

Вирус Эпштейна–Барр у этнических татар: инфицированность и сиквенсные варианты онкогена LMP1

К. В. Смирнова^{1,2}, Н. Б. Сеньюта¹, И. В. Ботезату¹, Т. Е. Душенькина¹, А. К. Лубенская¹, А. А. Фроловская¹,
С. В. Петров³, А. В. Лихтенштейн¹, В. Э. Гурцевич¹

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

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

³ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер» Министерства здравоохранения Республики Татарстан;
Республика Татарстан, 420029 Казань, тракт. Сибирский, 29

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

Цель исследования — изучение инфицированности вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ) этнических татар и анализ генетической структуры онкогена вируса, латентного мембранного белка 1 (LMP1), в штаммах вируса татарского происхождения.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили буккальные смывы 60 студентов Казанского государственного медицинского университета, являющихся этническими татарами (не менее чем в III поколении). Выделенную из смывов ДНК использовали для амплификации LMP1. Амплифицированные из ДНК буккальных смывов нуклеотидные последовательности образцов LMP1, транслированные в аминокислотные последовательности, подверглись классификации на основании известной и широко используемой в литературе классификации R. H. Edwards и соавт.

Результаты. Анализ нуклеотидных и транслированных аминокислотных последовательностей 41-го ампликона LMP1 выявил их гомологию только с 3 вариантами гена из классификации R. H. Edwards и соавт.: 95.8/A (29,3 %; 12/41), Med– (14,6 %; 6/41) и China1 (7,3 %; 3/41). Такие варианты LMP1, как Alaskan, Med+, China2, China3 и NC, не обнаружены. В остальных 20 случаях (48,8 %) спектр обнаруженных мутаций в образцах LMP1 татарского происхождения не позволил их отнести ни к одному из перечисленных выше вариантов онкогена. Из них в 7 случаях (17,1 % всех исследованных образцов) обнаружена моногруппа вариантов LMP1, отличающаяся не только от представителей славян, жителей европейской части России, но и от других казанских образцов, и обозначенная нами, как LMP1-Tat^K. Остальные 13 образцов LMP1 (31,7 %), не относящихся ни к одной из известных классификаций, сформировали группу, обозначенную нами, как группа LMP1 вне классификации (LMP1^{BK}).

Заключение. Дальнейшее изучение молекулярно-биологических и функциональных свойств LMP1 в группах BK и Tat^K, составляющих 48,8 % от числа изученных образцов онкобелка, и анализ особенностей генотипа этнических татар, вероятно, позволят выяснить, оказывают ли определенные штаммы ВЭБ влияние на показатели заболеваемости и смертности злокачественными новообразованиями, в состав которых входят ВЭБ-ассоциированные случаи, у татарского населения.

Ключевые слова: вирус Эпштейна–Барр, латентный мембранный белок 1, этнические татары, сиквенсный анализ, полимеразная цепная реакция в реальном времени, копии ДНК ВЭБ

Для цитирования: 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.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-3-65-74

Epstein–Barr virus in the ethnic Tatars population: the infection and sequence variants of LMP1 oncogene

K. V. Smirnova^{1,2}, N. B. Senyuta¹, I. V. Botezatu¹, T. E. Dushenkina¹, A. K. Lubenskaya¹, A. A. Frolovskaya¹, S. V. Petrov³,
A. V. Lichtenstein¹, V. E. Gurtsevitch¹

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

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

³Republican Clinical Oncological Dispensary, Ministry of Health of the Republic of Tatarstan;
29 Sibirskiy Trakt, Kazan 420029, Republic of Tatarstan

Objective of the investigation was to study the infection of ethnic Tatars with the Epstein–Barr virus (EBV) and to analyze the genetic structure of the oncogene of the virus, the latent membrane protein 1 (LMP1), in the virus strains of Tatar origin.

Materials and methods. The materials for the study were samples of boucle flushes of 60 students from the Kazan State Medical University who are ethnic Tatars (Tatars no less than in the 3rd generation). Amplified from DNA of boucle flushes the nucleotide sequences of the LMP1 samples translated into DNA amino acid sequences, have undergone classification based on the well-known and widely used in literature the R. H. Edwards et al. classification.

Results. The analysis of nucleotide and deductive amino acid sequences of the 41 LMP1 amplicons revealed their homology with only three gene variants from the R. H. Edwards et al. classification (1999): 95.8/A (29.3 %; 12/41), Med– (14.6 %; 6/41) and China1 (7.3 %, 3/41).

Such variants of LMP1 as Alaskan, Med+, China2, China3 and NC, were not found. Among the LMP1 samples of Tatar origin in 20 cases (48.8 %), the composition of the mutations found did not allow them to be assigned to any of the oncogene variants listed above. Out of this number, in 7 (17.1 %) cases a mono group of LMP1 samples was found, differing not only from representatives of the Slavs, inhabitants of the European part of Russia, but also from other Kazan samples, and was designated as LMP1-Tat^K. The remaining 13 samples of LMP1 (31.7 %), not belonging to any of the known classifications, formed the group designated by us as an LMP1 group beside the classification (LMP1^{BC}).

Conclusion. Continuation of the study of the molecular-biological and functional properties of LMP1 in Tat^K and BC groups, which constitute 48.8 % of the number of gene samples studied, and an analysis of the peculiarities of the ethnic Tatar genotype, will probably help to clarify whether certain EBV strains influence morbidity and mortality in Tatar population with malignant neoplasms, which include EBV-associated cases.

Key words: Epstein–Barr virus, latent membrane protein 1, ethnic Tatars, sequence analysis, real time polymerase chain reaction, copy of EBV DNA

For citation: 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.

Введение

Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ), или лимфотропный герпес-вирус человека 4 (HHV4), представляющий собой двуспиральную ДНК с размером генома около 170 тыс. пар нуклеотидов, пожизненно инфицирует до 95 % взрослого населения планеты [1]. Заражение вирусом происходит при контакте со слюной инфицированного человека, однако переливание крови и трансплантация органов от инфицированных ВЭБ лиц также являются возможными путями его распространения [2]. В раннем детском возрасте заражение вирусом происходит обычно бессимптомно, тогда как инфицирование молодых людей, ранее не встречавшихся с вирусом, может привести к возникновению инфекционного мононуклеоза [3].

