

DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-3-49-59



Вирус Эпштейна–Барр у адыгейцев и славян в России: типы вируса, варианты *LMP1* и злокачественные новообразования

К. В. Смирнова^{1,2}, Н. Б. Сенюта¹, А. К. Лубенская¹, И. В. Ботезату¹, Т. Е. Душенькина¹, А. В. Лихтенштейн¹, В. Э. Гурцевич¹

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

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

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

Введение. Известно, что структурные особенности вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ) влияют на проявление его биологических свойств. На основе различий в последовательностях генов *EBNA2*, *EBNA3A*, *-B* и *-C* идентифицированы 2 типа вируса, 1-й (ВЭБ-1) и 2-й (ВЭБ-2), обладающие разной способностью трансформировать В-клетки *in vitro* и, возможно, играющие определенную роль в возникновении ВЭБ-ассоциированных новообразований.

Цель исследования – изучение распространенности ВЭБ-1 и ВЭБ-2 у этносов, адыгейцев и славян, а также вклада ассоциированных с ВЭБ случаев в общую заболеваемость злокачественными новообразованиями определенных органов и тканей.

Материалы и методы. Из 59 смывов полости рта этнических адыгейцев Республики Адыгея и 40 таковых этнических славян Москвы экстрагировали образцы ДНК. Эти образцы использовали для амплификации ДНК ВЭБ, определения концентрации копий вирусной ДНК на 1 клетку смыва, а также для амплификации *LMP1* ВЭБ с последующим секвенированием полученных образцов гена и выявления их белкового варианта (*LMP1*).

Результаты. Исследования показали, что у представителей адыгейцев преобладает ВЭБ-2, а у славян – ВЭБ-1. Изоляты ВЭБ у представителей 2 этносов также различались по структуре его *LMP1*: у славян выявлен целый набор его белковых вариантов (В95.8/А, China, Med– и NC), а у адыгейцев – единственный вариант – В95.8 и его подтип – В95.8/А. Доминирующий у представителей славян ВЭБ-1, обладающий способностью трансформировать В-клетки, проецировался на более высокую у населения Москвы, чем у населения Республики Адыгея, заболеваемость опухолями глотки, желудка, лимфомой Ходжкина и неходжкинскими лимфомами, в которых встречаются ВЭБ-ассоциированные случаи. Однако различия между показателями заболеваемости для указанных патологий (за исключением данных для желудка) были статистически недостоверными ($p > 0,5$). Более высокий и статистически достоверно отличающийся показатель заболеваемости раком желудка у жителей Москвы по сравнению с таковым у жителей Республики Адыгея, по нашему мнению, не обусловлен ВЭБ-1 и/или вариантами *LMP1*, а скорее связан с генетической предрасположенностью к этой опухоли населения Москвы.

Заключение. Факт обнаружения у 2 этносов России превалирования различных типов ВЭБ поднимает вопрос об их этногеографической ассоциации и роли в индукции ВЭБ-ассоциированных новообразований. Для решения этого вопроса необходимо проведение дополнительных исследований в других географических регионах России у представителей разных этносов.

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

Для цитирования: Смирнова К. В., Сенюта Н. Б., Лубенская А. К. и др. Вирус Эпштейна–Барр у адыгейцев и славян в России: типы вируса, варианты *LMP1* и злокачественные новообразования. Успехи молекулярной онкологии 2022; 9(3):49–59. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-3-49-59

Epstein–Barr virus in Adygeans and Slavs in Russia: virus types, *LMP1* variants, and malignant tumors

K. V. Smirnova^{1,2}, N. B. Senyuta¹, A. K. Lubenskaya¹, I. V. Botezatu¹, T. E. Dushenkina¹, A. V. Lichtenstein¹, V. E. Gurtsevich¹

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

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

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

Introduction. It is known that the structural features of the Epstein–Barr virus (EBV) affect the manifestation of its biological properties. Based on differences in the sequences of the *EBNA2*, *EBNA3A*, *-B*, and *-C* genes, two types of the virus, EBV-1 and EBV-2, have been identified that have different ability to transform B cells *in vitro* and possibly playing certain role in the development of EBV-associated neoplasms.

Aim. To study the prevalence of EBV-1 and EBV-2 in two ethnic groups, Adygeans and Slavs, as well as the contribution of EBV-associated tumors to the overall incidence of malignant neoplasms certain organs and tissues.

Materials and methods. DNA samples were extracted from 59 oral lavages of ethnic Adygeans from Republic of Adygea and 40 such from oral cavity of ethnic Slavs of Moscow city. These samples were used for amplification of EBV DNA, determination of the concentration of viral DNA copies per 1 cell washout, as well as for amplification of EBV *LMP1* followed by sequencing of the resulting gene samples and determination of their protein variant (*LMP1*).

Results. Studies have shown that among the representatives of the Adygeans the 2nd EBV type prevails, and among the Slavs, the 1st one. Epstein–Barr virus isolates in representatives of the two ethnic groups also differed in the structure of *LMP1*. Among the Slavs, a set of its *LMP1* variants (B95.8/A, China, Med– and NC) was identified. However, among the Adygeans, the only variant – B95.8 and its subtype – B95.8/A was identified. EBV-1, which prevails among the representatives of the Slavs and has the ability to transform B-cells, was projected onto a higher incidence of tumors of the pharynx, stomach, Hodgkin’s and non-Hodgkin’s lymphomas (where EBV-associated cases can occur) in the population of Moscow than in the population of the Republic of Adygea. However, the differences between incidence rates for these neoplasms (with the exception for the stomach tumors) were not statistically significant ($p > 0.5$). A higher and statistically significantly different incidence rate of stomach cancer in residents of Moscow city, compared with that in residents of the Republic of Adygea, in our opinion, is not due to EBV-1 type and/or *LMP1* variants, but rather is associated with a genetic predisposition the population of Moscow city to this tumor.

Conclusion. The fact that two ethnic groups of Russia were found to be prevails by different types of EBV raises the question of their ethno-geographical association and their role in the induction of EBV-associated tumors. To resolve this issue additional studies in other geographical regions of Russia among representatives of different ethnic groups are required.

