,3

Примечания. *РНГ — рак носоглотки; **ДОГШ — другие опухоли головы и шеи; ВКА, РА — вирусный капсидный и ранний антигены вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ); ЦФО-Москва — Москва, Центральный федеральный округ; ЦФО-МиМО — Москва и Московская область, Центральный федеральный округ; ЦФО-ДО — другие области, Центральный федеральный округ; СКФО — Северо-Кавказский федеральный округ.

Notes. *NPC — nasopharyngeal carcinoma; **OHNT — other head and neck tumors; VCA, EA — viral capsid and early antigens of the Epstein–Barr virus (EBV); CFD-Moscow — Moscow, Central Federal District; CFD-M&MR — Moscow and Moscow regions, Central Federal District; CFD-OR — other regions, Central Federal District; NCFD — North Caucasian Federal District.

областей ЦФО (351,0 и 179,7 соответственно). СГЗ титров IgG-антител к РА в двух указанных группах больных РНГ^{ВЭБ} отличались еще больше, почти в 3 раза (127,0 и 43,9 соответственно), хотя для титров IgA-антител и к ВКА (66,5 и 44,9 соответственно), и РА (45,3 и 33,3 соответственно) различия между показателями СГЗ титров были небольшими и статистически недостоверными ($p > 0,05$).

Средние геометрические значения титров антител к вирусу Эпштейна–Барр у представителей ЦФО, Москвы и СКФО

Проведенные исследования показали, что гуморальные ответы к ВЭБ у больных РНГ^{ВЭБ} из других областей ЦФО и СКФО существенно отличаются (рис. 1). СГЗ титров IgG-антител к ВКА и РА в этих группах больных отличались в 3,7 и 3,8 раз (179,7 и 641,0; 43,9 и 168,1 соответственно), а СГЗ титров IgA-антител к тем же антигенам — в 3,0 и 2,7 раза (44,9 и 136,7; 33,3 и 90,4 соответственно) при статистически значимых различиях показателей между соответствующими группами ($p < 0,05$). Серологический ответ к ВЭБ у больных РНГ^{ВЭБ} из Москвы и Московской области, также был существенно слабее, чем у тех же больных из СКФО, однако статистические значимые различия выявлены только для IgA-антител к ВКА и РА.

Сравнительный анализ активности гуморального ответа к вирусу Эпштейна–Барр у больных РНГ и показателей заболеваемости опухолями носоглотки у населения ЦФО и СКФО

На основании полученных данных можно было предположить, что более активная репликация ВЭБ, и как следствие, усиленный гуморальный ответ к вирусу, отражают и более высокую предрасположенность к возникновению РНГ^{ВЭБ}. Результаты сопоставления у больных РНГ^{ВЭБ} и заболеваемости опухолями носоглотки (ОНГ) у населения ЦФО и СКФО, указывают на такую возможность (рис. 2А, Б). Из рисунка 2А видно, что для больных РНГ^{ВЭБ} из СКФО характерны более высокие и статистически достоверно отличающиеся СГЗ титров антител к каждому из тестируемых антигенов вируса, чем таковые для больных РНГ^{ВЭБ} из ЦФО, за исключением Москвы и Московской области ($p < 0,5$). Более высокие показатели гуморального ответа к ВЭБ у больных РНГ^{ВЭБ} из СКФО сопровождаются и более высокими показателями заболеваемости населения этого округа опухолями носоглотки (ОНГ) (рис. 2Б). Действительно, заболеваемость ОНГ у населения СКФО, общая, и раздельная у мужчин и женщин, была статистически достоверно выше соответствующих показателей заболеваемости этой же локализацией опухоли у населения ЦФО ($p < 0,05$).