У здорового человека В-лимфоциты (преимущественно В-клетки памяти) и эпителиальные клетки — основные мишени вируса. ВЭБ первично инфицирует эпителиальные клетки слизистой оболочки, которая выстилает носоглотку и лимфоидные образования, окружающие вход в дыхательные и пищеварительные пути (кольцо Пирогова–Вальдейера), состоящее из миндалин и аденоидов) [4]. Инфицированные вирусом клетки, но не относящиеся к В-лимфоцитам, также могут определять развитие и патогенез ряда ВЭБ-ассоциированных патологий [5]. Через кольцо Вальдейера вирус проникает в периферическую кровь и инфицирует В-клетки памяти, в которых персистирует всю жизнь [6]. В этих клетках не происходит экспрессии латентных белков, лишь с эписомальной вирусной ДНК транскрибируются нетранслируемые РНК. Распознавание «родственного» антигена рецептором В-клеток памяти способно реактивировать ВЭБ из пула этих клеток, а дифференцировка плазматических клеток приводит к продукции литического инфекционного вируса. Благодаря циркуляции В-клеток памяти в кровотоке вирус внедряется во все отделы периферической лимфоидной системы и возвращается в полость рта через упомянутое лимфоидное кольцо. При этом содержание инфицированных В-клеток памяти в популяции лимфоидных элементов кольца Вальдейе-

ра и периферической крови, по данным L.L. Laichalk и соавт., оказалось достаточно близким. На каждые 10 млн В-клеток в этих лимфоидных образованиях число инфицированных В-клеток памяти составило в среднем 175 и 110 соответственно, хотя в периферической крови находится менее 1 % инфицированных В-клеток. В-клеток памяти, инфицированных ВЭБ, в В-клеточной популяции селезенки или брыжеечных лимфатических узлов обнаружено приблизительно в 20 раз меньше [7].

В организме здорового человека вирус находится под жестким иммунологическим контролем [8]. Ослабление по разным причинам иммунитета позволяет вирусу активно размножаться, а восстановление иммунокомпетентности подавляет репликацию вируса, снижая ее до фонового уровня. В инфицированном организме вирус, как правило, избегает распознавания иммунной системой. Это происходит благодаря экспрессии в В-лимфоцитах памяти ограниченного числа вирусных генов, а также в результате нарушения механизма экспрессии вирусных антигенов на поверхности этих клеток [9].

Являясь убиквитарным вирусом, ВЭБ в то же время инициирует целый ряд доброкачественных и злокачественных патологий. Среди доброкачественных новообразований — упомянутый выше инфекционный мононуклеоз и волосатая лейкоплакия полости рта. К числу злокачественных неоплазий относят лимфому Беркитта, недифференцированный гистологический вариант рака носоглотки, определенные гистологические варианты классической лимфомы Ходжкина, целый ряд неходжкинских лимфом, возникающих на фоне иммунодефицитных состояний различного генеза, определенные варианты рака желудка и др. [10].

Результатами многочисленных исследований показано, что в развитии ВЭБ-ассоциированных патологий активное участие принимает один из генов латентной инфекции вируса — латентный мембранный белок 1 (LMP1), кодирующий одноименный онкобелок LMP1. Этот белок обладает способностью стимулировать клеточный рост, ингибировать апоптоз в различных

типах клеток [11, 12] и индуцировать опухоли у трансгенных мышей [13]. Он обладает сниженной иммуногенностью и усиленной сигнальной активностью [14, 15]. Результаты исследований показали, что нуклеотидные замены у различных образцов *LMP1*, как правило, расположены в областях, контролирующих стадии транскрипции или трансляции [16, 17]. В состав онкобелка входят аминокислоты, влияющие на функциональную активность, иммуногенность, время полужизни или трансформирующий потенциал *LMP1*, которые у вирусных изолятов разного географического происхождения могут существенно различаться [10]. Известный в литературе вариант онкобелка *LMP1* Cao (*LMP1*^{Ca0}) китайского происхождения, в отличие от прототипного варианта *LMP1*^{B95.8} американского происхождения, содержит в С-терминальном домене характерную 10-членную делецию (30 пар нуклеотидов (п.н.)), прилегающую к области STAR2, 3 11-аминокислотного повтора, многочисленные точечные мутации и обладает более выраженной туморогенной активностью [18].

С-терминальный домен оказался наиболее изученным из идентифицированных доменов *LMP1* [1]. Его анализ в различных географических регионах позволил R. H. Edwards и соавт. в 1999 г. предложить широко используемую в настоящее время классификацию, согласно которой все изученные ими образцы *LMP1* были разделены на варианты, отличающиеся по содержанию ключевых аминокислотных замен по отношению к прототипному варианту *LMP1*^{B95.8} [19]. В предложенной классификации варианты *LMP1* названы в соответствии с географическим регионом их происхождения: Alaskan, China1, China2, China3, Mediterranean+ (Med+), Mediterranean– (Med–) и North Carolina (NC) [19]. Однако, поскольку упомянутая классификация *LMP1* создана для штаммов ВЭБ, циркулирующих среди населения ограниченного числа территорий, возникает вопрос о корректности ее применения для анализа *LMP1* из других географических регионов [20, 21]. К сожалению, классификация, которая отражала бы структурные особенности гена из разных стран и континентов, населенных различными народами и этническими группами, до сих пор не сформирована. В то же время известно, что генетическая структура населения, вредные факторы окружающей среды и спектр ВЭБ-ассоциированных заболеваний в разных регионах могут существенно отличаться, и нельзя исключить, что варианты *LMP1* для этих популяций будут содержать уникальные структурные изменения, не относящиеся к предложенной классификации.

Цель исследования – изучение штаммов ВЭБ у одного из древнейших народов России, поволжских татар, компактно проживающих в Республике Татарстан. В частности, представлялось важным выяснить, отличаются ли штаммы вируса, персистирующие среди этнических татар г. Казани от штаммов ВЭБ, циркулирующих у представителей славянских народов

г. Москвы, и различаются ли уровни заболеваемости ВЭБ-ассоциированными патологиями в сравниваемых регионах. Для реализации поставленной задачи исследовали подверженный выраженному полиморфизму С-терминальный домен *LMP1* вирусных изолятов, полученных из буккальных смывов изучаемых лиц 2 мегаполисов. Об уровнях ВЭБ-ассоциированной патологии косвенно судили по показателям заболеваемости и смертности от новообразований соответствующих локализаций в Москве и Татарстане.

Материалы и методы

Объекты исследования. Изучению были подвергнуты буккальные смывы 60 студентов Казанского государственного медицинского университета (КГМУ), являющихся этническими татарами (не менее чем в III поколении). Изучаемая группа студентов состояла из 15 представителей мужского пола и 45 – женского, средний возраст составил 21,5 года. Аналогичные смывы получены от 13 детей, посещающих детский сад, средний возраст которых составил 5,08 года, и от 40 здоровых взрослых лиц (21 мужчины и 19 женщин), средний возраст – 47,5 года. Последние 2 группы лиц являются коренными жителями г. Москвы славянского происхождения.