Keywords: Epstein–Barr virus, Epstein–Barr virus types, latent membrane protein 1, sequencing, Adygeans, Slavs, real-time polymerase chain reaction, cancer incidence

For citation: Smirnova K.V., Senyuta N.B., Lubenskaya A.K. et al. Epstein–Barr virus in Adygeans and Slavs in Russia: virus types, *LMP1* variants, and malignant tumors. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2022;9(3):49–59. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-3-49-59

ВВЕДЕНИЕ

Широкое распространение вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ) среди населения планеты, как правило, не приводит к развитию каких-либо патологий у инфицированных лиц. В некоторых же случаях возникают опухоли. Для их формирования необходим ряд дополнительных факторов, благодаря которым трансформирующий потенциал вируса может быть включен в патологический процесс, приводящий к развитию опухоли. Для различных патологий, связанных с ВЭБ, эти факторы могут существенно различаться. Наиболее частыми из них являются неблагоприятные воздействия окружающей среды (канцерогенные, химические, радиационные и др.), снижение функциональной активности иммунной системы, а также генетическая предрасположенность к возникновению той или иной опухоли [1].

К числу злокачественных опухолей, ассоциированных с ВЭБ, относятся определенные морфогистологические случаи рака носоглотки и желудка, лимфомы Ходжкина (ЛХ) и неходжкинских лимфом (НХЛ), показатели заболеваемости для которых существенно различаются в разных популяциях и географических регионах. В частности, в России доля рака носоглотки в общей онкологической заболеваемости составляет 0,1–0,2 % (0,29 случая на 100 тыс. насе-

ния) [2]. Среди них плоскоклеточный некератиизирующий недифференцированный рак более чем в 97 % случаев ассоциирован с ВЭБ [3]. По результатам наших исследований из 206 образцов рака желудка, полученных от больных из российских клиник, в 18 (8,7 %) случаях была подтверждена ассоциация с ВЭБ [4]. Среди определенных по классификации Всемирной организации здравоохранения наиболее часто встречающихся лимфом, так называемых посттрансплантационных лимфолиферативных заболеваний, в качестве ассоциированных с ВЭБ были зарегистрированы следующие нозологические формы:

- ранние (неразрушающие) поражения в виде плазмочитарной гиперплазии, инфекционного мононуклеозоподобного посттрансплантационного лимфолиферативного заболевания и цветущей гиперплазии (практически 100 % случаев);
- полиморфные (деструктивные) поликлональная и моноклональная пролиферации (≥ 90 % случаев);
- полиморфные (деструктивные) моноклональные НХЛ, включая диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (~60 %), а также лимфому Беркитта, плазмочлеточную миелому и Т-клеточную лимфому, как ВЭБ+, так и ВЭБ– (ВЭБ– в 10–48 % случаев);

- ЛХ (деструктивная) моноклональная (>90 % случаев) [5].

Нельзя исключить, что различная частота возникновения опухолей у разных этносов в определенной степени связана с циркулирующими штаммами ВЭБ, обладающими неодинаковым онкогенным потенциалом.

Успехи молекулярной технологии позволили осуществлять полногеномное секвенирование образцов ВЭБ различного происхождения, чтобы охарактеризовать географическое разнообразие вируса и его связь с конкретным заболеванием. Проведенные исследования доказали, что в мире персистируют 2 типа ВЭБ: 1-й (ВЭБ-1, или А) и 2-й (ВЭБ-2, или В) типы [6]. К ВЭБ-1 относятся штаммы B95.8, GD1 и Akata. Он является основным типом ВЭБ, широко распространенным в мире, преимущественно в Европе, Азии, Северной и Южной Америке. К ВЭБ-2 относятся штаммы AG876 и P3HR-1. Этот тип чаще встречается на Аляске, в Папуа – Новой Гвинее и в странах Центральной Африки [7], например в Кении [8]. В регионах широкого распространения ВЭБ-2 также зарегистрированы случаи одновременного инфицирования 2 типами вируса [8].

Типы ВЭБ сначала были дифференцированы на основе различий аминокислотных последовательностей EBNA-2: ВЭБ-1 обладает более длинной, чем ВЭБ-2, рамкой считывания у белка EBNA-2 [7]. Дальнейший анализ геномов ВЭБ показал, что у 2 типов вируса большинство изменений локализуется не только в последовательностях EBNA-2, но и в последовательностях EBNA-3A, -B и -C. В частности, было показано, что у ВЭБ-1 EBNA-3C на 77 аминокислот меньше, чем у ВЭБ-2, и, таким образом, ВЭБ-1 и ВЭБ-2 могут быть идентифицированы на основе их различий в ORF EBNA-3C [6]. Фенотипическое же различие между типами вируса состоит в том, что ВЭБ-1 способен трансформировать В-лимфоциты *in vitro*, а ВЭБ-2 – нет [9]. Используя эту информацию, некоторые авторы пытались выяснить, не связаны ли определенные штаммы вируса с конкретными ВЭБ-ассоциированными заболеваниями. Поиски такой корреляции продолжаются, и уже показано, что ВЭБ-2 чаще обнаруживается у больных с ВЭБ-ассоциированными формами лимфом и здоровых лиц с выраженной иммуносупрессией [10].

Изучение изолятов ВЭБ различного географического и этнического происхождения позволило выявить существенные изменения в многочисленных локусах вирусного генома, влияющих на трансформирующий потенциал вируса. Этот потенциал прежде всего связан с полиморфизмом основного онкогена ВЭБ, латентного мембранного белка 1, *LMP1*, и кодируемого им белка, *LMP1*. При этом С-терминальная область *LMP1* для его функции считается принципиально важной. В ней выявлена делеция 30 пар оснований (п. о.), что соответствует делеции 10 аминокислот (346–355 а. к.),

а также делеция 69 п. о., повтор 33 п. о., делеция 5 а. к. и другие аминокислотные замены, влияющие на биологическую активность вируса [11].

На основе сиквенсного анализа С-концевой области *LMP1* были предложены несколько классификаций, объединяющих в отдельные группы его белковые варианты с наиболее характерными аминокислотными мутациями. В одну из широко представленных в литературе классификаций *LMP1* вошли варианты белка, обозначение которых (China 1 (Ch1), China 2 (Ch2), China 3 (Ch3), Mediterranean+ (Med+), Mediterranean– (Med–) и Northern Carolina (NC)) отражает их географическое происхождение [12]. Каждый представитель из 6 вариантов *LMP1* был детально охарактеризован по его способностям трансформировать клетки млекопитающих (Rat-1), вызывать активацию транскрипционного фактора NF-κB, а также связывать один из клеточных белков из семейства E3-убиквитин лигаз (HOS/β-TrCP) [13]. При этом варианты с незначительным полиморфизмом белка (3–4 а. к. замены) по отношению к *LMP1*-B95.8, например *LMP1*-B95.8/A, по классификации D.M. Walling и соавт. [14], относят к низко трансформирующим вариантам, а высокополиморфные, т.е. варианты с большим числом а. к. замен, делеций и вставок, – к высокотрансформирующим. Из всех вышеперечисленных вариантов *LMP1* наиболее изученным является *LMP1*-Caо/China1. Кроме указанной ранее характерной делеции 10 аминокислот (*LMP1*-del), этот белок дополнительно содержит 26 аминокислотных замен [15]. *LMP1*-Caо/China1 по сравнению с *LMP1*-B95.8 обладает более выраженным трансформирующим потенциалом *in vitro* [16], а также повышенной туморогенностью у бестимусных мышей, сниженной иммуногенностью и усиленной сигнальной активностью [17–19].