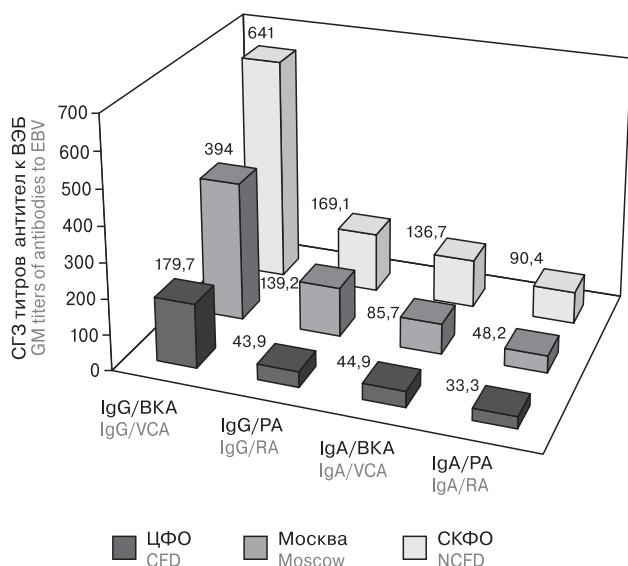


Рисунок 1. Средние геометрические значения титров антител к антигенам вируса Эпштейна–Барр у представителей Центрального федерального округа (ЦФО), Москвы и Северо-Кавказского федерального округа (СКФО)

Figure 1. Geometric mean antibody titers to Epstein–Barr virus antigens in representatives of the Central Federal District (CFD), Moscow City and the North Caucasus Federal District (NCFD)

Примечания. IgG/BKA и IgG/PA — титры антител иммуноглобулина класса G к вирусным капсидному (BKA) и раннему (PA) антигенам вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ); IgA/BKA и IgA/PA — титры антител иммуноглобулина класса A к вирусным капсидному (BKA) и раннему (PA) антигенам ВЭБ; цифры обозначают средние геометрические значения (СГЗ) титров антител.

Notes. IgG/VCA and IgG/RA — antibody titers of immunoglobulin class G to viral capsid (VCA) and early antigens (RA) of Epstein–Barr virus (EBV); IgA/VCA and IgA/RA — immunoglobulin class A antibody titers to viral capsid (VCA) and early (EA) EBV antigens; numbers indicate the geometric mean antibody (GMA) titers.

Показатели заболеваемости опухолями носоглотки в ЦФО и республиках Чечня и Дагестан

Поскольку в состав СКФО входят Дагестан и Чечня, представлялось важным сравнить заболеваемость ОНГ у населения каждой из этих республик с заболеваемостью той же формой опухоли у населения Москвы. Проведенный анализ показал (рис. 3), что уровни заболеваемости ОНГ в обеих республиках примерно в 2–3 раза превышают соответствующий показатель по Москве, что еще раз подтверждает наличие связи между усиленным гуморальным ответом к ВЭБ и увеличенной заболеваемостью ОНГ, среди которых доминируют ВЭБ-ассоциированные формы (РНГ^{ВЭБ}).

Полиморфизм онкогена LMP1 у больных РНГ, ДОГШ и у здоровых лиц — представителей разных географических регионов

Структурный анализ нуклеотидных и предсказанных аминокислотных (а.к.) последовательностей ампликонов гена LMP1, полученных из биологического материала больных РНГ^{ВЭБ}, ДОГШ и здоровых лиц, позволил обнаружить у них широкий спектр вариантов белка LMP1 (табл. 2). При этом у больных разного географического происхождения частота выявления таких вариантов, как LMP1, B95.8, China1, Med+, Med– и NC существенно варьировала. Низкодивергентный вариант, обладающий и низкой трансформирующей активностью, B95.8/A, наиболее часто встречался у доноров г. Москвы (80%, 12/15). Частота выявления низкодивергентного варианта B95.8/A у больных РНГ^{ВЭБ} и ДОГШ из Москвы и Московской области, существенно различалась: она была невысокой у больных РНГ^{ВЭБ} (9,1%, 1/11) и несколько повышенной у больных ДОГШ (29,4%, 5/17), что представляется логичным. В этих группах больных существенно различались и показатели сумм вариантов China1 и Med+, обладающих делецией 10 а.к. и более высокой трансформирующей активностью. У больных РНГ^{ВЭБ} их суммарное значение было примерно в 2 раза выше, чем у больных ДОГШ (54,6%, 6/11 и 23,6%, 4/17 соответственно).