Каждый смыв представлял собой суспензию клеток, полученных индивидуально от каждого лица, после полоскания полости рта 15 мл стерильного физиологического раствора в течение 30 с. Образцы смывов, собранные в герметично закрывающиеся пластиковые пробирки, хранились при температуре +4 °С не более 2 сут до исследования. Все обследуемые лица, включенные в результате случайной выборки, подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Экстракция ДНК и амплификация гена *LMP1*. ДНК из собранных буккальных смывов выделяли методом фенол-хлороформной экстракции. Наличие вирусной ДНК в выделенных образцах анализировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени, описанном нами ранее [22]. Амплификацию *LMP1* проводили в 2 этапа с соответствующими внешними и внутренними праймерами по ранее использованной нами методике [23]. Каждый ПЦР-продукт очищали на мини-колонке Qiagen (Германия) согласно инструкции производителя. Для реакции использовали примерно 100–200 нг ПЦР-продукта, концентрацию ДНК оценивали визуально в агарозном геле. В качестве положительного контроля применяли 1 мкг ДНК, выделенной из используемой в качестве стандарта клеточной линии B95.8, в качестве отрицательного контроля – дистиллированную воду.

Секвенирование ПЦР-продуктов *LMP1*. Ампликоны онкогена *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 использованием программ Chromas 230 и Vector NTI.

Классификация LMP1. Нуклеотидные последовательности образцов *LMP1*, амплифицированных из ДНК буккальных смывов и транслированных в аминокислотные последовательности, подверглись классификации на основании совокупности мутаций, ведущих к заменам отдельных аминокислот, формированию делеций и дупликаций. За основу была принята известная в литературе классификация, сформированная на базе сиквенсного анализа белковых аналогов гена *LMP1*, полученных от больных ВЭБ-ассоциированной патологией и здоровых вирусоносителей из различных географических регионов мира [19]. При этом показано, что вариант *LMP1*^{China1} является аналогом высоко-туморогенного варианта *LMP1*^{Ca0} [19, 24].

Количественное определение числа копий вирусной ДНК. Число копий вирусной ДНК в 1 мл плазмы крови определяли методом ПЦР в реальном времени. Для построения калибровочных кривых использовали ДНК диплоидных клеток Namalwa, содержащих 2 интегрированных вирусных генома; при этом исходили из соотношения 3,3 пг геномной ДНК/1 копия вирусной ДНК [25]. Для ПЦР в реальном времени применяли праймеры к фрагменту размером 76 п. н. в области BamHI-W вирусной ДНК (GenBank ID: V01555): смысловой праймер W-44F (5'-CCCAACACTCCACC-ACACC); антисмысловой праймер W-119R (5'-TCTTAG-GAGCTGTCCGAGGG); флуоресцентный зонд W-67T (5'-FAM-CACACACTACA-CACACCCACCCGTCTC-RTQ1) [26]. Возможность использования ДНК плазмы крови как матрицы в ПЦР оценивали, взяв в качестве контроля уникальный ген *K-RAS*, как описано ранее [27]. Реакцию вели в 96-луночных планшетах на приборе CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США) в 50 мкл реакционной смеси (Синтол, Россия), содержащей 0,3 мкМ каждого из праймеров, 25 нМ флуоресцентного зонда, 4 мМ MgCl₂, 200 мМ каждого dNTP, 1 ед. Taq-полимеразы, 10 мкл раствора ДНК в буфере 10 мМ Трис-НCl (pH 8,0), 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (соответствует 50 мкл плазмы). В каждый анализ включали 2 отрицательных контроля (образцы, не содержащие ДНК). Условия ПЦР: денатурация 5 мин при температуре 95 °С; 40 циклов при температуре 95 °С 15 с и при 56,5 °С 30 с. Данные ПЦР в реальном времени анализировали с помощью программы CFX Manager (BioRad, США).

Результаты и обсуждение

Известно, что население многонациональной России состоит из многочисленных древних этносов, сохранивших собственную культуру, обычаи и населяющих, как правило, исторически закрепленные за ними территории. Поэтому представляется важным провести сравнительную характеристику персистирующих у этих народов штаммов ВЭБ, передаваемых из поколения в поколение на протяжении веков.

Представителем таких этносов являются татары, 2-м по численности после русских народом в России. При этом одну из основных групп татарского народа формируют казанские татары. Следует отметить, что не менее половины (а по данным ряда источников, даже более половины) населения г. Москвы составляют представители славянской национальности. Несмотря на то, что данные по этническому составу г. Москвы разнятся, в г. Казани этнический состав более однороден, а численность татарского населения не намного, но превышает число представителей славянских народов.

О вариантах штаммов ВЭБ, циркулирующих среди этнических татар г. Казани, можно судить по полиморфизму *LMP1* в буккальных смывах студентов КГМУ (табл. 1). Анализ нуклеотидных и дедуктивных аминокислотных последовательностей 41-го ампликона *LMP1*, полученных из 60 буккальных смывов (из остальных образцов амплифицировать *LMP1* не удалось), выявил их существенную вариабельность, но гомологию только с 3 вариантами гена из классификации R. H. Edwards и соавт. [19]: B95.8/A (29,3 %; 12/41), Med- (14,6 %; 6/41) и China1 (7,3 %; 3/41). При этом такие варианты *LMP1*, как Alaskan, Med+, China2, China3 и NC, не обнаружены. У представителей славян г. Москвы, в отличие от образцов *LMP1* татарского происхождения, подавляющее число образцов относилось к варианту B95.8/A (82,5 %; 33/40), остальные соответствовали другим вариантам белка изучаемого вирусного онкогена – NC (7,5 %; 3/40), China1 (7,5 %; 3/40) и Med- (2,5 %; 1/40).

Среди образцов *LMP1* татарского происхождения в 20 (48,8 %) случаях состав обнаруженных мутаций не позволил их отнести ни к одному из перечисленных выше вариантов. Из них в 7 (17,1 %) случаях обнаружена моногруппа образцов *LMP1*, отличающаяся не только от московских, но и от других казанских образцов, и обозначенная нами, как *LMP1*-Tat^K. Остальные 13 (31,7 %) образцов *LMP1*, не относящихся ни к одной из известных классификаций, сформировали группу, обозначенную нами, как группа *LMP1* вне классификации (*LMP1*^{BK}).

