

Лариса Сергеевна Яковлева¹, Наталья Борисовна Сенюта²,
Вера Николаевна Степина³, Елена Васильевна Гончарова⁴,
Лиана Ногаровна Щербак⁵, Самир Махаббат-оглы Джаббаров⁶,
Владимир Эдуардович Гурцевич⁷

ВИРУС ЭПШТЕЙНА—БАРР У БОЛЬНЫХ РАКОМ НОСОГЛОТКИ: ВАРИАНТЫ ГЕНА *LMP1*, ГУМОРАЛЬНЫЙ ОТВЕТ И КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ БОЛЕЗНИ

¹ Д. м. н., старший научный сотрудник, лаборатория вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)

² К. м. н., ведущий научный сотрудник, лаборатория вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)

³ Д. м. н., старший научный сотрудник, лаборатория вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)

⁴ К. м. н., научный сотрудник, лаборатория вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)

⁵ К. б. н., научный сотрудник, лаборатория вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)

⁶ Аспирант, отделение опухолей дыхательно-пищеварительных путей, НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)

⁷ Д. м. н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, заведующий, лаборатория вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, г. 24)

Адрес для переписки: 115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24, лаборатория вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза, ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН, Гурцевич Владимир Эдуардович;
e-mail: vladgurtsevitch@yahoo.com

Целью работы стало изучение полиморфизма (дивергентности) онкогена *LMP1* вируса Эпштейна—Барр у больных раком носоглотки и лиц контрольных групп (пациенты с другими опухолями полости рта, больные инфекционным мононуклеозом и доноры крови). В частности, представлялось важным выяснить, влияют ли варианты онкогена *LMP1*, обладающие различной степенью полиморфизма (дивергентности), на клинические проявления болезни и гуморальный ответ к антигенам вируса Эпштейна—Барр. Объектом исследования служили опухолевая ткань, кровь или смывы из полости рта больных раком носоглотки и пациентов с другими опухолями полости рта, а также образцы крови больных инфекционным мононуклеозом и доноров крови. Полученные с помощью полимеразной цепной реакции образцы С-концевой области гена *LMP1* (25 — от больных раком носоглотки, 14 — от пациентов с другими опухолями полости рта, 10 — от больных инфекционным мононуклеозом и 15 — от доноров крови), были подвергнуты секвенсному анализу. Плазма крови всех изучаемых лиц была протестирована на наличие антител классов IgG и IgA к капсидному и раннему антигенам вируса. Исследования показали, что у больных раком носоглотки и пациентов с другими опухолями полости рта (патологиями, ассоциированными и не ассоциированными с вирусом Эпштейна—Барр соответственно) одинаково часто встречались высоко дивергентные варианты онкогена *LMP1*. У больных инфекционным мононуклеозом и доноров крови высоко дивергентные варианты (за исключением у одного донора крови) отсутствовали. У больных раком носоглотки и пациентов с другими опухолями полости рта наличие вариантов *LMP1* с Сао-делецией, характеризующихся наиболее высокой туморогенной активностью по сравнению с другими вариантами *LMP1*, не коррелировало ни с более тяжелым проявлением болезни, ни с повышенными титрами вирус-специфических антител. Эти данные указывают на то, что высоко туморогенные варианты *LMP1* не влияют на течение опухолевого процесса. Впервые обнаружена повышенная заболеваемость раком носоглотки у представителей коренного населения Кавказа по сравнению с таковой у жителей центральной части России.

Ключевые слова: Вирус Эпштейна—Барр, рак носоглотки, латентный мембранный белок 1 (*LMP1*), секвенирование гена, полиморфизм *LMP1*.

Как известно, вирусом Эпштейна—Барр (ВЭБ), или лимфотропным вирусом герпеса человека 4-го типа, инфицировано более 90% населения земного шара. Являясь убиквитарным, этот вирус в то же время признан этиологическим фактором широкого спектра доброкачественных и злокачественных заболеваний. К их числу относят инфекционный мононуклеоз (ИМ), лимфому Беркитта (ЛБ), рак носоглотки (РНГ), лимфому Ходжкина (ЛХ), неходжкинские лимфомы (НХЛ) и ряд других [1]. Онкогенные потенции ВЭБ связаны с его способностью трансформировать клетки, что обусловлено функционированием 9 генов латентной инфекции вируса, кодирующих соответствующие белки [2]. Один из таких белков — латентный мембранный белок 1-го типа (*LMP1*), кодируемый одноименным геном (*LMP1*), играет чрезвычайно важную роль в патогенезе ассоциированных ВЭБ заболеваний, поскольку обладает свойствами онкобелка. *LMP1* способен трансформировать В-лимфоциты и фибробласты грызунов (*Rat-1*) *in vitro* [3; 2], а его введение бестимусным мышам приводит к возникновению у них опухолей [4; 5]. Присутствие *LMP1* необходимо и достаточно для осуществления трансформации В-клеток человека [6]. Он активирует многие сигнальные пути, включая фосфатидилинозитол-3-киназу (PI3K)-Akt, NF-κB и др. [7; 8]. Показано, что отдельные мутации гена *LMP1* влияют на его биологические свойства, что, вероятно, играет важную роль в этиопатогенезе вызываемых им заболеваний. Наиболее критичны мутации С-терминального цитоплазматического домена, которые влияют на иммуногенность и время полужизни *LMP1* и усиливают его трансформирующий потенциал.