С учетом того, что последовательности С-терминального домена *LMP1* проявляют высокую степень гетерогенности по сравнению с другими генами ВЭБ, исследования, основанные на прямом секвенировании этого домена, позволили обнаружить в изучаемых типах биологического материала (кровь, слюна и опухолевая ткань) больных и здоровых лиц из разных географических регионов несовпадающие варианты *LMP1*. Так, новые варианты *LMP1*, являющиеся рекомбинантами вариантов Raji и China, выявлены в Аргентине [20]. Три варианта *LMP1* (CG-1-3), отличающиеся от европейских и африканских вариантов, были идентифицированы у китайских больных ЛХ. При этом как у пациентов с ВЭБ-ассоциированными случаями ЛХ, так и у здоровых лиц преобладали варианты *LMP1*-CG-1, содержащие делецию 30 п. н. [21]. Два новых варианта *LMP1*, обозначенные как Юго-Восточная Азия 1 (SEA 1) и Юго-Восточная Азия 2 (SEA 2), были выявлены в Южном Таиланде [22].

Анализ изолятов ВЭБ от этнических татар, выполненный нами в ранее проведенных исследованиях, позволил обнаружить кроме 3 известных белковых

вариантов LMP1 (95.8/A, Med— и Cao/China1) моногруппу LMP1, обозначенную как Tat^K (LMP1-Tat^K) и характеризующуюся сочетанным содержанием 2 делеций 5 а. к. в кодонах 312–316 и 382–386 [23]. Образцы LMP1-Tat^K отличались по своей генетической структуре не только от образцов LMP1 славян, жителей европейской части России, но и от других образцов LMP1 казанских татар, не обладающих «глубокой» татарской родословной. При этом можно было предположить, что ген, кодирующий LMP1-Tat^K, принадлежит к древнему штамму ВЭБ монголо-татарских племен, сформировавшихся в XIII в. Казанское ханство в Поволжье. Однако, по нашему предположению, этот вирусный штамм привязан либо к этническим татарам, либо географически к территории Поволжья и может быть обнаружен у других этносов этого региона. Дальнейшие исследования с использованием увеличенного числа образцов LMP1 татар, а также представителей других этносов Поволжья, вероятно, позволят выяснить вопрос о происхождении штамма ВЭБ с вариантом LMP1-Tat^K.

В последние годы растет интерес к исследованиям, направленным на выяснение существования штаммов ВЭБ, специфически связанных с конкретным этносом, географическим регионом или определенным заболеванием. Настоящее исследование находится в русле этих поисков. Как известно, Россия — многонациональное многоконфессиональное государство, расположенное в различных географических и климатических зонах. Населяющие страну многочисленные этносы различаются генетически, вероисповеданием, воздействием окружающей среды, укладом быта, кулинарными предпочтениями и т. д. Нельзя исключить, что штаммы ВЭБ, циркулирующие у разных этносов в одном и том же географическом регионе, могут вести себя по-разному в плане проявления своих инфицирующих и/или трансформирующих свойств. Взаимодействие циркулирующих штаммов вируса с различающимися главными комплексами гистосовместимости (МНС) разных этносов может отразиться на уровнях инфицированности этих этносов и/или заболеваемости ВЭБ-ассоциированными патологиями.

Изучение распространенности ВЭБ-1 и ВЭБ-2 у представителей древних адыгейцев и славян, а также уровней заболеваемости у 2 этносов злокачественными новообразованиями, в состав которых входят случаи, ассоциированные с этим вирусом, является **целью** настоящего **исследования**. Сиквенсный анализ онкогена *LMP1* позволит также вести поиски уникальных штаммов ВЭБ, персистирующих у представителей древних адыгейцев и славян, аборигенов Республики Адыгея (см. приложение) и Москвы соответственно.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. Изучению были подвергнуты смывы полости рта 59 жителей Майкопа (столицы Республики Адыгея), являющихся не менее чем

в 3-м поколении этническими адыгейцами. Изучаемая группа адыгейцев состояла из 25 здоровых мужчин и 34 женщин, жителей Майкопа; их средний возраст был равен 42,0 года. Аналогичные смывы получены от 40 здоровых коренных жителей Москвы (21 мужчины и 19 женщин), этнических славян (славян не менее чем в 3-м поколении), средний возраст которых составил 47,5 года. Смывы полости рта представляли собой суспензию клеток, полученных индивидуально от каждого изучаемого лица 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 °С не более 2 сут до исследования. От всех обследуемых лиц получено информированное согласие.

Экстракция ДНК и амплификация гена *LMP1*.

Из собранных смывов полости рта выделяли тотальную ДНК методом фенол-хлороформной депротеинизации. Наличие и концентрацию ДНК ВЭБ в выделенных образцах анализировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени, описанным нами ранее [24]. Амплификацию *LMP1* проводили в 2 этапа с внешними и внутренними праймерами по принятой нами методике [25]. 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.

Типирование вируса Эпштейна–Барр. Метод гнездовой ПЦР был использован для определения ДНК ВЭБ-1 и ВЭБ-2. Используемые праймеры продемонстрировали высокую специфичность и отсутствие перекрестной реактивности с геномом человека, другими вирусами или микроорганизмами [26]. В исследованиях использовали следующие пары праймеров: 5-AGG GATG CCT GGA CAC AAG A-3 и 5-TGG TGC TGC TGG TGG TGG CAA-3; для ВЭБ-1 — 5-TCT TGA TAG GGA TCC GCT AGG ATA-3 и 5-ACC GTG GTT CTG GAC TAT CTG GAT C-3; для ВЭБ-2 — 5-CAT GGT AGC CTT AGG ACA TA-3 и 5-AGA CTT AGT TGA TGC TGC CCT AG-3.