Еще более высокая сумма высокоонкогенных вариантов LMP1 оказалась у больных РНГ^{ВЭБ} из других областей ЦФО (66%, 6/9). Эти наблюдения позволяют предположить, что штаммы ВЭБ с трансформирующими вариантами LMP1 причастны к ВЭБ-ассоциированному канцерогенезу и возникновению РНГ^{ВЭБ}. Интересно отметить, что у больных РНГ^{ВЭБ} из других областей ЦФО и СКФО общее содержание высоко трансформирующих вариантов LMP1 также преобладало (66,6%, 6/9 и 58,4%, 14/24 соответственно) над содержанием в этих же группах низко трансформирующего варианта B95.8/A (22,2%, 2/9 и 12,5%, 3/24 соответственно; $p < 0,05$). Представляется интересным тот факт, что у больных ДОГШ из СКФО указанные трансформирующие варианты LMP1 встречались гораздо чаще, чем у больных ДОГШ из Москвы и Московской области (50,0%, 3/6 и 23,5%, 4/17 соответственно). Полученные данные указывают на более широкое распространение среди населения СКФО штаммов вируса с высоко трансформирующими вариантами онкогена LMP1. Данное наблюдение находится в соответствии с показателями повышенной заболеваемости ОНГ у населения СКФО по сравнению с населением ЦФО (см. рис. 2Б). Действительно, показатели заболеваемости ОНГ у мужчин, женщин и общий у представителей СКФО превышали более чем в 2 раза

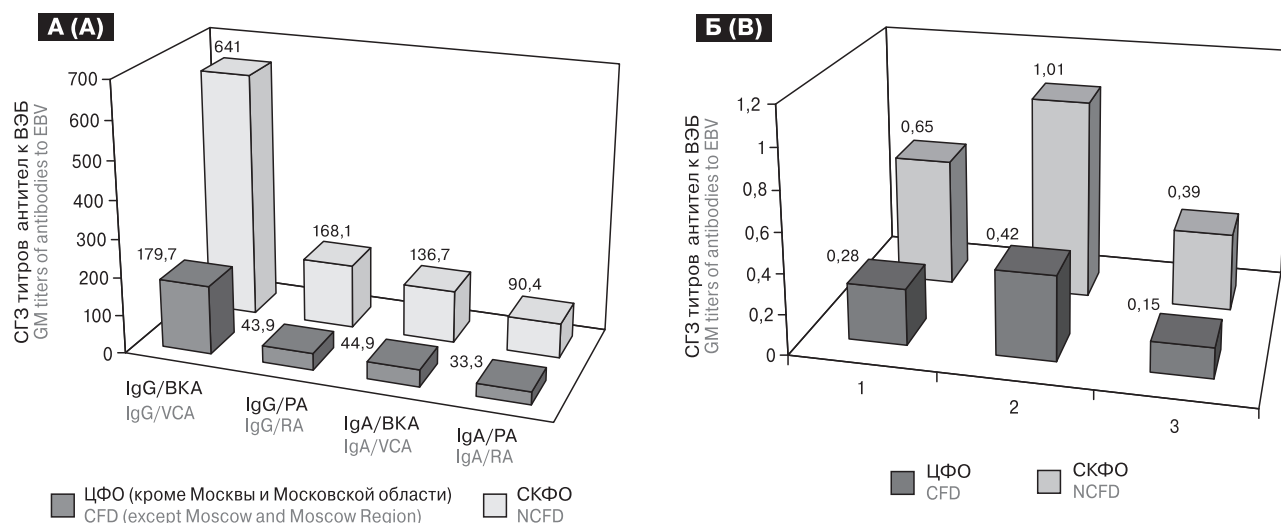


Рисунок 2. Сравнительный анализ активности гуморального ответа к вирусу Эпштейна–Барр у больных раком носоглотки (РНГ) и показателей заболеваемости опухолями носоглотки (ОНГ) у населения удаленных регионов страны