У большинства образцов *LMP1* татарского происхождения при сиквенсном анализе обнаружены так называемые Ca0-ассоциированные мутации. Одна из таких мутаций, делеция 5 аминокислот (а.к.) (276–280 а.к.), встречающаяся в 16 (39 %) образцах, относится к области гена STAR-3. Эта область обеспечивает активацию сигнального пути Jak3/STAT и локализована между областями STAR-1 и STAR-2 вирусного генома. В 22 (53,7 %) образцах содержалась нехарактерная для известных в литературе вариантов *LMP1* вставка 33 а.к. (302–303 а.к.), локализованная в той же области STAR-3. Выявлены и единичные, не встречающиеся в известных вариантах *LMP1* точковые мутации. Среди них обнаруженная в 7 (17,1 %) случаях мутация в кодоне 252 (G→A), относящаяся к STAR-2 – области,

Таблица 1. Спектр вариантов LMP1, обнаруженных в изолятах вируса Эпштейна–Барр из буккальных смывов славян и этнических татар
Table 1. Spectrum of LMP1 variants found in the isolates of the Epstein–Barr virus from the buccal flushes of slavians and ethnic Tatars

Число обследованных лиц, <i>n</i> Number of examined persons, <i>n</i>	Число амплифицированных образцов LMP1, <i>n</i> (%) Number of amplified LMP1 samples, <i>n</i> (%)	Варианты LMP1 по классификации R. H. Edwards и соавт. [19], <i>n</i> (%) Всего 21 (51,2 %) образец LMP1 variants per the R. H. Edwards et al. [19] classification, <i>n</i> (%) 21 (51.2 %) samples in total				Варианты LMP1, не поддающиеся классификации, <i>n</i> (%) Всего 20 (48,8 %) образцов LMP1 variants that can't be classified, <i>n</i> (%) 20 (48.8 %) samples in total	
		B95.8/A	Med–	China1	North Carolina	Вне классификации R. H. Edwards и соавт. [19] Outside the R. H. Edwards et al. [19] classification	Характерные для этнических татар (TatK) Characteristic of ethnic Tatars (TatK)
Этнические татары г. Казани <i>Ethnic Tatars of Kazan</i>							
60	41 (69,5)	12 (29,3)	6 (14,6)	3 (7,3)	0	13 (31,7)	7 (17,1)
Славяне г. Москвы <i>Slavic diaspora of Moscow</i>							
40	40 (100)	33 (82,5)	1 (2,5)	3 (7,5)	3 (7,5)	0	0

рекрутирующей TNFR-ассоциированный белок домена смерти (TRADD) и так называемый рецептор-взаимодействующий белок (RIP). В 6 (14,6 %) случаях выявлены мутации в кодоне 317 (D→E) (область STAR-3), а в 5 (12,2 %) – в кодоне 229 (S→T). Последняя замена расположена в области STAR-1, активно взаимодействующая с TNRF-белками (TRAF1, -2, и -5). Можно предположить, что обнаруженные мутации меняют профиль внутриклеточной активности ряда сигнальных путей и их биологическую активность.

Однако особый интерес представляют 7 образцов LMP1-Tat^K, отличающихся от остальных образцов татарского происхождения и образцов LMP1 не только здоровых лиц, но также от больных злокачественными опухолями из разных регионов России [28]. Эта группа образцов характеризовалась сочетанным содержанием делеций 5 а.к. в кодонах 312–316 и 382–386 (табл. 2). Вариант же LMP1-Tat^K с учетом генеалогии изучаемых лиц (татары, по крайней мере, в III поколении) возможно относится к эволюционно древнему штамму вируса.

В ряде работ показано, что С-терминальный домен у образцов LMP1 содержит различное число повторов, состоящих из 11 а.к. (PQDPNTDDMG), локализованных между а.к. 253 и 306 [24, 29]. Прототипный вариант LMP1-B95.8 содержит 4 таких повтора и 2 вставки, состоящие из 5 а.к. (PHDPL): одна (275–279) располагается между 2-м и 3-м повторами, другая (302–306) – после последнего повтора. Вставка 5 а.к. представляет собой так называемый JAK3-сайт области STAR3 (275–330 а.к.), предположительно участвующей в JAK3/STAT-сигналинге [25, 30]. Для того чтобы выяснить структуру у изучаемых LMP1-образцов, полученных от этнических татар, С-терминальные домены этих образцов анализировали на содержание в них

повторов и вставок (рис. 1). Исследованию подвергли 41 образец, обозначенный на рис. 1 буквой «Т». Структура из 11 а.к. повторов и 5 а.к. вставок, подобная прототипному штамму LMP1^{B95.8}, обнаружена для 17 образцов. Семь повторов из 11 а.к. содержал 21 образец, у 12 из которых отсутствовала вставка 5 а.к. между 2-м и 3-м повторами, присутствующая у прототипного варианта LMP1^{B95.8}. Кроме того, у 17 образцов выявлены точечные мутации D→G в области 11 а.к. повторов. Подобные мутации нами были обнаружены ранее у россиян кавказского происхождения, больных раком носоглотки [28]. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что изоляты ВЭБ от этнических татар содержат варианты LMP1, обладающие как B95.8-подобной структурой повторяющихся элементов, так и структурой, характерной для вариантов онкогена африканского и японского происхождения [30]. Однако, в отличие от японских изолятов ВЭБ, как в татарских, так и российских изолятах, часто встречаются точечные мутации D→G. Различие в числе повторов и вставок JAK3 мотива 5 а.к. между повторами объясняется рекомбинациями, возникающими в процессе репликации вируса [24]. Однако существуют гипотезы, объясняющие мутационные изменения географическим происхождением ВЭБ [30].

Из данных литературы и результатов собственных исследований известно, что слюна даже здоровых лиц, как правило, содержит вирусные частицы. Последние, смешиваясь со слюной, оказываются в полости рта в результате разрушения литически инфицированных ВЭБ эпителиальных клеток слизистой оболочки, выстилающей носоглотку и кольцо Вальдейера. При этом в слюне концентрация вирусных частиц оказывается гораздо выше, чем в периферической крови.

