

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Кириянов С.А.¹, Левина Т.А.¹, Поляков А.П.², Ребрикова И.В.², Мурашко Д.А.³,
Коноплева М.В.¹, Семенов Т.А.¹, Сулов А.П.¹

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНОМНОЙ ДНК ВИРУСА ЭПШТЕЙНА–БАРР В ТКАНЯХ РАКА СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА РОССИЙСКИХ ПАЦИЕНТОВ

¹ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия;

²Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 125284, г. Москва, Россия;

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Минздрава России, 117997, г. Москва, Россия

Введение. Плоскоклеточная карцинома слизистой оболочки полости рта – одно из наиболее распространённых и агрессивных злокачественных новообразований полости рта. Согласно недавним исследованиям, инфицирование вирусом папилломы человека (ВПЧ) является дополнительным фактором риска развития плоскоклеточного рака полости рта, тогда как роль вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ) остается невыясненной. Данные об ассоциации обоих онковирусов с плоскоклеточным раком полости рта довольно противоречивы и существенно варьируют в зависимости от географических регионов и расовой принадлежности. **Цель:** выяснение распространённости ВПЧ и ВЭБ в образцах рака слизистой оболочки ротовой полости пациентов Московского региона России. **Материал и методы.** Исследованы фрагменты свежемороженых тканей злокачественных опухолей ротовой полости от 11 пациентов. Экстрагированную ДНК проверяли на наличие вирусных геномов количественной ПЦР-амплификацией с использованием маркеров, специфичных для ВЭБ и высококанцерогенных типов ВПЧ, с последующим секвенированием. **Результаты.** ВПЧ не выявлен ни в одном из протестированных образцов, тогда как ВЭБ обнаружился в 7 (70,0%) из 10 случаев. Наличие ВЭБ-инфекции и вирусную нагрузку в образцах опухолей определяли методом количественной ПЦР-амплификации ВЭБ-специфичных мишеней: BamHI-W, EBNA1 и С-концевой фрагмент гена LMP1. Секвенированием LMP1-положительных ПЦР-продуктов в большинстве образцов (5/6) выявлены варианты с Cao-делецией в гене LMP1, характеризующиеся повышенным трансформирующим потенциалом. **Заключение.** Высокая частота вируса в проанализированных образцах позволяет предположить ВЭБ-ассоциированную патологию, хотя обнаруженные LMP1-варианты ВЭБ не обязательно связаны с развитием рака полости рта. Для определения потенциальной роли ВЭБ как инфицирующего агента в патогенезе рака слизистой оболочки полости рта необходимы дальнейшие исследования.

Ключевые слова: рак слизистой оболочки полости рта; вирус Эпштейна–Барр; вирус папилломы человека; BamHI-W; EBNA1; LMP1.

Для цитирования: Кириянов С.А., Левина Т.А., Поляков А.П., Ребрикова И.В., Мурашко Д.А., Коноплева М.В., Семенов Т.А., Сулов А.П. Выявление геномной ДНК вируса Эпштейна–Барр в тканях рака слизистой оболочки полости рта российских пациентов. *Вопросы вирусологии.* 2019; 64(3):112-117.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-3-112-117>

Kiryayov S.A.¹, Levina T.A.¹, Polyakov A.P.², Rebrikova I.V.², Murashko D.A.³, Konopleva M.V.¹,
Semenenko T.A.¹, Suslov A.P.¹

DETECTION OF EPSTEIN-BARR VIRUS GENOME IN ORAL CAVITY SQUAMOUS CELL CARCINOMA SAMPLES OF RUSSIAN PATIENTS

¹N.F. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, 123098, Russian Federation;

²P.A. Herten Moscow Oncology Research Center, Moscow, 125284, Russian Federation;

³Federal Scientific and Clinical Centre of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev, Moscow, 117997, Russian Federation

Introduction. Oral cavity squamous cell carcinoma (OC-SCC) is the most common and aggressive malignancy of the oral cavity. Recent studies have revealed infections with human papilloma virus (HPV) as an additional risk factor for oral squamous cell carcinoma development, while distinguished role of Epstein-Barr virus (EBV) remains still uncertain. However, the evidence for association between virus infection and risk of oral squamous cell carcinoma is controversially and varies significantly by geographic regions and race.