Молекулярный анализ образцов гена *LMP1*, выделенных в различных географических регионах, позволил выявить его полиморфизм, часто отражающий неодинаковую биологическую активность гена. Например, вариант гена *LMP1*, «Сао», содержащий делецию 30 пар нуклеотидов (п. н.) в С-концевой области и кодирующий соответствующий делецированный вариант белка *LMP1*Сао, обладает существенно более выраженным трансформирующим потенциалом *in vitro* [9]. Он оказался и более туморогенным для мышей с выраженным комбинированным иммунодефицитом (SCID) [10].

На основе сиквенсного анализа upstream и downstream участков С-концевой области гена *LMP1* D. M. Walling и соавт. выделили 22 сиквенсных варианта/генотипа гена, которые затем были разделены на 4 группы: *LMP1*B95.8/A, *LMP1*B95.8/B, *LMP1*B95.8/C и *LMP1*B95.8/D [11]. R. H. Edwards и соавт. из лаборатории N. Raab-Traub описали 6 вариантов гена, обозначение которых: China 1, China 2, Mediterranean + (Med +), Mediterranean — (Med —), North Carolina (NC) и Alaskan — отражает их географическое происхождение [12]. Каждый из этих вариантов характеризуется свойственным ему сочетанием аминокислотных (а. к.) замен, делеций, вставок и т. д., т. е. определенным полиморфизмом, по сравнению с *LMP1*B95.8, который используется в качестве стандартного (прототипного) варианта.

При этом варианты с незначительным полиморфизмом (3—4 а. к. замены) по отношению к *LMP1*B95.8 (например, *LMP1*B95.8/A) относят к низко дивергентным, а высоко полиморфные, т. е. варианты с большим числом а. к. замен, делеций, вставок — к высоко дивергентным. К числу последних следует причислить указанные выше 6 вариантов гена *LMP1* по классификации R. H. Edwards и соавт. [12]. Важно отметить, что выявляемые структурные изменения в гене *LMP1* часто располагаются в местах, влияющих на его транскрипцию, трансляцию или даже функцию.

Молекулярный механизм ассоциированного с ВЭБ канцерогенеза стал также предметом углубленного изучения. Было показано, что *LMP1*, являясь основным онкогеном ВЭБ, вносит весомый вклад в высокий метастатический потенциал РНГ [13; 14]. В частности, было показано, что *LMP1* в опухолевых клетках РНГ стимулирует экспрессию Snail и эпителиально-мезенхимальный переход в метастатических вариантах рака. Более того, обнаружено, что экспрессия Snail позитивно коррелирует с процессом метастазирования, но демонстрирует независимую обратную корреляцию с экспрессией E-кадгерина [15]. Полученные в последние годы данные позволили предположить у больных РНГ существование раковых эмбриональных клеток (CSC) и предшественников раковых клеток (CPC), хотя четкие параметры обоих типов клеток пока отсутствуют. Поиски S. Kondo и соавт. [16] внесли некоторую ясность в этот вопрос. В своих экспериментах они показали, что ген *LMP1* в эпителиальных клетках может индуцировать скорее CPC-, чем CSC-подобный фенотип, и предположили, что индуцированные *LMP1* фенотипические изменения вносят вклад в развитие РНГ.

С учетом тесной связи ряда новообразований человека с ВЭБ, предполагающей этиологическую роль вируса в их развитии, было проведено немало исследований, изучающих возможность использования вирусных маркеров в качестве диагностических и прогностических при этих заболеваниях. Иммунологические исследования РНГ в эндемичных для этого заболевания регионах показали, что высокие титры антител к антигенам ВЭБ часто могли быть обнаружены задолго до обнаружения опухоли, т. е. имеют высокую диагностическую ценность. Они также отражают клинические проявления болезни, такие, как ремиссия и рецидив, и, таким образом, могут быть использованы в качестве дополнительного метода наблюдения за больными [17—19]. Данные об ассоциации РНГ с ВЭБ в неэндемичных регионах, представленные лишь в единичных публикациях [20; 21], также подтверждают высокую значимость вирусных маркеров для диагностики и оценки клинического статуса больных РНГ [22].