Таблица 2. Мутации С-терминального домена у образцов $LMP1^{B95.8}$, $LMP1^{Ca0}$ и $LMP1^{Tat}$ Table 2. Mutations of the C-terminal domain in $LMP1^{B95.8}$, $LMP1^{Ca0}$, and $LMP1^{Tat}$ samples

Образец $LMP1$ sample	Мутации в STAR-областях гена $LMP1$ Mutations in the STAR-regions of the $LMP1$ gene			Сао-ассоциированные мутации $LMP1$ Ca0-associated $LMP1$ mutations			Мутации $LMP1$ вне известных классификаций $LMP1$ mutations outside known classifications	
	STAR-1 191–232	STAR-2 351–386	STAR-3 275–330	Делеция 276–280 (5 а.к.) Deletion 276–280 (5 a.a.)	Вставка 302–303 (11 а.к. x3) Insertion 302–303 (11 a.a. x3)	Делеция 346–355 (10 а.к.) Deletion 346–355 (10 a.a.)	Делеция 312–316 (5 а.к.) Deletion 312–316 (5 a.a.)	Делеция 382–386 (5 а.к.) Deletion 382–386 (5 a.a.)
Варианты *$LMP1^{B95.8}$ и **$LMP1^{Ca0}$ * $LMP1^{B95.8}$ and ** $LMP1^{Ca0}$ variants								
*B95.8	–	–	–	–	–	–	–	–
**Ca0	Мутация G212S Mutation G212S	Мутация S366T Mutation S366T	Делеция 276–280 Мутация Q322N Deletion 276–280 Mutation Q322N	+	+	+	–	–
Варианты $LMP1^{Tat}$ $LMP1^{Tat}$ variants								
T-2	–	–	276–280; Q322N	+	+	–	+	+
T-4	S229T	–	276–280; Q322N	+	+	–	+	+
T-5	S229T	S366T	276–280; Q322N	+	+	–	+	+
T-6	S229T	–	276–280; Q322N	+	+	–	+	+
T-33	S229T	S366A	–	–	+	–	+	+
T-44	–	S366T	276–280; Q322N	+	+	–	+	+
T-45	S229T	–	–	–	–	–	+	+

Примечание. $LMP1^{B95.8}$ – прототипный вариант гена; $LMP1^{Ca0}$ – высокотрансформирующий вариант гена; $LMP1^{Tat}$ – вариант гена, характерный только для этнических татар г. Казани; а.к. – аминокислоты.

Note. $LMP1^{B95.8}$ – prototype gene variant; $LMP1^{Ca0}$ – highly transforming variant; $LMP1^{Tat}$ – gene variant characteristic only of ethnic Tatars of Kazan; a.a. – amino acids.

В нашем исследовании медиана чисел копий ДНК ВЭБ в 15 мл буккального смыва варьировала от 0 у московских детей 5-летнего возраста и 833 у взрослых москвичей старше 40 лет до 3538 у 20-летних студентов КГМУ (табл. 3). Однако медиана чисел копий вирусной ДНК, приходящихся на 1 клетку в одном и том же объеме буккального смыва, была нулевой у детей и студентов и практически нулевой (0,01) у взрослых лиц. Полученные данные, вероятно, свидетельствует об умеренной репликации вируса в слизистой оболочке полости рта у здоровых лиц разного возраста, поскольку на 1 клетку клеточной суспензии смыва приходилось менее 1 копии вирусного генома.

Более высокий уровень полиморфизма гена $LMP1$ для штаммов ВЭБ, персистирующих среди этнических татар г. Казани по сравнению с таковым у представителей славянской популяции в г. Москве (см. табл. 1), позволил предположить наличие более высоких показателей заболеваемости и смертности для татарского населения определенными формами злокачественных

новообразований, в состав которых входят ВЭБ-ассоциированные случаи. Действительно, содержание низкотрансформирующего варианта $LMP1^{B95.8}$ среди вирусных изолятов этнических татар оказалось существенно ниже, чем среди таковых у московских славян (29,3 и 82,5 % соответственно). Более того, в отличие от вирусных изолятов московского происхождения, содержащих кроме $LMP1^{B95.8}$ в небольшом проценте случаев варианты $LMP1^{NC}$ (7,5 %), $LMP1^{Chinal}$ (7,5 %) и $LMP1^{Med-}$ (2,5 %), среди изолятов татарского происхождения обнаружены аналогичные высокотрансформирующие варианты $LMP1^{Chinal}$ (7,3 %), и $LMP1^{Med-}$ (14,6 %), а также варианты с неизвестным трансформирующим потенциалом ВК (31,7 %) и Tat^k (17,1 %). Для того чтобы выяснить обоснованность высказанного предположения, в перечень анализируемых патологий были включены новообразования полости рта, глотки, желудка, а также злокачественные лимфомы (рис. 2). Как известно, среди опухолей полости рта определенную часть составляют ВЭБ-ассоциированные случаи