Figure 2. A comparative analysis of the activity of the humoral response to the Epstein–Barr virus in patients with nasopharyngeal carcinoma (NPC) and incidence of the nasopharyngeal tumor (NPT) rates in the population of two regions of the country

А. Титры IgG- и IgA-антител к вирусным капсидному и раннему (ВКА и РА) антигенам вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ) у больных раком носоглотки (РНГ), представителей Центрального (ЦФО) и Северо-Кавказского федеральных округов (СКФО).

А. IgG and IgA antibodies titers to viral capsid and early antigens (VCA and RA) of Epstein–Barr virus (EBV) in patients with nasopharyngeal carcinoma (NPC), representatives of the Central (CFD) and the North Caucasus Federal Districts (NCFD).

Б. Показатели заболеваемости опухолями носоглотки (ОНГ) на 100 тыс. населения в Центральном (ЦФО) и Северо-Кавказском (СКФО) федеральных округах [Сб. Злокачественные новообразования в России в 2015 г. (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. Москва, 2016].

В. Incidences of the nasopharyngeal tumor (NPT) rates per 100 000 population in the Central (CFD) and the North Caucasus (NCFD) Federal Districts [In: Malignancies in Russia in 2015 (morbidity and mortality). Eds. A.D. Caprin, V.V. Starinsky, G.V. Petrova. Moscow, 2016].

таковые у населения ЦФО ($p < 0,001$). Другой вариант LMP1, Med⁻, аналог варианта Med⁺, не обладающий делецией 10 а.к., чаще всего обнаруживали у больных ДОГШ из Москвы и Московской области и СКФО (29,4%, 5/17 и 33,3%, 2/6); соответственно). Вариант NC у больных РНГ из других областей ЦФО и ДОГШ из СКФО, был также обнаружен в остальных группах. У больных РНГ из Москвы и Московской области и СКФО частота его выявления составила 9,1% (1/11) и 12,5% (3/24) соответственно, а у московских доноров крови (13,3%, 2/15). Интересно отметить, что такие описанные в литературе варианты LMP1, как China2, China3 и Alaska, ни в одной изученной нами популяции обнаружены не были.

Обсуждение

Более высокие титры IgG-антител к ВКА и РА вируса у больных РНГ^{ВЭБ} из Москвы и Московской области, чем у больных той же формой опухоли из других областей ЦФО, ве-

роятно, обусловлены рядом факторов. Один из них — возможность многократного инфицирования ВЭБ лиц, проживающих в московском мегаполисе за счет тесных бытовых контактов в результате высокой концентрации населения. Нельзя также исключить, что на усиленную репликацию вируса у этих лиц влияет высокий ритм жизни и деловой активности, провоцирующие частые стрессовые ситуации и угнетение иммунной системы и т.д. Высказанное предположение подтверждается более высокой иммунореактивностью к ВЭБ у больных РНГ^{ВЭБ} из Москвы, чем из Москвы и Московской области и других областей, относящихся к ЦФО (табл. 2). Однако, окончательно объяснить наблюдаемый феномен позволит только тестирование здоровых лиц из сравниваемых регионов.