Первый раунд ПЦР проводили в смеси общим объемом 24 мкл, которая включала 3 мкл матрицы; 2,5 мкл 10x буфера для ПЦР (рН 8,3); 0,2 мкл ДНК-полимеразы; по 0,2 мМ каждого дезоксинуклеотида трифосфата общим объемом 0,2 мкл; 0,6 мкл внешних праймеров (в разведении 5 пкмоль на 100 мкл) и 17,9 мкл стерильной H₂O. Проводимая в амплификаторе для ДНК Mastercycler Personal (Eppendorf, Германия) ПЦР-амплификация включала этап начальной денатурации при 94 °С в течение 5 мин, затем 30 циклов: денатурация при 94 °С — 30 с, отжиг праймеров при

60 °C – 30 с, элонгация при 72 °C – 1 мин с заключительным шагом элонгации при 72 °C в течение 5 мин.

Второй раунд амплификации выполняли в другой пробирке с 3 мкл ПЦР-продукта 1-го раунда в качестве матрицы. Состав ПЦР-смеси был следующим: 2,5 мкл 10x буфера для ПЦР (рН 8,3); 0,2 мкл ДНК-полимеразы; по 0,2 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата общим объемом 0,2 мкл; 0,6 мкл внутренних праймеров (в разведении 5 пкМ на 100 мкл) и 17,9 мкл стерильной воды; ПЦР-амплификацию проводили также на приборе Mastercycler Personal (Eppendorf, Германия). Программа для 2-го раунда ПЦР состояла из 35 циклов денатурации при 94 °C в течение 30 с, отжига при 55 °C – 30 с, элонгации при 72 °C – 1 мин 30 с и заключительной стадии элонгации при 72 °C на протяжении 7 мин. Положительные контроли включали очищенную ДНК из клеток *Namalwa*. Ампликоны обнаруживали с помощью электрофореза, используя 12 мкл образца в 1,5 % агарозном геле, содержащем 1 мкг/мл бромистого этидия. Ожидаемые размеры целевых фрагментов ВЭБ-1 и ВЭБ-2 составляли 497 п. н. и 165 п. н. соответственно. Полимеразную цепную реакцию повторяли 1 раз для каждого клинического образца.

Количественное измерение вирусной ДНК. Число копий ДНК ВЭБ в смывах полости рта изучаемых лиц определяли с помощью ПЦР в реальном времени, следуя методике, описанной в работе К. Ло и соавт. [27]. 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. Детали проведения реакции описаны нами ранее [28].

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 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3100-Avant. Для обработки данных секвенирования использовали программы Chromas 230 и Vector NTI.

Классификация *LMP1*. Нуклеотидные последовательности образцов *LMP1*, амплифицированные из смывов ротоглотки и транслированные в аминокислотные последовательности, подверглись анализу с помощью известной в литературе классификации R. H. Edwards и соавт. [12]. Классификация сформирована на базе сиквенсного анализа транслированных последовательностей гена *LMP1*, полученных от больных с ВЭБ-ассоциированной патологией и здоровых вирусоносителей из различных географических регионов мира.

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 (Fisher's exact test) рассчитывали точное значение p при сравнении числа лиц, инфицированных ВЭБ-1 и ВЭБ-2; различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Инфицированность вирусом Эпштейна–Барр полости рта адыгейцев и славян. Плохое состояние полости рта, особенно у пожилых лиц, может стать серьезным фактором риска возникновения разнообразных новообразований пищеварительного тракта [29]. Хронические воспалительные процессы в полости рта, связанные с периодонтитом, утратой значительного количества зубов и другими патологиями, как правило, сопровождаются активным размножением бактерий. Бактерии, как известно, участвуют в производстве нитрозаминов (канцерогенов), а также стимулируют репликацию ВЭБ. Оба этих фактора могут быть вовлечены в процесс канцерогенеза с развитием новообразований, в том числе ассоциированных с данным вирусом [30].

Показатели инфицированности полости рта ВЭБ у адыгейцев и славян представлены в табл. 1. Из данных таблицы следует, что адыгейцы и славяне широко инфицированы ВЭБ. Копии ДНК ВЭБ у представителей обоих этносов были обнаружены в каждом миллилитре смыва полости рта, что свидетельствует об их практически 100 % инфицированности этим вирусом. Медиана чисел копий ДНК ВЭБ на 1 мл смыва полости рта у адыгейцев (мужчин и женщин) была несколько выше, чем у славян (мужчин и женщин) (1055 и 833 копий/мл соответственно), возможно, за счет большего числа клеток, содержащих ВЭБ, в адыгейских образцах. Однако различия между значениями медиан оказались статистически недостоверными ($p \leq 0,05$). Объединенные для мужчин и женщин значения медиан чисел копий вирусной ДНК на 1 клетку смыва, определяемую делением числа копий вирусной ДНК на число клеток в 1 мл смыва у представителей каждой этнической группы, равнялись практически нулю (0 и 0,01 соответственно). Эти данные, как и значения межквартильных интервалов, указывают на примерно равную и невысокую степени инфицированности полости рта адыгейцев и славян ВЭБ.

Типы и концентрация вируса Эпштейна–Барр у адыгейцев и славян. Изучение 2 популяций показало, что по процентному содержанию типов ВЭБ они различаются принципиально (рис. 1, *a–в*). Оказалось, что у адыгейцев доминировал ВЭБ-2, не обладающий способностью трансформировать В-лимфоциты *in vitro* (рис. 1, *a*), а у представителей славянской популяции – ВЭБ-1 (рис. 1, *б*), обладающий такой способностью. Так, из 59 образцов смывов полости рта адыгейцев ВЭБ-2 обнаружен в 45 случаях, а ВЭБ-1 – в 11 (76,3 и 18,6 % соответственно). В 3 случаях не выделена ДНК, в 1 случае тип вируса не определен. Из 38 образцов смывов полости рта славян ВЭБ-2 выявлен лишь

Таблица 1. Инфицированность вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ) полости рта адыгейцев и славян

Table 1. Epstein–Barr virus (EBV) infection of the oral cavity of the Adygeans and Slavs