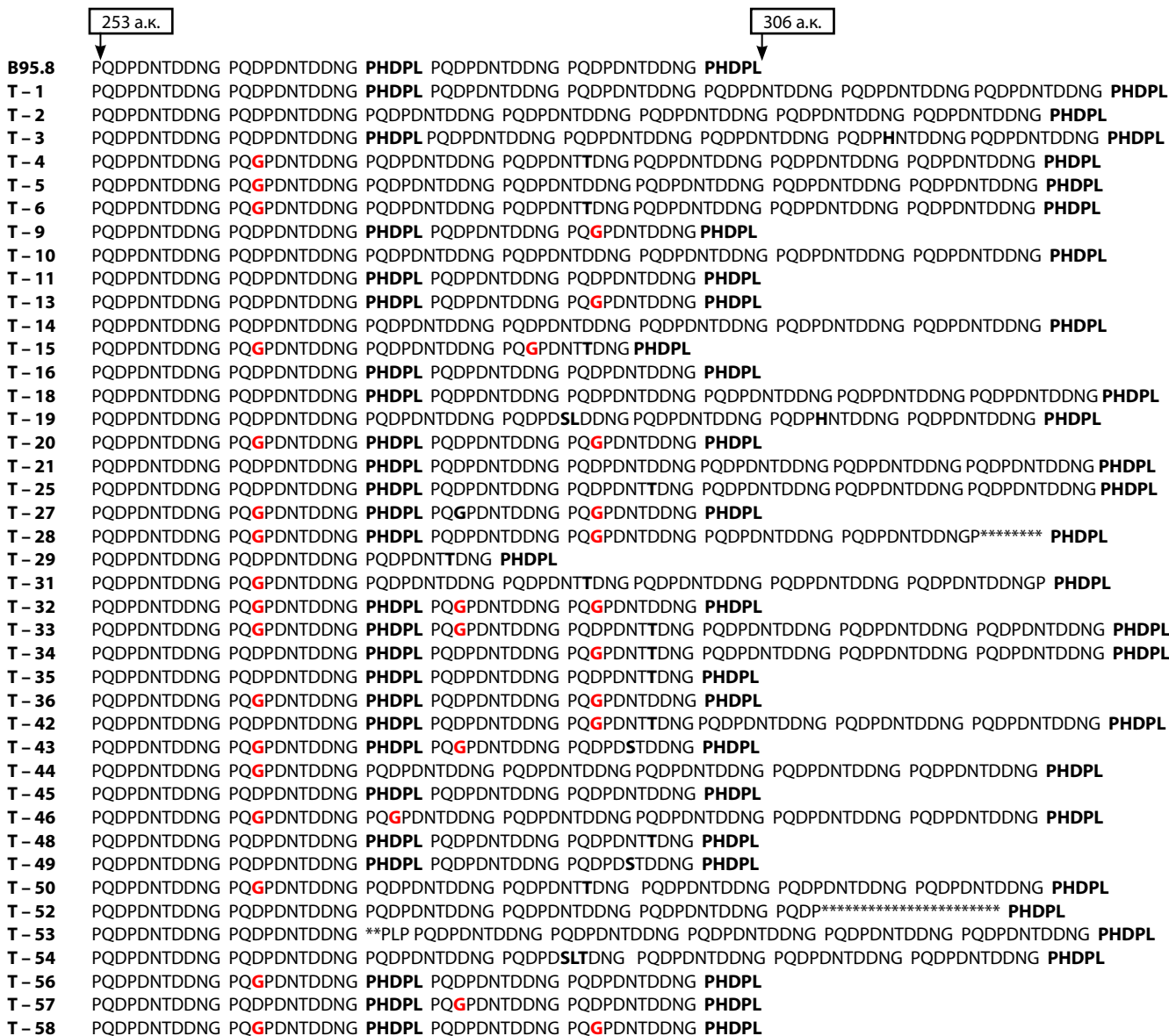


Рис. 1. Варианты 11 а.к. повторов С-терминального домена в изолятах LMP1 у представителей этнических татар г. Казани. T1...T58 – кодовое обозначение изолятов LMP1; QQDPDNTDDNG – повторяющиеся элементы 11 а.к.; PHDPL – вставка 5 а.к. последовательностей; D→G – точечные мутации в области 11 а.к.

Fig. 1. Variants of 11 a.a. repeats of the C-terminal domain in LMP1 isolates from representatives of ethnic Tatars from Kazan. T1...T58 denotes LMP1 isolates; QQDPDNTDDNG – 11 a.a. repeated elements; PHDPL – 5 a.a. insertion; D→G – site-specific mutations in the 11 a.a. region

рака миндаины и лимфоэпителиального рака слюнных желез [31, 32]; среди опухолей глотки – ВЭБ-ассоциированные случаи недифференцированного рака носоглотки [22, 33]; среди опухолей желудка – ВЭБ-ассоциированные случаи богатого лимфоидной инфильтрацией рака желудка [34]; среди злокачественных лимфом – лимфомы Ходжкина и Беркитта, а также целый спектр неходжкинских лимфом, возникших на фоне иммунодефицитных состояний [35, 36].

Анализ показателей заболеваемости и смертности для указанных патологий в изучаемых нами регионах выявил следующее [37]. Показатели заболеваемости опухолями полости рта, глотки и желудка на 100 тыс. населения г. Казани оказались действительно несколько выше, чем соответствующие показатели для населения

г. Москвы, однако заболеваемость злокачественными лимфомами в г. Казани была ниже, чем в г. Москве (см. рис. 2а). В то же время соответствующие показатели смертности от всех указанных новообразований среди жителей г. Казани были выше, чем среди жителей г. Москвы (см. рис. 2б). Поскольку уровень и качество медицинской помощи в обоих мегаполисах находятся на одинаково высоком уровне, полученные данные на первый взгляд подтверждают правильность предложенной гипотезы. Однако с учетом того факта, что ВЭБ-ассоциированные опухоли составляют лишь незначительный процент от каждого из перечисленных выше новообразований, наблюдаемый феномен скорее можно объяснить генетическими особенностями сравниваемых популяций, их отличающим HLA-гаплотипом

Таблица 3. Инфицированность полости рта ВЭБ у представителей разных возрастных групп

Table 3. Oral infection by EBV in representatives of different age groups

Группа Group	Число наблюдений Number of observations	Средний возраст, лет Mean age, years	Число копий ДНК ВЭБ в 15 мл буккального смыва Number of EBV DNA copies in 15 ml of buccal lavage		Число клеток в 15 мл буккального смыва Number of cells in 15 ml of buccal lavage		Число копий ДНК ВЭБ на 1 клетку буккального смыва Number of EBV DNA copies per 1 cell in buccal lavage	
			Медиана Median	МКИ IQR	Медиана Median	МКИ IQR	Медиана Median	МКИ IQR
Дети г. Москвы Children of Moscow	13	5,08	0	0–1056	313917	90084–582917	0	0–0,008
Студенты КГМУ KSMU students	60	21,5	3538	0–183792	28229167	20183333–38150000	0	0–0,009
Здоровые взрослые Healthy adults	40	47,5	833	0–3281025	37118174	23065080–69397634	0,01	0–0,257

Примечание. ВЭБ – вирус Эпштейна–Барр; МКИ – межквартильный интервал; КГМУ – Казанский государственный медицинский университет.

Note. EBV – Epstein–Barr virus; IQR – interquartile range; KSMU – Kazan State Medical University.