С другой стороны, можно предположить, что более выраженные гуморальные ответы к ВЭБ у больных РНГ^{ВЭБ} из СКФО, чем из других областей ЦФО, объясняются генетическими особенностями двух популяций, в частности, разной

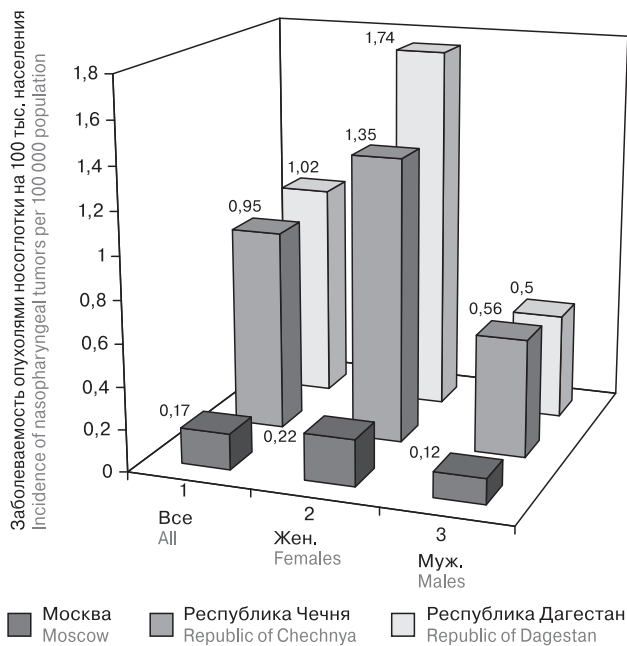


Рисунок 3. Сравнение показателей заболеваемости опухолями носоглотки (ОНГ) у населения Центрального федерального округа (ЦФО) и республик Дагестан и Чечня

Figure 3. Comparison of the nasopharyngeal tumor (NPT) incidences in the population of the Central Federal District (CFD) and the Republics of Dagestan and Chechnya

реактивностью их иммунной системы на ВЭБ, обусловленной отличающимися географическими и климатическими условиями проживания в этих регионах, особенностями быта, питания, воздействиями вредных факторов внешней среды и т.д. Высказанное предположение подтверждается рядом работ, обнаруживших отличающиеся уровни иммунного ответа к ВЭБ у больных РНГ^{ВЭБ} из разных стран и этнических групп [2]. Наши собственные исследования также позволили выявить различные уровни серологического ответа к ВЭБ у больных РНГ двух стран — России и Кубы [7].

Данные проведенного исследования также показали, что представители изученных географических регионов России инфицированы широким спектром штаммов ВЭБ, о чем свидетельствует полиморфизм LMP1 ампликонов, полученных из тестируемого нами биологического материала. При этом вариант LMP1, специфически ассоциированный с РНГ^{ВЭБ}, доминирующей формой опухолей носоглотки, нами не обнаружен. Это наблюдение позволяет прийти к выводу о том, что при наличии необходимых условий любой штамм ВЭБ с любым вариантом LMP1 может проявить свой онкогенный потенциал и стать этиологическим агентом РНГ^{ВЭБ}. Однако заражение штаммами ВЭБ с высокотрансформирующими варианта-

Таблица 2. Варианты LMP1 у больных РНГ*, ДОГШ и доноров крови — представителей географически удаленных регионов России**

Table 2. LMP1 variants in patients with NPC, OHNT and blood donors, representatives of geographically remote regions of Russia

Число обследованных лиц/ число ампликонов LMP1 The number of examined persons/ the number of LMP1 amplicons	Варианты LMP1*** LMP1 variants				
	B98.5/A**** (%)	China1 (%)	Med+ (%)	Med- (%)	NC (%)
Здоровые лица/Healthy individuals					
Московские доноры крови, Центральный федеральный округ/Moscow blood donors, Central Federal District					
15/15	12 (80,0)	1 (6,7)	–	–	2 (13,3)
Больные раком носоглотки/Nasopharyngeal carcinoma patients					
Москва и Московская область, Центральный федеральный округ/Moscow and Moscow region, Central Federal District					
15/11	1 (9,1)	2 (18,2)	4 (36,4)	3 (27,3)	1 (9,1)
Другие области, Центральный федеральный округ/Other regions of the Central Federal District					
10/9	2 (22,2)	4 (44,4)	2 (22,2)	1 (11,1)	–
Северо-Кавказский федеральный округ/The North Caucasian Federal District					
28/24	3 (12,5)	4 (16,7)	10 (41,7)	4 (16,7)	3 (12,5)
Больные другими опухолями головы и шеи/Patients with other head and neck tumors					
Москва и Московская область, Центральный федеральный округ/Moscow and Moscow region, Central Federal District					
25/17	5 (29,4)	2 (11,8)	2 (11,8)	5 (29,4)	3 (17,6)
Северо-Кавказский федеральный округ/The North Caucasian Federal District					
11/6	1 (16,6)	1 (16,6)	2 (33,3)	2 (33,3)	–