Данная работа продолжает изучение особенностей ассоциированного с ВЭБ канцерогенеза у больных РНГ в неэндемичном регионе России и направлена на поиски корреляции между степенью дивергентности *LMP1* у этих больных, с одной стороны, гуморальным ответом к ВЭБ и клиническими проявлениями болезни, с другой.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили образцы опухолевой ткани, крови или смывов из ротоглотки больных (РНГ)

и пациентов с другими опухолями полости рта (ДОПР), а также лимфоциты периферической крови больных ИМ и доноров крови (ДК). Больные РНГ и пациенты с ДОПР вошли в исследование в результате случайной выборки. Средний возраст больных в обеих группах составил 50,1 и 54,1 года соответственно. В группе больных РНГ и пациентов с ДОПР большинство составляли мужчины — 62,5 и 85,7% соответственно. Больные обеих групп по этнической принадлежности были подразделены на жителей Кавказа и жителей Центральной России. Из собранного биологического материала экстрагировали ДНК, которую использовали для амплификации (с помощью прямой полимеразной цепной реакции) С-концевой области гена *LMP1* ВЭБ. На следующем этапе полученные образцы гена больных и здоровых лиц были подвергнуты сиквенсному анализу: 24 образца — от больных РНГ, а в качестве контроля 14 образцов — от пациентов с ДОПР, 10 — от больных ИМ и 15 — от ДК. Секвенирование *LMP1* проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM BigDye Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3100-Avant. Обработку данных секвенирования проводили с помощью программ Chromas (DNA for Windows) и Vector NTI. Классификацию полученных образцов *LMP1* осуществляли согласно критериям, предложенным R. H. Edwards и соавт. [12], K. Sandvej и соавт. и D. M. Walling и соавт. [11]. Кроме того, в каждом образце плазмы крови больных и здоровых лиц определяли антитела классов IgG и IgA к капсидному (ВКА) и раннему (РА) антигенам ВЭБ. Титры вирус-специфических антител определяли с помощью реакции непрямой иммунофлюоресценции (ИФ), условия постановки которой и учет получаемых результатов подробно описаны ранее [20].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты сравнения последовательностей С-концевой области вариантов *LMP1* у больных РНГ, ИМ, пациентов с ДОПР и ДК представлены в табл. 1. Видно, что образцы *LMP1*, соответствующие прототипному варианту LMP1B95.8 либо низко дивергентному варианту LMP1B95.8A (оба с невысоким трансформирующим потенциалом), значительно чаще встречаются в группах ДК (у 12 из 15; 80%) и у больных ИМ (у 5 из 10; 50%) — при доброкачественных заболеваниях, завершающихся, как

правило, самовыздоровлением. У больных РНГ и пациентов с ДОПР низко дивергентные варианты обнаружены в 16,7% (у 4 из 24) и 14,2% (у 2 из 14) случаев соответственно. Для них более характерными оказались высоко дивергентные варианты LMP1, т. е. China1, Med+, Med- и NC. Эти варианты в совокупности составили для больных РНГ 83,3% (у 20 из 24) и для пациентов с ДОПР — 85,7% (у 12 из 14). Наличие высоко дивергентных вариантов *LMP1* у больных РНГ и пациентов с ДОПР по сравнению с вариантами *LMP1* у больных с доброкачественным лимфо-пролиферативным заболеванием (ИМ) и ДК нами отмечено впервые.

Среди высоко дивергентных вариантов *LMP1* особый интерес представляют варианты с так называемой Сао-делецией (10 а. к.), т. е. варианты China1 и Med+, характеризующиеся особенно высокой туморогенной активностью. У 10 больных ИМ ни один из этих вариантов обнаружен не был, и лишь один (China1) из 15 (6,7%) выявлен у ДК. У больных РНГ и пациентов с ДОПР Сао-варианты выявлены в 54,2% (у 13 из 24) и 50% (у 7 из 14) случаев соответственно. Эти данные еще раз подтвердили, что у онкологических больных, т. е. больных РНГ и пациентов с ДОПР, доминируют варианты *LMP1* с высокой туморогенной активностью, которые практически отсутствуют у больных с доброкачественными новообразованиями (ИМ) и у здоровых лиц (ДК).