Обследованные лица Examined persons (number)	Средний возраст, лет Average age, years	Число копий ДНК ВЭБ в 1 мл смыва, М (МКИ) Number of EBV DNA copies in 1 ml washout, IQR (M)	Число клеток в 1 мл смыва, М (МКИ) Number of cells in 1 ml washout, IQR (M)	Число копий ВЭБ на 1 клетку, М (МКИ) Number of EBV copies per 1 cell, IQR (M)
Этнические адыгейцы Республики Адыгея: Ethnic Adygeans people of the Republic of Adygea:				
мужчины ($n = 25$) men ($n = 25$)	37,4	592 (0–12 000)	4 154 809 (2 471 036–17 370 332)	0 (0–0,009)
женщины ($n = 34$) women ($n = 34$)	45,3	120 (0–32 673)	9 891 649 (3 191 503–24 091 712)	0 (0–0,00)
всего ($n = 59$) total ($n = 59$)	41,4	1055 (0–32 673)	5 440 174 (2 511 809 – 22 060 750)	0 (0–0,004)
Этнические славяне Москвы: Ethnic Slavs of the Moscow:				
мужчины ($n = 19$) men ($n = 19$)	56,4	437 (0–10 986)	3 954 721 (1 174 063–16 731 431)	0 (0–0,007)
женщины ($n = 21$) women ($n = 21$)	38,6	105 (0–23 367)	3 531 403–25 637 521 (12 978 894)	0 (0–0,002)
всего ($n = 38$) total ($n = 38$)	47,5	833 (0–3 281 025)	34 711 817 (23 065 080–69 397 634)	0,01 (0–0,257)

Примечание. МКИ – межквартильный интервал; М – медиана.
Note. IQR – interquartile range; M – median.

в 7 случаях, ВЭБ-2 – в 30 (18,4 и 78,9 % соответственно), в 1 случае тип вируса не определен. Различие в содержании ВЭБ-1 и ВЭБ-2 у представителей адыгейской и славянской популяций статистически было высоко достоверным ($p < 0,001$).

О концентрации вирусной ДНК (числе ее копий на 1 мл смыва) можно судить по высоте столбцов на рис. 1. Отсутствие столбцов свидетельствует о том, что в данном смыве концентрацию вирусной ДНК установить не удалось, несмотря на возможность ее присутствия и определение типа. На это указывают соответствующие каждому вирусному изоляту подрисуночные квадратики, окрашенные в красный или синий цвет, обозначающие тип вируса. Согласно данным, представленным на рис. 1, а, б, показатели чисел копий ДНК ВЭБ/мл (отражаемые высотой столбцов) на 1 мл смыва полости рта адыгейцев в целом превышают таковые в смывах полости рта славян, по-видимому, за счет большего числа вирусосодержащих клеток в смывах полости рта адыгейцев по сравнению со славянами (см. табл. 1).

Таким образом, статистически высоко достоверное различие в содержании ВЭБ-1 и ВЭБ-2 ($p < 0,001$), обнаруженное у представителей адыгейцев и славян (см. рис. 1, в), свидетельствует о том, что этнический, а возможно, и географический факторы могут существенно влиять на распространенность типов ВЭБ в России.

Полиморфизм гена *LMP1* вируса Эпштейна–Барр у адыгейцев и славян. О полиморфизме гена *LMP1*

в вирусных штаммах, циркулирующих среди этнических адыгейцев и славян, свидетельствуют данные, представленные в табл. 2. Анализ нуклеотидных и дедуктивных аминокислотных последовательностей 29 ампликонов *LMP1*, полученных из 59 смывов полости рта адыгейцев и 40 ампликонов *LMP1*, полученных из 40 аналогичных смывов славян, выявил их существенное различие. Если у представителей славян кроме подавляющего числа белковых образцов *LMP1*, относящихся к подтипу прототипного варианта *LMP1*, B95.8/A (82,5 %), обнаружены и другие варианты белка (China (7,5 %), Med– (2,5 %) и NC (7,5 %)), то у представителей адыгейцев выявлен только 1 вариант *LMP1*, B95.8 (96,6 %) и его подтип – B95.8/A (3,4 %).

Сиквенсный анализ амплифицированных образцов *LMP1* адыгейского происхождения позволил в области STAR2 обнаружить Caо-ассоциированные делеции S366T, а в области STAR3 – делеции S309T и S309N. Стоит отметить, что ни один образец *LMP1* адыгейского происхождения не содержал делеции 30 п. н. (346–355), что характерно для варианта del-*LMP1* [13]. Насколько подобные мутации типичны для адыгейцев, вероятно, можно будет судить, существенно увеличив число наблюдений.

Заболееваемость адыгейцев и славян новообразованиями, в состав которых входят ассоциированные с вирусом Эпштейна–Барр случаи. Доминирование нетрансформирующего типа ВЭБ (ВЭБ-2) у представителей адыгейцев позволило предположить наличие более низкого уровня заболеваемости ВЭБ-ассоциированными