Примечания. *РНГ — рак носоглотки; **ДОГШ — другие опухоли головы и шеи; ***LMP1 — латентный мембранный белок 1, кодируемый онкогеном LMP1 вируса Эпштейна–Барр; **** варианты LMP1 (B98.5/A и др.);
Notes. *NPC — nasopharyngeal carcinoma; **OHNT — other head and neck tumors; ***LMP1 — latent membrane protein 1, encoded by LMP1 oncogene of the Epstein–Barr virus; ****LMP1 variants (B98.5/A and others).

ми онкогена LMP1, по-видимому, создает у инфицированных лиц более реальную предпосылку для инициации ВЭБ-ассоциированного канцерогенеза и возникновения РНГ^{ВЭБ}. Подтверждением сказанному является ситуация в эндемичных по РНГ^{ВЭБ} южных провинциях Китая, где высокая заболеваемость РНГ сочетается с широким инфицированием населения ВЭБ, содержащим высокотрансформирующий вариант LMP1-Сао [4, 12].

Важным результатом проведенных исследований стала также впервые обнаруженная корреляция между усиленным гуморальным ответом к ВЭБ и повышенной заболеваемостью ОНГ, наблюдаемая у представителей СКФО. Полученные данные могут свидетельствовать в пользу генетической предрасположенности

населения СКФО к активной пролиферации вируса, стимулирующей канцерогенез и связанной с этим процессом повышенной заболеваемости РНГ^{ВЭБ}. Высказанное предположение, однако, нуждается в подтверждении наличия у жителей СКФО определенных вариантов HLA-гаплотипа, сочетающихся с предрасположенностью к РНГ^{ВЭБ}.

Благодарность

Авторы статьи выражают благодарность Министерству Здравоохранения России за дополнительное финансирование, а ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина — за предоставленные условия, необходимые для выполнения этого исследования.