Примерно одинаковая частота обнаружения высоко дивергентных вариантов *LMP1* у больных РНГ, этиологическая роль ВЭБ для которого доказана, и пациентов с ДОПР, этиологически не связанных с ВЭБ, позволяет задать целый ряд вопросов, на которые пока нет ответов. Можно, однако, предположить, что в активно размножающихся клетках любой злокачественной опухоли геном вируса подвергается существенным изменениям: происходят накопление мутаций и формирование высоко туморогенных генотипов *LMP1*. При этом одни и те же варианты вируса в одних случаях (генетическая предрасположенность, действие канцерогенов и иных факторов) становятся этиологическими факторами РНГ, а в других (у пациентов с ДОПР) в отсутствие предрасполагающих факторов остаются вирусами-«пассажирами».

Чтобы выяснить, существует ли корреляция между типом мутаций в *LMP1* и клиническими проявлениями болезни, а также гуморальным ответом к антигенам ВЭБ,

Таблица 1
Генотипы *LMP1* ВЭБ у больных РНГ и лиц контрольных групп

Группы больных и здоровых лиц	Число изученных образцов <i>LMP1</i>	Варианты <i>LMP1</i> , абс. число (%)					
		B95.8+B95.8/A	China1	China2	Med+	Med-	NC
РНГ	24	4 (16,7)	3 (12,5)	-	10 (41,7)	5 (20,8)	2 (8,3)
ДОПР	14	2 (14,2)	6 (42,9)	-	1 (7,3)	2 (14,2)	3 (21,4)
ИМ	10	5 (5)	-	-	-	2 (2)	1 (1)
ДК	15	12 (80)	1 (6,7)	-	-	-	2 (13,3)

Таблица 2

Варианты LMP1, этническая принадлежность и титры антител к ВЭБ у больных РНГ^а

№ п/п	Код больного	Пол	Возраст, годы	Этническая принадлежность ^б	Варианты LMP1	Титры антител к ВЭБ ^в			
						IgG		IgA	
						ВКА	РА	ВКА	РА
Больные РНГ, имеющие Сао-делецию в образцах LMP1									
1	Lg 116.1	Ж	40	Житель Центра России	China1	640	320	80	–
2	Lg 117.1	М	46	Житель Кавказа	Med+	640	160	80	–
3	5.3	М	54	Житель Центра России	Med+	640	80	160	–
4	7.1	М	68	Житель Кавказа	Med+	1280	320	160	80
5	8.1	М	34	Житель Кавказа	China1	640	160	20	20
6	16.1	М	52	Житель Кавказа	China1	1280	320	160	160
7	27.1	Ж	68	Житель Кавказа	Med+	640	80	40	40
8	29.1	М	47	Житель Кавказа	Med+	1280	80	160	80
9	33.1	М	59	Житель Кавказа	Med+	1280	640	320	320
10	42.1	М	58	Житель Кавказа	Med+	2560	1280	640	320
11	49.2	Ж	50	Житель Центра России	Med+	1280	320	320	160
12	28.1	М	67	Житель Кавказа	Med+	1280	320	160	80
13	39.2	Ж	30	Житель Центра России	Med+	80	10 ^г	10–	10–
Средние геометрические значения титров антител						835,5	157,3	92,3	63,5
Больные РНГ, не имеющие в образцах LMP1 Сао-делецию									
14	Lg115.1	Ж	49	Житель Центра России	B95.8/A	1280	320	320	–
15	Lg127.2	Ж	54	Житель Центра России	B95.8/A	320	40	80	–
16	11.2	М	68	Житель Центра России	Med–	1280	320	160	160
17	16.3	М	52	Житель Кавказа	B95.8/A	1280	320	160	160
18	37.1	Ж	51	Житель Центра России	Med–	1280	640	40	160
19	12.2	Ж	46	Житель Кавказа	Med–	1280	320	320	160
20	47.2	М	50	Житель Центра России	B95.8/A	1280	320	320	320
21	42.2	М	35	Житель Кавказа	Med–	2560	1280	640	320
22	39.1	Ж	30	Житель Центра России	Med–	80	10–	10–	10–
23	51.2	М	52	Житель Центра России	NC	80	10	10	10–
24	20.2	М	42	Житель Центра России	NC	640	320	160	160
Средние геометрические значения титров антител						681,6	138,2	88,9	60,4

^а В графе «Код больного» после указанного кода цифрами 1, 2 и 3 обозначены источники исследуемого материала: 1 — опухоль; 2 — кровь; 3 — клетки слюны из полости рта.

^б Этническую принадлежность узнавали со слов больного.

^в Титры антител к ВЭБ — последние разведения сыворотки/плазмы, в которых методом непрямой иммунофлюоресценции обнаружены антитела к соответствующему антигену вируса.

^г В 10-кратном разведении сыворотки/плазмы вирус-специфические антитела не обнаружены.