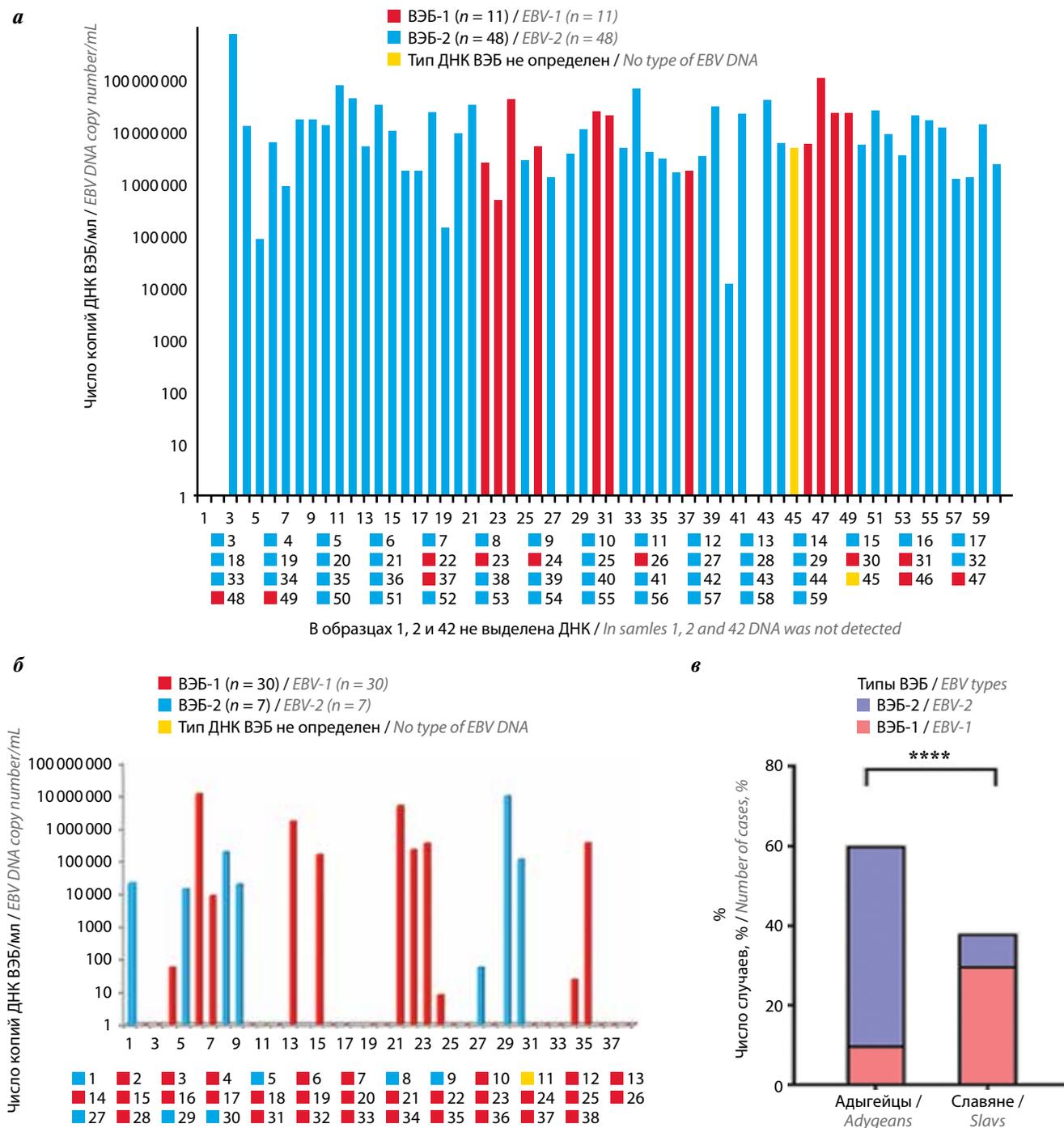


Рис. 1. Типы вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ), концентрация ДНК вируса в полости рта адыгейцев (а) и славян (б) и соотношение ВЭБ-1 и ВЭБ-2 у представителей этих этносов (в)
Fig. 1. Types of Epstein–Barr virus (EBV), concentration of virus DNA in the oral cavity of the Adygeans (a) and Slavs (б) and the ratio of EBV-1 and EBV-2 in representatives of these ethnic groups (в)

опухолью у населения Республики Адыгея по сравнению с таковым у населения Москвы, заселенной преимущественно славянами, у представителей которых преобладал трансформирующий 1-й тип вируса (ВЭБ-1). Для проверки этого предположения сравнивали показатели заболеваемости новообразованиями, среди которых диагностируют ВЭБ-ассоциированные случаи, для Москвы и Республики Адыгея [2]. Из данных, приведенных на рис. 2, следует, что заболева-

емость раком носоглотки, ЛХ и НХЛ – новообразованиями, относящимися к патологиям, в разной степени ассоциированным с ВЭБ, – у населения Республики Адыгея была несколько ниже, чем у населения Москвы. Однако различия были статистически недостоверными. Исключение составили лишь показатели заболеваемости раком желудка. У жителей Москвы они оказались существенно выше, чем у жителей Республики Адыгея; различие было статистически

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

Table 2. LMP1 polymorphism in Epstein–Barr virus isolates from oral washes of Adygeans and Slavs

Число образцов LMP1, абс. (%) Number of LMP1 samples, abc. (%)	Варианты LMP1 по классификации Edwards et al. (1999), абс. (%) LMP1 variants by classification of Edwards et al. (1999), abc. (%)					Мутации в областях STAR LMP1, абс. (%) Mutations in STAR regions of the LMP1 gene, abc. (%)		
	B95.8	B95.8/A	China	Med–	NC	STAR 1 191–232	STAR 2 351–386	STAR 3 275–330
<i>Этнические адыгейцы Республики Адыгея (n = 59)</i> <i>Ethnic Adygeans people of the Republic Adygea (n = 59)</i>								
29 (49,2)	28 (96,6)	1 (3,4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (10,3)	2 (6,9)
<i>Этнические славяне Москвы (n = 40)</i> <i>Ethnic Slavs of the Moscow (n = 40)</i>								
40 (100)	0 (0)	33 (82,5)	3 (7,5)	1 (2,5)	3 (7,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

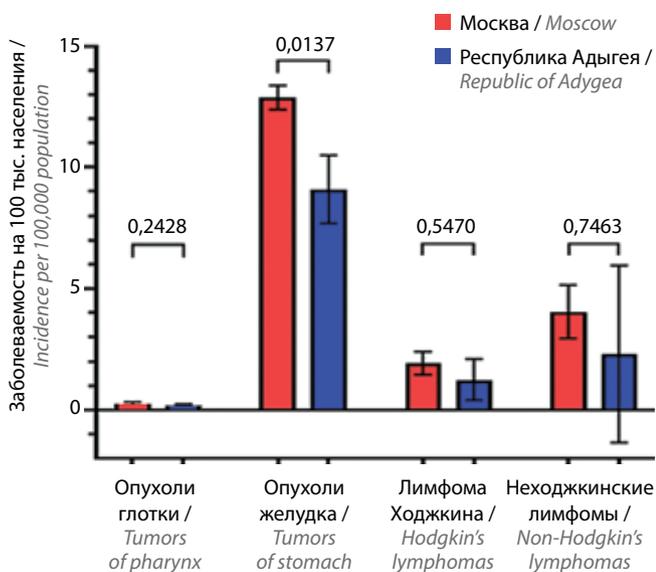


Рис. 2. Показатели заболеваемости злокачественными новообразованиями, включающими случаи, ассоциированные с вирусом Эпштейна–Барр, населения Москвы и Республики Адыгея. Для Москвы использованы стандартизированные показатели заболеваемости некоторыми злокачественными опухолями, среди которых встречаются случаи, ассоциированные с вирусом Эпштейна–Барр [2]

Fig. 2. Incidence rates of malignant neoplasm, including cases associated with the Epstein–Barr virus, for the population of the Moscow and the Republic of Adygea. For Moscow, we used adjusted incidence of certain malignant tumors, including cases associated with Epstein–Barr virus [2]

высоко достоверным ($p = 0,0137$). В ходе анализа показателей смертности от тех же новообразований в изучаемых популяциях было выявлено, что смертность от опухолей носоглотки и желудка у населения Республики Адыгея была выше, чем у населения Москвы (3,8 и 10,2 случая против 3,2 и 9,4 случая на 100 тыс. населения соответственно). В то же время показатели смертности от ЛХ и НХЛ, напротив, были хуже у населения Москвы, чем у населения Республики Адыгея (0,2 и 1,4 случая против 0,0 и 1,2 случая на 100 тыс. населения соответственно). Однако различия между по-

казателями смертности в сравниваемых группах были статистически недостоверными (данные не представлены).