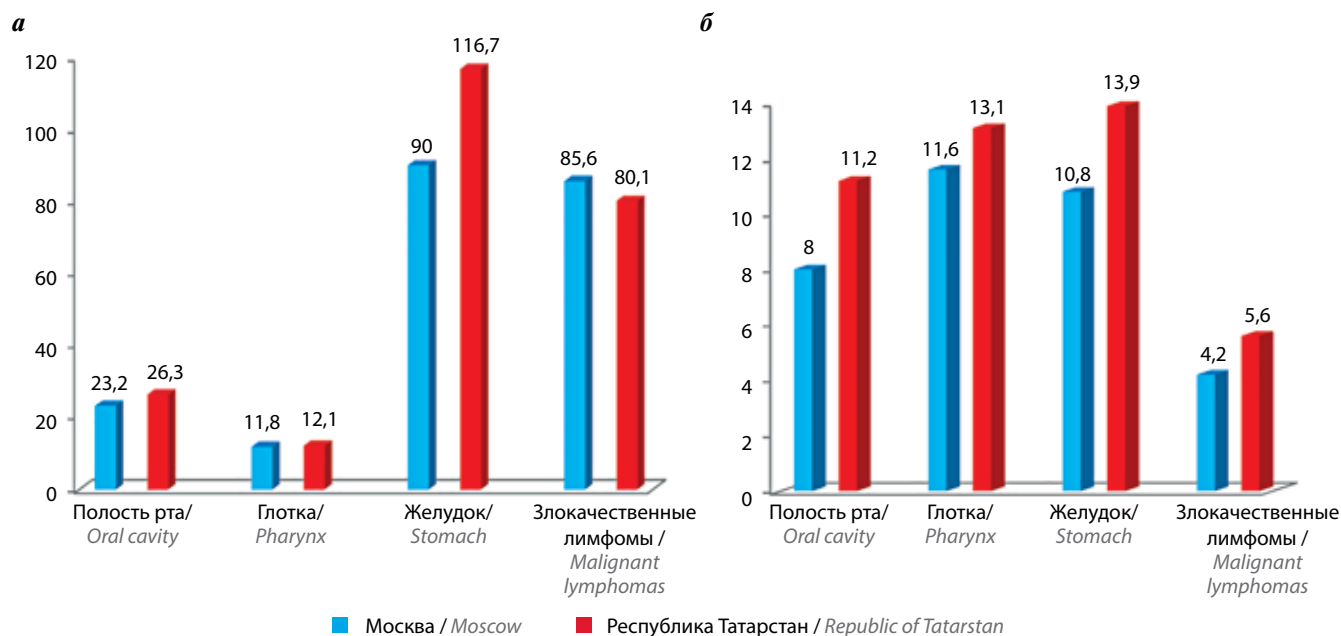


Рис. 2. Показатели заболеваемости и летальности для некоторых форм опухолей, в состав которых входят случаи, ассоциированные с вирусом Эпштейна–Барр [37]: а – заболеваемость (%) опухолями полости рта, глотки, желудка и злокачественными лимфомами на 100 тыс. населения, находившихся на учете в 2016 г. в г. Москва и Республике Татарстан; б – летальность (%) от опухолей полости рта, глотки, желудка и злокачественных лимфом на 100 тыс. населения, находившихся на учете в 2016 г. в г. Москва и Республике Татарстан

Fig. 2. Morbidity and mortality for some types of tumors including cases associated with the Epstein–Barr virus [37]: а – morbidity for tumors of the oral cavity, pharynx, stomach and malignant lymphomas per 100 people on file in 2016 in Moscow and the Republic of Tatarstan; б – mortality (%) for tumors of the oral cavity, pharynx, stomach and malignant lymphomas per 100 people on file in 2016 in Moscow and the Republic of Tatarstan

и связанной с ним повышенной чувствительностью или резистентностью к тем или иным новообразованиям.

Заключение

Дальнейшие исследования, в частности изучение молекулярно-биологических свойств LMP1 в группах

ВК и Tat^K, составляющих 48,8 % от числа изученных образцов гена, и особенности генотипа этнических татар, вероятно, позволят выяснить, оказывают ли влияние определенные штаммы ВЭБ на показатели заболеваемости и смертности у татарского населения.

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

- Chang C.M., Yu K.J., Mbulaiteye S.M. et al. The extent of genetic diversity of Epstein–Barr virus and its geographic and disease patterns: a need for reappraisal. *Virus Res* 2009;143(2):209–21. DOI: 10.1016/j.virusres.2009.07.005. PMID: 19596032.
- Gerber P., Walsh J.H., Rosenblum E.N. et al. Association of EB-virus infection with the post-perfusion syndrome. *Lancet* 1969;1(7595):593–5. PMID: 4180127.
- Santpere G., Darre F., Blanco S. et al. Genome-wide analysis of wild-type Epstein–Barr virus genomes derived from healthy individuals of the 1,000 Genomes Project. *Genome Biol Evol* 2014;6(4): 846–60. DOI: 10.1093/gbe/evu054. PMID: 24682154.
- Borza C.M., Hutt-Fletcher L.M. Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein–Barr virus. *Nat Med* 2002;8(6):594–9. DOI: 10.1038/nm0602–594. PMID: 12042810.
- Kasahara Y., Yachie A. Cell type specific infection of Epstein–Barr virus (EBV) in EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis and chronic active EBV infection. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002;44(3):283–94. PMID: 12467968.
- Young L.S., Rickinson A.B. Epstein–Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* 2004;4(10):757–68. DOI: 10.1038/nrc1452. PMID: 15510157.
- Laichalk L.L., Hochberg D., Babcock G.J. et al. The dispersal of mucosal memory B cells: evidence from persistent EBV infection. *Immunity* 2002;16(5):745–54. PMID: 12049725.
- Rickinson A.B., Long H.M., Palendira U. et al. Cellular immune controls over Epstein–Barr virus infection: new lessons from the clinic and the laboratory. *Trends Immunol* 2014;35(4):159–69. DOI: 10.1016/j.it.2014.01.003. PMID: 24589417.
- Rickinson A.B., Moss D.J. Human cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein–Barr virus infection. *Annu Rev Immunol* 1997;15:405–31. DOI: 10.1146/annurev.immunol.15.1.405. PMID: 9143694.
- Tzellos S., Farrell P.J. Epstein–Barr virus sequence variation-biology and disease. *Pathogens* 2012;1(2):156–74. DOI: 10.3390/pathogens1020156. PMID: 25436768.
- Kaye K.M., Izumi K.M., Kieff E. Epstein–Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90(19):9150–4. PMID: 8415670.
- Moorthy R.K., Thorley-Lawson D.A. All three domains of the Epstein–Barr virus-encoded latent membrane protein LMP1 are required for transformation of rat-1 fibroblasts. *J Virol* 1993;67(3):1638–46. PMID: 8382313.
- Kulwichit W., Edwards R.H., Davenport E.M. et al. Expression of the Epstein–Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(20):11963–8. PMID: 9751773.
- Hu L.F., Zabarovsky E.R., Chen F. et al. Isolation and sequencing of the Epstein–Barr virus BNLF-1 gene (LMP1) from a Chinese nasopharyngeal carcinoma. *J Gen Virol* 1991;72(Pt 10):2399–409. DOI: 10.1099/0022-1317-72-10-2399. PMID: 1681026.
- 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;282(2):278–87. DOI: 10.1006/viro.2001.0828. PMID: 11289810.
- Farrell P.J. Signal transduction from the Epstein–Barr virus LMP-1 transforming protein. *Trends Microbiol* 1998;6(5):175–7. PMID: 9614338.
- Huen D.S., Henderson S.A., Croom-Carter D., Rowe M. The Epstein–Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) mediates activation of NF-kappa B and cell surface phenotype via two effector regions in its carboxy-terminal cytoplasmic domain. *Oncogene* 1995;10(3):549–60. PMID: 7845680.
- Dirmeier U., Neuhierl B., Kilger E. et al. Latent membrane protein 1 is critical for efficient growth transformation of human B cells by Epstein–Barr virus. *Cancer Res* 2003;63(11):2982–9. PMID: 12782607.
- 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;261(1):79–95. DOI: 10.1006/viro.1999.9855. PMID: 10441557.
- Feederle R., Klinke O., Kutikhin A. et al. Epstein–Barr virus: from the detection of sequence polymorphisms to the recognition of viral types. *Curr Top Microbiol Immunol* 2015;390(Pt 1):119–48. DOI: 10.1007/978-3-319-22822-8_7. PMID: 26424646.
- Neves M., Marinho-Dias J., Ribeiro J., Sousa H. Epstein–Barr virus strains and variations: geographic or disease-specific variants? *J Med Virol* 2017;89(3):373–87. DOI: 10.1002/jmv.24633. PMID: 27430663.
- Gurtsevitch V.E., Iakovleva L.S., Shcherbak L.N. et al. The LMP1 oncogene sequence variations in patients with oral tumours associated or not associated with the Epstein–Barr. *Mol Biol (Mosk)* 2013;47(6):987–95. PMID: 25509860.
- 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. PMID: 11275985.
- Miller W.E., Edwards R.H., Walling D.M., Raab-Traub N. Sequence variation in the Epstein–Barr virus latent membrane protein 1. *J Gen Virol* 1994;75(Pt 10):2729–40. DOI: 10.1099/0022-1317-75-10-2729. PMID: 7931159.
- Lawrence J.B., Villnave 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. PMID: 2830981.
- 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. PMID: 10096545.
- 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. PMID: 21889482.
- Senyuta N., Yakovleva L., Goncharova E. et al. Epstein–Barr virus latent membrane protein 1 polymorphism in nasopharyngeal carcinoma and other oral cavity tumors in Russia. *J Med Virol* 2014;86(2): 290–300. DOI: 10.1002/jmv.23729. PMID: 24009107.
- Li H.P., Chang Y.S. Epstein–Barr virus latent membrane protein 1: structure and functions. *J Biomed Sci* 2003;10(5):490–504. DOI: 10.1159/000072376. PMID: 12928589.
- Kanai K., Satoh Y., Saiki Y. et al. Difference of Epstein–Barr virus isolates from Japanese patients and African Burkitt’s lymphoma cell lines based on the sequence of latent membrane protein 1. *Virus Genes* 2007;34(1):55–61. DOI: 10.1007/s11262-006-0010-y. PMID: 16917741.
- Wilmes E., Wolf H., Haus M. Tonsillar cancer and Epstein–Barr virus. *Laryngol Rhinol Otol (Stuttg)* 1983;62(12):586–9. PMID: 6323895.
- Wu L.Y., Cheng J., Lu Y. et al. Epstein–Barr virus infection in benign lymphoepithelial lesions with malignant transformation of salivary glands.

- Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi 2004;39(4):291–3. PMID: 15454012.
33. Ayadi W., Khabir A., Hadhri-Guiga B. et al. North African and Southeast Asian nasopharyngeal carcinomas: between the resemblance and the dissemblance. *Bull Cancer* 2010;97(4):475–82. DOI: 10.1684/bdc.2010.1090. PMID: 20385521.
34. Namikawa T., Fujisawa K., Munekage E. et al. Epstein–Barr virus-associated early gastric carcinoma with lymphoid stroma, accompanied with lymph node metastasis. *Mol Clin Oncol* 2018;8(4):561–6. DOI: 10.3892/mco.2018.1567. PMID: 29541465.
35. Alexander F.E., Jarrett R.F., Lawrence D. et al. Risk factors for Hodgkin's disease by Epstein–Barr virus (EBV) status: prior infection by EBV and other agents. *Br J Cancer* 2000;82(5):1117–21. DOI: 10.1054/bjoc.1999.1049. PMID: 10737396.
36. Andreone P., Gramenzi A., Lorenzini S. et al. Posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Arch Intern Med* 2003;163:1997–2004. DOI: 10.1001/archinte.163.17.1997. PMID: 14504111.
37. Состояние онкологической помощи населению России в 2016 году. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2017. 236 с. [State of oncological care in Russia in 2016. Eds.: A.D. Kaprin, V.V. Starinsky, G.V. Petrova. Moscow: MNIOI im. P.A. Gertsena – filial FGBU “NMIRTS” Minzdrava Rossii, 2017. 236 p. (In Russ.).]

Вклад авторов

К.В. Смирнова: идея и дизайн исследования, редактирование рукописи;
 Н.Б. Сенюта: сиквенсный анализ гена *LMP1*;
 И.В. Ботезату: секвенирование фрагментов вирусной ДНК;
 Т.Е. Душенькина: первичная обработка смывов полости рта;
 А.К. Лубенская: постановка полимеразной цепной реакции, анализ полученных результатов;
 А.А. Фроловская: выделение ДНК из анализируемых образцов;
 С.В. Петров: организация и сбор исследуемого материала;
 А.В. Лихтенштейн: анализ концентрации ДНК вируса Эпштейна–Барр в анализируемых пробах;
 В.Э. Гурцевич: организация исследования и написание рукописи.

Authors' contributions

K.V. Smirnova: study design and idea, manuscript editing;
 N.B. Senyuta: *LMP1* gene sequencing analysis;
 I.V. Botezatu: sequencing of virus DNA fragments;
 T.E. Dushenkina: primary processing of oral lavage;
 A.K. Lubenskaya: polymerase chain reaction, analysis of the obtained results;
 A.A. Frolovskaya: DNA recovery from the analyzed samples;
 S.V. Petrov: organization and accumulation of the studied material;
 A.V. Lichtenstein: analysis of Epstein–Barr virus DNA concentration in the analyzed samples;
 V.E. Gurtsevitch: study organization and manuscript preparation.

ORCID авторов/ORCID of authors

К.В. Смирнова/K.V. Smirnova: <https://orcid.org/0000-0001-6209-977X>
 Н.Б. Сенюта/N.B. Senyuta: <https://orcid.org/0000-0001-8915-8274>
 И.В. Ботезату/I.V. Botezatu: <https://orcid.org/0000-0002-0297-4963>
 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, а также поддержано грантом Российского научного Фонда (проект № 18-015-00505А).

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, also it was financially supported by the grant of the Russian Science Foundation (project No 18-015-00505A).

Информированное согласие. Все участники исследования подписали информированное согласие.

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

Статья поступила: 02.07.2018. **Принята к публикации:** 10.08.2018.

Article received: 02.07.2018. **Accepted for publication:** 10.08.2018.