Таблица 3

Варианты *LMP1*, этническая принадлежность и титры антител к ВЭБ у больных ДОПР^а

№ п/п	Код больного	Пол	Возраст, годы	Этническая принадлежность ^б	Варианты <i>LMP1</i>	Титры антител к ВЭБ ^в			
						IgG		IgA	
						ВКА	РА	ВКА	РА
Больные ДОПР, имеющие в образцах <i>LMP1</i> Сао-делецию									
1	1.1	М	53	Житель Центра России	Med+	80	10– ^г	10–	–
2	18.2	М	57	Житель Центра России	China1	160	10–	10–	10–
3	53.2	М	54	Житель Центра России	China1	40	10–	10–	10–
4	55.1	М	48	Житель Центра России	China1	20	10–	10–	10–
5	56.1	Ж	63	Житель Центра России	China1	80	10–	10–	10–
6	57.2	М	53	Житель Центра России	China1	80	10–	10–	10–
7	58.2	М	52	Житель Центра России	China1	10–	10–	10–	10–
Средние геометрические значения титров антител						35,1	–	–	–
Больные ДОПР, не имеющие в образцах <i>LMP1</i> Сао-делецию									
8	25.1	М	52	Житель Центра России	B95.8/A	10–	10–	10–	10–
9	35.2	М	61	Житель Кавказа	Med-	80	40	10–	10–
10	58.1	М	60	Житель Центра России	NC	10–	10–	10–	10–
11	36.2	М	47	Житель Центра России	Med–	40	10–	10–	10–
12	52.1	М	50	Житель Кавказа	NC	80	20	10–	10–
13	10.1	Ж	55	Житель Центра России	NC	160	10–	10–	10–
14	19.2	М	53	Житель Центра России	B95.8/A	80	10–	10–	10–
Средние геометрические значения титров антител						22,9	2,6	–	–

^а В графе «Код больного» после указанного кода цифрами 1, 2 и 3 обозначены источники исследуемого материала: 1 — опухоль; 2 — кровь; 3 — клетки смыва из полости рта.

^б Этническую принадлежность узнавали со слов больного.

^в Титры антител к ВЭБ — последние разведения сыворотки/плазмы, в которых методом непрямой иммунофлюоресценции обнаружены антитела к соответствующим антигенам вируса.

^г В 10-кратном разведении сыворотки/плазмы вирус-специфические антитела не обнаружены.

каждую из групп больных РНГ и ДОПР мы разбили на 2 подгруппы в зависимости от наличия или отсутствия в тестируемом материале вариантов *LMP1* с Сао-мутацией (табл. 2, 3). Последняя, как известно, обеспечивает вирусу выраженный онкогенный потенциал.

Результаты исследования показали, что у больных РНГ с вариантами *LMP1*Сао+ (China1 или Med+) клинические проявления болезни не были более тяжелыми,

чем в группе больных, у которых Сао-делеция в *LMP1* отсутствовала: в обеих группах доминировали больные с 3—4-й стадиями болезни и со сходными показателями TNM (данные не представлены). Эти наблюдения, скорее всего, свидетельствуют о том, что развитие данной ВЭБ-ассоциированной опухоли (РНГ) не зависит от типа и степени дивергентности вариантов *LMP1*, персистирующих в организме больного. По-видимому, клиническая

характеристика болезни определяется комплексом других, не связанных с вирусом факторов.

Иммунофлуоресцентное изучение сывороток крови для выявления вирус-специфических антител показало, что средние геометрические значения (СГЗ) титров антител классов IgG к ВКА и РА у больных РНГ были в десятки раз выше, чем у пациентов с ДОПР ($p < 0,001$); это подтверждает вирусную природу РНГ. Антитела класса IgA к ВКА и РА, наличие которых особенно характерно для больных РНГ, у пациентов с ДОПР полностью отсутствовали. В группе больных РНГ с LMP1Caо+ СГЗ титров антител, хотя и были незначительно выше, чем у больных РНГ с LMP1Caо-, различия эти были статистически незначимыми (см. табл. 2).

У пациентов с ДОПР наличие или отсутствие Сао-делеции в амплифицированных образцах LMP1 также не отражалось ни на клинических проявлениях болезни, ни на титрах антител к антигенам вируса (см. табл. 3). Значения последних в обеих группах пациентов с ДОПР были чрезвычайно низкими, что характерно для заболеваний, не ассоциированных с ВЭБ.

Как уже было упомянуто ранее, для вариантов LMP1 характерен высокий уровень полиморфизма (дивергентности). При этом, по данным большинства авторов, определенный генетический вариант LMP1 не связан с конкретным типом ВЭБ-ассоциированной патологии, но достаточно прочно сцеплен с географическим регионом и/или этнической принадлежностью популяции [24]. В наших исследованиях мы впервые обнаружили, что РНГ с высоко туморогенными вариантами LMP1Caо+ (China1 и Med+) чаще встречаются у представителей народов Кавказа — 69,2% (у 9 из 13; см. табл. 2). Те же высоко туморогенные варианты LMP1Caо+ у представителей центральной части России выявляются исключительно в группе пациентов с ДОПР — 100% (у 7 из 7; см. табл. 3).