ОБСУЖДЕНИЕ

Новые технологии секвенирования последних лет позволили проводить детальный анализ многочисленных геномов ВЭБ, полученных из образцов опухолевых биопсий, крови и слюны. Анализ опубликованных последовательностей вирусного генома был направлен на выяснение вопросов, являются ли некоторые из этих последовательностей специфическими для конкретной опухоли, этноса или географического региона и нельзя ли обнаружить штаммы ВЭБ высокого онкогенного риска. Сегодня к числу таких штаммов, по-видимому, можно отнести изолят ВЭБ М81, полученный от китайского больного раком носоглотки. Он вызывает пролиферацию В-клеток и демонстрирует высокую склонность к инфицированию эпителиальных клеток, что может явиться фактором риска для развития лимфом и различных форм рака, ассоциированных с ВЭБ. Используя иерархический байесовский (Hierarchical Bayesian) анализ структур различных популяций ВЭБ, L. Zanella и соавт. отобрали 12 популяций вируса, различающихся по ряду признаков [31]. Три из этих ВЭБ-популяций, представляющих собой штаммы азиатского происхождения, являются органоспецифическими. Так, за редким исключением популяция EBV-p1/Asia/GC была связана с развитием рака желудка, популяция EBV-p4/China/NPCs – с развитием рака носоглотки, а популяция EBV-p2/Asia II/Tumors – с несколькими типами других опухолей и лимфопролиферативных патологий [28]. Эти авторы для некоторых популяций ВЭБ обнаружили также заметную географическую зависимость их циркуляции. Одна популяция вируса была характерна для 4 азиатских стран (Китая, Японии, Кореи и Вьетнама), 2 другие персистировали исключительно в Кении, а еще 6 продемонстрировали более широкое географическое распространение.

Выполненное нами исследование подтвердило данные многочисленных работ, свидетельствующих о широкой инфицированности населения планеты ВЭБ. Группы этнических адыгейцев и славян были инфицированы этим вирусом в 100 % случаев. Большой интерес, однако, вызывает тот факт, что у представителей этносов одной и той же страны – России – доминируют различные типы ВЭБ. У адыгейцев преобладающим является ВЭБ-2, у славян – ВЭБ-1. Обнаруженный феномен поднимает вопрос о том, являются ли доминирующие варианты ВЭБ географически или этноспецифическими, а также может ли ВЭБ-1, обладающий более выраженным трансформирующим потенциалом *in vitro*, оказывать влияние на заболеваемость злокачественными новообразованиями, среди которых могут встречаться ВЭБ-ассоциированные случаи. Согласно статистическим данным, население Москвы действительно характеризуется более высокой заболеваемостью опухолями глотки, желудка, ЛХ и НХЛ по сравнению с населением Республики Адыгея [2], хотя различия между сравниваемыми показателями заболеваемости (кроме показателей для опухолей желудка) оказались статистически недостоверными ($p > 0,5$). Нам представляется, однако, что более высокие показатели заболеваемости злокачественными новообразованиями у жителей Москвы по сравнению с жителями Республики Адыгея не могут быть объяснены фактом обнаружения доминирующего распространения 1-го, трансформирующего,

типа ВЭБ у отобранной группы московских славян, поскольку многонациональное население Москвы представляет собой конгломерат представителей многочисленных этносов, среди которых этнические (не менее чем в 3-м поколении) славяне занимают лишь небольшой процент. Показатели же онкологической заболеваемости населения Москвы являются обобщающими и отражают структуру ее этнически разнородных жителей. В то же время более высокие и статистически достоверно отличающиеся показатели заболеваемости раком желудка у жителей Москвы по сравнению с таковыми у жителей Республики Адыгея, по нашему мнению, объясняются большей генетической предрасположенностью к развитию этой опухоли населения Москвы, а также более значительным воздействием на москвичей многочисленных вредных факторов окружающей среды, характерных для любого мегаполиса мира.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Причина доминирующей персистенции ВЭБ-1 среди славян и ВЭБ-2 среди адыгейцев остается неизвестной и требует дальнейшего изучения. Не исключено, что различающиеся генотипы ВЭБ, циркулирующие среди адыгейцев и славян, вносят определенный вклад в процесс канцерогенеза, но это предположение требует доказательства. Дальнейшие исследования с увеличением числа наблюдений и изучаемых этносов, возможно, позволят пролить свет на эти вопросы.

Приложение

Республика Адыгея [32]

Коренные жители Республики Адыгея, адыгейцы (адыги), – один из древнейших народов России, племена которых с исторических времен заселили Черноморское и Азовское побережье Северо-Западного Кавказа. В начале XIII в. адыги вошли в состав Золотой Орды. В 1864 г. закубанские адыги были включены в административно-политическую систему Российской империи. В настоящее время Рес-

публика Адыгея входит в состав Южного федерального округа России и географически со всех сторон окружена территорией Краснодарского края. Население республики составляет более 449 тыс. человек, из которых примерно 63,6 % – русские и 25,2 % – адыги (2015). Ведущими отраслями экономики адыгов являются сельское хозяйство и животноводство. Большинство адыгов – мусульмане-сунниты.