Список литературы/References

1. Blake S.M., Eliopoulos A.G., Dawson C.W., Young L.S. The transmembrane domains of the EBV-encoded latent membrane protein 1 (LMP1) variant CAO regulate enhanced signalling activity. *Virology*, 2001, vol. 282, no. 2, pp. 278–287. doi: 10.1006/viro.2001.0828
2. De-The G., Lavoue M.F., Muenz L. Differences in EBV antibody titres of patients with nasopharyngeal carcinoma originating from high, intermediate and low incidence. *IARC Sci. Publ.* 1978, vol. 20, pp. 471–481.
3. Edwards R.H., Seillier-Moisewitsch F., Raab-Traub N. Signature amino acid changes in latent membrane protein 1 distinguish Epstein–Barr virus strains. *Virology*, 1999, vol. 261, no. 1, pp. 79–95. doi: 10.1006/viro.1999.9855
4. Gratama J.W., Ernberg I. Molecular epidemiology of Epstein–Barr virus infection. *Adv. Cancer Res.*, 1995, vol. 67, pp. 197–255.
5. Guo L., Tang M., Yang L., Xiao L., Bode A.M., Li L., Dong Z., Cao Y. Epstein–Barr virus oncoprotein LMP1 mediates survivin upregulation by p53 contributing to G1/S cell cycle progression in nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Mol. Med.*, 2012, vol. 29, no. 4, pp. 574–580. doi: 10.3892/ijmm.2012.889
6. Gurtsevitch V.E., Iakovleva L.S., Shcherbak L.N. Goncharova E.V., Smirnova K.V., Diduk S.V., Kondratova V.N., Maksimovich D.M., Lichtenstein A.V., Senyuta N.B. The LMP1 oncogene sequence variations in patients with oral tumours associated or not associated with the Epstein–Barr virus. *Mol. Biol. (Mosk.)*, 2013, vol. 47, no. 6, pp. 987–995.
7. Gurtsevitch V., Ruiz R., Stepina V., Plachov I., Le Riverend E., Glazkova T., Lavoué M.F., Paches A., Aliev B., Mazurenko N. 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, vol. 37, no. 3, pp. 375–381.
8. Hahn P., Novikova E., Scherback L., Janik C., Pavlish O., Arkhipov V., Nicholls J., Müller-Lantzsch N., Gurtsevitch V., Grässer F.A. The LMP1 gene isolated from Russian nasopharyngeal carcinoma has no 30-bp deletion. *Int. J. Cancer*, 2001, vol. 91, no. 6, pp. 815–821.
9. Horikawa T., Yoshizaki T., Kondo S., Furukawa M., Kaizaki Y., Pagano J.S. Epstein–Barr virus latent membrane protein 1 induces Snail and epithelial-mesenchymal transition in metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Br. J. Cancer*, 2011, vol. 104, no. 7, pp. 1160–1167. doi: 10.1038/bjc.2011.38
10. Ji M.F., Yu Y.L., Cheng W.M., Zong Y.S., Ng P.S., Chua D.T., Ng M.H. Detection of stage I nasopharyngeal carcinoma by serologic screening and clinical examination. *Chin J. Cancer*, 2011, vol. 30, no. 2, pp. 120–123.
11. Johnson R.J., Stack M., Hazlewood S.A., Jones M., Blackmore C.G., Hu L.F., Rowe M. The 30-base-pair deletion in Chinese variants of the Epstein–Barr virus LMP1 gene is not the major effector of functional differences between variant LMP1 genes in human lymphocytes. *J. Virol.*, 1998, vol. 72, no. 5, pp. 4038–4048.
12. Lung M.L., Chang G.C. Detection of distinct Epstein–Barr virus genotypes in NPC biopsies from southern Chinese and Caucasians. *Int. J. Cancer*, 1992, vol. 52, no. 1, pp. 34–37.
13. Lung M.L., Lam W.P., Sham J., Choy D., Yong Sheng Z., Guo H.Y., Ng M.H. Detection and prevalence of the «f» variant of Epstein–Barr virus in southern China. *Virology*, 1991, vol. 185, no. 1, pp. 67–71.
14. Man C., Rosa J., Lee L.T., Lee V.H., Chow B.K., Lo K.W., Doxsey S., Wu Z.G., Kwong Y.L., Jin D.Y., Cheung A.L., Tsao S.W. Latent membrane protein 1 suppresses RASSF1A expression, disrupts microtubule structures and induces chromosomal aberrations in human epithelial cells. *Oncogene*, 2007, vol. 26, no. 21, pp. 3069–3080. doi: 10.1038/sj.onc.1210106
15. Nitta T., Chiba A., Yamamoto N., Yamaoka S. Lack of cytotoxic property in a variant of Epstein–Barr virus latent membrane protein-1 isolated from nasopharyngeal carcinoma. *Cell Signal*, 2004, vol. 16, no. 9, pp. 1071–1081. doi:10.1016/j.cellsig.2004.03.001
16. 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, vol. 61, no. 5, pp. 1310–1317.
17. Tierney R.J., Steven N., Young L.S., Rickinson A.B. Epstein–Barr virus latency in blood mononuclear cells: analysis of viral gene transcription during primary infection and in the carrier state. *J. Virol.*, 1994, vol. 68, no. 11, pp. 7374–7385.
18. Tzellos S., Farrell P.J. Epstein–Barr virus sequence variation-biology and disease. *Pathogens*, 2012, vol. 1, no. 2, pp. 156–174. doi: 10.3390/pathogens1020156