Следует отметить, что в группах больных РНГ и пациентов с ДОПР варианты LMP1, не обладающие Сао-мутацией (B95.5, B95.8/A, Med-, NC), доминировали среди россиян из центральной части страны (72,7 и 71,4% соответственно). Полученные данные, по-видимому, свидетельствуют о генетической предрасположенности народов Кавказа к заболеванию РНГ, особенно ассоциированных с Сао-делецированными вариантами LMP1 ВЭБ. Нельзя исключить, однако, что повышенная заболеваемость РНГ у этих народов может быть также обусловлена воздействием определенных факторов окружающей среды, местными вредными привычками и т. д. Высказанные предположения следует подтвердить данными эпидемиологического наблюдения и более высокой репрезентативностью клинического материала в вирусологических и молекулярно-биологических исследованиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В наших исследованиях, проведенных в одном из неэндемичных по РНГ регионов мира — России, впервые показано, что в биологическом материале, полученном у больных со злокачественными новообразованиями полости рта (РНГ или ДОПР), выявлены высоко дивергентные варианты LMP1 ВЭБ. Чем обусловлено наличие этих вариантов LMP1 у больных ДОПР — патологий, в отличие

от РНГ, не ассоциированных с ВЭБ, остается неясным и является предметом дальнейшего изучения.

Кроме того, впервые показано, что наличие у больных РНГ и пациентов с ДОПР вариантов LMP1Caо+, обладающих повышенной туморогенностью, не коррелирует с более тяжелыми клиническими проявлениями болезни по сравнению с таковыми в группе больных, у которых Сао-делеция в LMP1 не обнаружена. Наличие у больных LMP1Caо+ не сопровождалось и повышенными титрами вирус-специфических антител, что в целом свидетельствует об отсутствии влияния LMP1 на опухолевый процесс.

Заслуживает внимания повышенная заболеваемость РНГ у представителей народов Кавказа, несмотря на одинаковую степень распространенности среди них и жителей центральной части России высоко дивергентных вариантов LMP1, в том числе с Сао-делецией.

Работа поддержана грантом РФФИ (проект № 10-04-00060а).

Авторы выражают благодарность А. В. Лихтенштейну за критическое обсуждение и полезные советы при написании рукописи и Н. А. Пироговой за консультацию при статистической обработке данных.

ЛИТЕРАТУРА

- Young L. S., Rickinson A. B. Epstein—Barr virus: 40 years on // Nat. Rev. Cancer. — 2004. — Vol. 4. — P. 757—768.
- Young L. S., Dawson C. W., Eliopoulos A. G. The expression and function of Epstein—Barr virus encoded latent genes // Mol. Pathol. — 2000. — Vol. 53. — P. 238—247.
- Moorthy R. K., Thorley-Lawson D. A. All three domains of the Epstein—Barr virus-encoded latent membrane protein LMP-1 are required for transformation of rat-1 fibroblasts // J. Virol. — 1993. — Vol. 67. — P. 1638—1646.
- Expression of the Epstein—Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice / Kulwichit W., Edwards R. H., Davenport E. M., Baskar J. F., Godfrey V., Raab-Traub N. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. — 1998. — Vol. 95. — P. 11 963—11 968.
- Sandvej K., Munch M., Hamilton-Dutoit S. Mutations in the Epstein—Barr virus latent membrane protein-1 (BNLF-1) gene in spontaneous lymphoblastoid cell lines: effect on in vitro transformation associated parameters and tumorigenicity in SCID and nude mice // Clin. Mol. Pathol. — 1996. — Vol. 49. — P. M290—M297.
- Latent membrane protein 1 is critical for efficient growth transformation of human B cells by Epstein—Barr virus / Dirmeier U., Neuhi-erl B., Kilger E., Reischbach G., Sandberg M. L., Hammerschmidt W. // Cancer Res. — 2003. — Vol. 63. — P. 2982—2989.
- Mainou B. A., Raab-Traub N. LMP1 strain variants: biological and molecular properties / Mainou B. A., Raab-Traub N. // J. Virol. — 2006. — Vol. 80. — P. 6458—6468.
- Epstein—Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway to promote cell survival and induce actin filament remodeling / Dawson C. W., Tramountanis G., Eliopoulos A. G., Young L. S. // J. Biol. Chem. — 2003. — Vol. 278. — P. 3694—3704.
- Isolation and sequencing of the Epstein—Barr virus BNLF-1 gene (LMP1) from a Chinese nasopharyngeal carcinoma / Hu L. F., Zabarovskiy E. R., Chen F., Cao S. L., Ernberg I., Klein G., Winberg G. // J. Gen. Virol. — 1991. — Vol. 72 (Pt 10). — P. 2399—2409.
- Sandvej K., Munch M., Hamilton-Dutoit S. Mutations in the Epstein—Barr virus latent membrane protein-1 (BNLF-1) gene in spontaneous lymphoblastoid cell lines: effect on in vitro transformation associated parameters and tumorigenicity in SCID and nude mice // Clin. Mol. Pathol. — 1996. — Vol. 49. — P. M290—M297.
- The molecular epidemiology and evolution of Epstein—Barr virus: sequence variation and genetic recombination in the latent membrane protein-1 gene / Walling D. M., Shebib N., Weaver S. C., Nichols C. M.,