Географическое положение Республики Адыгея в Российской Федерации

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Ghosh S.K., Singh A.S., Mondal R. et al. Dysfunction of mitochondria due to environmental carcinogens in nasopharyngeal carcinoma in the ethnic group of Northeast Indian population. *Tumour Biol* 2014;35(7):6715–24. DOI: 10.1007/s13277-014-1897-x
- Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2017. Malignant neoplasms in Russia in 2015 (morbidity and mortality). Ed. by Kaprin A.D., Starinskii V.V., Petrova G.V. Moscow: MNIОI im. P.A. Gertsena – filial FGBU “NMIRTS” Minzdrava Rossii, 2017. (In Russ.).
- Tsao S., Tsang C., To K., Lo K. The role of Epstein–Barr virus in epithelial malignancies. *J Pathol* 2014;235(2):323–33. DOI: 10.1002/path.4448
- Galetsky S.A., Tsvetnov V.V., Land C.E. et al. Epstein–Barr-virus-associated gastric cancer in Russia. *Int J Cancer* 1997;73(6):786–9. DOI: 10.1002/(sici)1097-0215(19971210)73:6<786::aid-ijc2>3.0.co;2-z
- Crombie J.L., LaCasce A.S. Epstein Barr virus associated B-cell lymphomas and iatrogenic lymphoproliferative disorders. *Front Oncol* 2019;9:109. DOI: 10.3389/fonc.2019.00109
- 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
- Farrell P.J. Epstein–Barr virus strain variation. *Curr Top Microbiol Immunol* 2015;390(Pt. 1):45–69. DOI: 10.1007/978-3-319-22822-8_4
- Smith N.A., Baresel P.C., Jackson C.L. et al. Differences in the Epstein–Barr virus gp350 IgA antibody response are associated with increased risk for coinfection with a second strain of Epstein–Barr virus. *J Infect Dis* 2019;219(6):955–63. DOI: 10.1093/infdis/jiy601
- 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
- 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
- Ai J., Xie Z., Liu C. et al. Analysis of EBNA-1 and LMP-1 variants in diseases associated with EBV infection in Chinese children. *Virol J* 2012;9:13. DOI: 10.1186/1743-422X-9-13
- 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
- Pavlish O.A., Diduk S.V., Smirnova K.V. et al. Mutations of the Epstein–Barr virus LMP1 gene mutations in Russian patients with lymphoid pathology and healthy individuals. *Vopr Virusol* 2008;53(1):10–6.
- Walling D.M., Shebib N., Weaver S.C. et al. The molecular epidemiology and evolution of Epstein–Barr virus: sequence variation and genetic recombination in the latent membrane protein-1 gene. *J Infect Dis* 1999;179(4):763–74. DOI: 10.1086/314672
- Blake S.M., Eliopoulos A.G., Dawson C.W. et al. 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
- Wang D., Liebowitz D., Kieff E. An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell* 1985;43(3 Pt. 1):831–40. DOI: 10.1016/0092-8674(85)90256-9
- 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. DOI: 10.1073/pnas.95.20.11963
- Nitta T., Chiba A., Yamamoto N. et al. Lack of cytotoxic property in a variant of Epstein–Barr virus latent membrane protein-1 isolated from nasopharyngeal carcinoma. *Cell Signal* 2004;16(9):1071–81. DOI: 10.1016/j.cellsig.2004.03.001
- Blake S.M., Eliopoulos A.G., Dawson C.W. et al. 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
- Gantuz M., Lorenzetti M.A., Chabay P.A. et al. A novel recombinant variant of latent membrane protein 1 from Epstein Barr virus in Argentina denotes phylogeographical association. *PLoS One* 2017;12(3):e0174221. DOI: 10.1371/journal.pone.0174221
- Zhou X.G., Sandvej K., Li P.J. et al. Epstein–Barr virus gene polymorphisms in Chinese Hodgkin’s disease cases and healthy donors: identification of three distinct virus variants. *J Gen Virol* 2001;82(Pt. 5):1157–67. DOI: 10.1099/0022-1317-82-5-1157
- Saechan V., Mori A., Mitarnun W. et al. Analysis of LMP1 variants of EBV in Southern Thailand: evidence for strain-associated T-cell tropism and pathogenicity. *J Clin Virol* 2006;36(2):119–25. DOI: 10.1016/j.jcv.2006.01.018
- 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;3:65–74. DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-3-65-74
- Smirnova K.V., Senyuta N.B., Botezatu I.V. et al. Epstein–Barr virus in ethnic Tatars: infection and sequential variants of the LMP1 oncogene. *Advances in molecular oncology* 2018;3:65–74. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-3-65-74
- 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;47:987–95. (In Russ.).
- 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
- Contreras A., Nowzari H., Slots J. Herpesviruses in periodontal pocket and gingival tissue specimens. *Oral Microbiol Immunol* 2000;15(1):15–8. DOI: 10.1034/j.1399-302x.2000.150103.x
- 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):5452–5.
- Gurtsevitch V.E., Senyuta N.B., Ignatova A.V. et al. Epstein–Barr virus biomarkers for nasopharyngeal carcinoma in non-endemic regions. *J Gen Virol* 2017;98:2118–27. DOI: 10.1099/jgv.0.000889
- Abnet C.C., Qiao Y.L., Mark S.D. et al. Prospective study of tooth loss and incident esophageal and gastric cancers in China. *Cancer Causes Control* 2001;12(9):847–54. DOI: 10.1023/a:1012290009545
- Huang J., Roosaar A., Axell T. et al. A prospective cohort study on poor oral hygiene and pancreatic cancer risk. *Int J Cancer* 2016;138:340–7. DOI: 10.1002/ijc.29710
- Zanella L., Riquelme I., Buchegger K. et al. A reliable Epstein–Barr virus classification based on phylogenomic and population analyses. *Sci Rep* 2019;9(1):9829. DOI: 10.1038/s41598-019-45986-3

32. Шарце М.Г., Гладкевич Г.И., Эрлих В.Р. и др. Адыгея. Большая Российская энциклопедия. Доступно по: <https://bigenc.ru/geography/text/5595151>.

Shartse M.G., Gladkevich G.I., Erlich V.R. et al. Adygea. Great Russian Encyclopedia. Available at: <https://bigenc.ru/geography/text/5595151>.

Вклад авторов

К.В. Смирнова: организация исследования, анализ полученных результатов, редактирование статьи;
А.К. Лубенская: определение типов ВЭБ, амплификация LMP1;
Н.Б. Сеньюта: систематизация результатов исследования, анализ сиквенсов, определение вариантов LMP1;
Т.Е. Душенькина: сбор и обработка биологического материала;
В.Э. Гурцевич: идея и разработка дизайна исследования, оформление таблиц и рисунков, написание текста статьи.

Authors' contributions

K.V. Smirnova: organization of the study, analysis of the results obtained, article editing;
A.K. Lubenskaya: identification of EBV types, amplification of LMP1;
N.B. Senyuta: systematization of the study results, analysis of the EBV sequences, identification of LMP1 variants;
T.E. Dushenkina: collection and processing of biological material;
V.E. Gurtsevitch: the idea and design development of the study, the design of tables and figures, article writing.

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. Сеньюта / N.B. Senyuta: <https://orcid.org/0000-0001-8915-8274>
Т.Е. Душенькина / T.E. Dushenkina: <http://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. Это исследование было выполнено в рамках экспериментального государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации при координации ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Минздрава России.

Funding. This study was carried out as part of an experimental state task of the Ministry of Health of the Russian Federation under the coordination of the Center for Strategic Planning and Management of Medical and Biological Health Risks of the Ministry of Health of Russia.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Протокол исследования одобрен комитетом по этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics. The local ethics committee of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia approved the protocol of the study.

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

Статья поступила: 25.04.2022. **Принята к публикации:** 20.06.2022.

Article submitted: 25.04.2022. **Accepted for publication:** 20.06.2022.