19. Wang D., Liebowitz D., Kieff E. An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell*, 1985, vol. 43, no. 3, pp. 831–840.
20. Young L.S., Dawson C.W., Eliopoulos A.G. The expression and function of Epstein–Barr virus encoded latent genes. *Mol. Pathol.*, 2000, vol. 53, no. 5, pp. 238–247.
21. Yu M.C., Yuan J.M. Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Semin. Cancer Biol.* 2002, vol. 12, no. 6, pp. 421–429.
22. Zhou X.G., Sandvej K., Li P.J., Ji X.L., Yan Q.H., Zhang X.P., Da J.P., Hamilton-Dutoit S.J. Epstein–Barr virus gene polymorphisms in Chinese Hodgkin’s disease cases and healthy donors: identification of three distinct virus variants. *J. Gen. Virol.*, 2001, vol. 82, no. 5, pp. 1157–1167. doi: 10.1099/0022-1317-82-5-1157
23. Zhu X., Wang Y., Sun Y., Zheng J., Zhu D. MiR-155 up-regulation by LMP1 DNA contributes to increased nasopharyngeal carcinoma cell proliferation and migration. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, 2014, vol. 271, no. 7, pp. 1939–1945. doi: 10.1007/s00405-013-2818-0

Авторы:

Сенюта Н.Б., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории вирусного канцерогенеза ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина МЗ РФ, Москва, Россия;

Игнатова А.В., аспирант отделения опухолей дыхательно-пищеварительных путей ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина МЗ РФ, Москва, Россия;

Ломая М.В., аспирант отдела опухолей головы и шеи ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина МЗ РФ, Москва, Россия;

Гончарова Е.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории вирусного канцерогенеза ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина МЗ РФ, Москва, Россия;

Щербак Л.Н., к.б.н., научный сотрудник лаборатории вирусного канцерогенеза ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина МЗ РФ, Москва, Россия;

Душенькина Т.Е., лаборант-исследователь лаборатории вирусного канцерогенеза ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина МЗ РФ, Москва, Россия;

Гугунов Д.В., к.б.н., врач-онколог поликлинического отделения ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина МЗ РФ, Москва, Россия;

Мудунов А.М., д.м.н., зав. отделением опухолей дыхательно-пищеварительных путей ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина МЗ РФ, Москва, Россия;

Гурцевич В.Э., д.м.н., профессор, зав. лаборатории вирусного канцерогенеза ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина МЗ РФ, Москва, Россия.

Authors:

Senyuta N.B., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Viral Carcinogenesis, N.N. Blokhin Cancer Research Center, Moscow, Russian Federation;

Ignatova A.V., PhD Candidate, Department of The Tumors of Respiratory and Digestive Tract, N.N. Blokhin Cancer Research Center, Moscow, Russian Federation;

Lomaya M.V., PhD Candidate, Department of the Head and Neck Tumors, N.N. Blokhin Cancer Research Center, Moscow, Russian Federation;

Goncharova E.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Viral Carcinogenesis, N.N. Blokhin Cancer Research Center, Moscow, Russian Federation;

Scherback L.N., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Viral Carcinogenesis, N.N. Blokhin Cancer Research Center, Moscow, Russian Federation;

Dushenkina T.E., Investigator (Biologist), Laboratory of Viral Carcinogenesis, N.N. Blokhin Cancer Research Center, Moscow, Russian Federation;

Gugunov D.V., PhD (Biology), Oncologist, Outpatient Department, N.N. Blokhin Cancer Research Center, Moscow, Russian Federation;

Mudunov A.M., PhD, MD (Medicine), Head of the Department of Respiratory and Digestive Tract Tumors, N.N. Blokhin Cancer Research Center, Moscow, Russian Federation;

Gurtsevitch V.E., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Viral Carcinogenesis, N.N. Blokhin Cancer Research Center, Moscow, Russian Federation.