Flaitz C. M., Webster-Cyriaque J. // *J. Infect. Dis.* — 1999. — Vol. 179. — P. 763—774.

12. Edwards R. H., Seillier-Moisewitsch F., Raab-Traub N. Signature amino acid changes in latent membrane protein 1 distinguish Epstein—Barr virus strains // *Virology.* — 1999. — Vol. 261. — P. 79—95.

13. LMP1 expression is positively associated with metastasis of nasopharyngeal carcinoma: evidence from a meta-analysis / Zhao Y., Wang Y., Zeng S., Hu X. // *J. Clin. Pathol.* — 2012. — Vol. 65. — P. 41—45.

14. Current understanding and management of nasopharyngeal carcinoma / Yoshizaki T., Ito M., Muroso S., Wakisaka N., Kondo S., Endo K. // *Auris Nasus Larynx.* — 2011. — Vol. 14. — P. 171—175.

15. Epstein—Barr Virus latent membrane protein 1 induces Snail and epithelial-mesenchymal transition in metastatic nasopharyngeal carcinoma / Horikawa T., Yoshizaki T., Kondo S., Furukawa M., Kaizaki Y., Pagano J. S. // *Br. J. Cancer.* — 2011. — Vol. 104. — P. 1160—1167.

16. Epstein—Barr Virus Latent Membrane Protein 1 Induces Cancer Stem/Progenitor-Like Cells in Nasopharyngeal Epithelial cell lines / Kondo S., Wakisawa N., Muramatsu M., Zen Y., Endo K., Muroso S., Sugimoto H., Yamaoka S., Pagano J. S., Yoshizaki T. // *J. Virol.* — 2011. — Vol. 85, N 21. — P. 11 255—11 264.

17. Detection of Stage I nasopharyngeal carcinoma by serologic screening and clinical examination / Ji M. F., Yu Y. L., Cheng W. M., Zong Y. S., Ng P. S., Chua D. T., Ng M. H. // *Chin. J. Cancer.* — 2011. — Vol. 30. — P. 120—123.

18. Diagnostic value of Epstein—Barr virus capsid antigen-IgA in nasopharyngeal carcinoma: a meta-analysis / Li S., Deng Y., Li X., Chen Q. P., Liao X. C., Qin X. // *Chin. Med. J. (Engl.).* — 2010. — Vol. 123. — P. 1201—1205.

19. Combined determination of Epstein—Barr virus-related antibodies and antigens for diagnosis of nasopharyngeal carcinoma / Luo Y. L.,

Ou G. P., Chi P. D., Liang Y. N., Liu Y. H., Huang M. Y. // *Ai. Zheng.* — 2009. — Vol. 28. — P. 76—78.

20. Epstein—Barr virus detection in nasopharyngeal carcinoma: implications in a low-risk area / Breda E., Catarino R. J., Azevedo I., Lobao M., Monteiro E., Medeiros R. // *Braz. J. Otorhinolaryngol.* — 2010. — Vol. 76. — P. 310—315.

21. Epstein—Barr virus serology in nasopharyngeal carcinoma patients in the USSR and Cuba, and its value for differential diagnosis of the disease / Gurtsevitch V., Ruiz R., Stepina V., Plachov I., Le Riverend E., Glazkova T., Lavoue M. F., Paches A., Aliev B., Mazurenko N. // *Int. J. Cancer.* — 1986. — Vol. 37. — P. 375—381.

22. Гуморальный иммунный ответ к вирусу Эпштейна—Барр в диагностике рака носоглотки (Обзор литературы и 30-летний опыт собственных исследований) / Гурцевич В. Э., Степина В. Н., Сенюта Н. Б., Гончарова Е. В., Щербак Л. Н., Душенькина Т. Е., Репкина И. А., Белоусова Н. В., Кондратьева Т. Т., Алиева С. Б., Ахундов А. А., Матякин Е. Г., Поддубный Б. К., Пробатова Н. А., Пачес А. И. // *Вестн. РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН.* — 2011. — Т. 22., № 2. — С. 20—29.

23. Sequence analysis of the Epstein—Barr virus (EBV) latent membrane protein-1 gene and promoter region: identification of four variants among wild-type EBV isolates / Sandvej K., Gratama J. W., Munch M., Zhou X. G., Bolhuis R. L., Andresen B. S., Gregersen N., Hamilton-Dutoit S. // *Blood.* — 1997. — Vol. 90. — P. 323—330.

24. Epstein—Barr virus strains defined by the latent membrane protein 1 sequence characterize Thai ethnic groups / Saechan V., Settheetham-Ishida W., Kimura R., Tiwawech D., Mitarnun W., Ishida Y. // *J. Gen. Virol.* — 2010. — Vol. 91. — P. 2054—2061.

Поступила 03.02.2012

Larisa Sergeyevna Yakovleva¹, Natalya Borisovna Senyuta²,
Vera Nikolayevna Stepina³, Elena Vasilievna Goncharova⁴,
Liana Nodarovna Scherbak⁵, Samir Makhabbatogly Jabbarov⁶,
Vladimir Eduardovich Gurtsevich⁷

**EPSTEIN—BARR VIRUS IN PATIENTS WITH NASOPHARYNGEAL
CARCINOMA: LMP1 VARIANTS, ANTIBODY RESPONSE
AND CLINICAL MANIFESTATIONS**

¹ MD, PhD, DSc, Senior Researcher, Viral Carcinogenesis Laboratory, Carcinogenesis Research Institute,
N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

² MD, PhD, Leading Researcher, Viral Carcinogenesis Laboratory, Carcinogenesis Research Institute,
N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

³ MD, PhD, DSc, Senior Researcher, Viral Carcinogenesis Laboratory, Carcinogenesis Research Institute,
N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

⁴ MD, PhD, Researcher, Viral Carcinogenesis Laboratory, Carcinogenesis Research Institute,
N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

⁵ MSc, PhD, Researcher, Viral Carcinogenesis Laboratory, Carcinogenesis Research Institute,
N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

⁶ MD, Postgraduate Student, Respiratory and Digestive Tract Tumor Department, Clinical Oncology Research Institute,
N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

⁷ MD, PhD, DSc, Professor, RF Honored Scientist, Head, Viral Carcinogenesis Laboratory, Carcinogenesis Research Institute,
N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

Address for correspondence: Gurtsevich Vladimir Eduardovich, Viral Carcinogenesis Laboratory,
Carcinogenesis Research Institute, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, RAMS, 24, Kashirskoye sh.,
Moscow, RF, 115478; e-mail: vladgurtsevich@yahoo.com

The purpose of this study was to analyze polymorphism (divergence) of Epstein—Barr virus *LMP1* oncogene in patients with nasopharyngeal carcinoma and control patients with other oral tumors, infectious mononucleosis or blood donors. In particular it was important to clarify whether *LMP1* variants with various degrees of polymorphism (divergence) may influence clinical manifestations of disease and antibody response to Epstein—Barr virus antigens. We analyzed tumor tissue, blood or oral swab samples in nasopharyngeal cancer patients and those with other oral tumors, infectious mononucleosis and healthy blood donors. Samples of the *LMP1* C-terminal regions obtained by PCR (25 from nasopharyngeal cancer patients, 14 from patients with different oral tumors, 10 from patients with infectious mononucleosis and 15 from blood donors) were subjected to sequence analysis. Blood plasma from all individuals investigated was tested for IgG and IgA antibodies to capsid and early virus antigens. It was found for the first time that *LMP1* highly divergent variants were seen at an equal rate in patients with nasopharyngeal carcinoma and other oral tumors, i. e. tumors associated and not associated with Epstein—Barr virus, respectively. None of the patients with infectious mononucleosis or blood donors (except one) had highly divergent variants. In patients with nasopharyngeal carcinoma or other oral tumors the presence of *LMP1* variants with Cao deletion (demonstrating higher tumorigenic activity as compared with other *LMP1* variants) showed no correlation with either more advanced disease or elevated virus-specific antibody titers. These findings suggest that highly tumorigenic *LMP1* variants have no effect on neoplastic disease course. We were also the first to demonstrate that nasopharyngeal carcinoma incidence was higher in natives of the Caucasus as compared with inhabitants of Central Russia.

Key words: Epstein—Barr virus, nasopharyngeal carcinoma, latent membrane protein 1 (*LMP1*), gene sequencing, *LMP1* polymorphism.