Purpose. The aim of the present study was to elucidate the prevalence of HPV and EBV in OC-SCC samples of Russian patients from Moscow region. **Material and methods.** We investigated fresh-frozen tumor tissue fragments obtained from 11 patients with OC-SCC. DNA was extracted and the viral genome was examined by quantitative PCR assays with high-risk type-specific HPV and EBV specific markers followed by sequencing-based analysis. **Results.** No HPV infection in analyzed OC-SCC samples was observed, while EBV was identified in 70.0% (7/10) of patients. Further based on Q-PCR amplification of the EBV targets including BamHI-W, EBNA1 and C-terminal fragment of LMP1 gene, EBV infection and measurement of virus load in the tumor samples was assessed. Sequencing LMP1-positive products revealed that the most samples (5/6) contained variants LMP1 with Cao deletion characterized by an increased transforming potential. **Conclusion.** These data suggest that prevalence of EBV infections is common and may influence cancer development, although detected LMP1 variants of EBV are not necessarily associated with the pathogenesis of OC-SCC. Further studies are necessary to determine the potential role of EBV and its possible importance as an infection factor in OC-SCC.

Для корреспонденции. Кириянов Сергей Альбертович, канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории медиаторов и эффекторов иммунитета, отдел иммунологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва. E-mail: sergeisashilov@hotmail.com

Keywords: tongue squamous cell carcinoma; Epstein-Barr virus; Human Papilloma virus; BamHI-W; EBNA1; LMP1.

For citation: Kiryanov S.A., Levina T.A., Polyakov A.P., Rebrikova I.V., Murashko D.A., Konopleva M.V., Semenenko T.A., Suslov A.P. Detection of Epstein-Barr virus genome in oral cavity squamous cell carcinoma samples of Russian patients. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(3):112-117. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-3-112-117>

For correspondence: Sergei A. Kiryanov, PhD, Research Scientist, Laboratory of Mediators and Effectors of Immunity, Department of Immunology, N.F. Gamaleya National Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow, 123098, Russian Federation. E-mail: sergeisashilov@hotmail.com; phones

Information about authors:

Kiryanov S.A., <https://orcid.org/0000-0001-7729-9803>

Levina T.A., <https://orcid.org/0000-0002-2490-0834>

Konopleva M.V., <http://orcid.org/0000-0002-9724-695X>

Semenenko T.A., <http://orcid.org/0000-0002-6686-9011>

Suslov A.P., <http://orcid.org/0000-0001-5731-3284>

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 07 February 2019

Accepted 02 April 2019

Введение

Рак слизистой оболочки полости рта составляет группу, как правило, агрессивных злокачественных опухолей с быстрым локализованным ростом и региональным метастазированием [1]. Гистологически в 90–95% случаев рак слизистой оболочки полости рта представлен плоскоклеточной карциномой [2]. Несмотря на применение современных терапевтических комплексных и комбинированных протоколов лечения, за последние 20 лет в мире уровень смертности от рака полости рта существенно не снизился, 5-летняя выживаемость даже в развитых странах остаётся на уровне около 50% [3]. В некоторых странах, например в США, повышается заболеваемость раком полости рта среди молодых людей – как мужчин (в среднем на 5,1% в год), так и женщин [4, 5]. Тот факт, что частота встречаемости рака полости рта увеличивается именно у молодых людей, и при этом не зависит от влияния факторов риска (иммуносупрессия, табакокурение, употребление крепкого алкоголя и др.), позволяет предположить его связь с вирусной этиологией [6].

Показано, что такие онкогенные ДНК-вирусы, как вирус папилломы человека (ВПЧ) и вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ), являются этиологическими агентами рака ротовой полости и рака носоглотки соответственно [7]. По данным литературы, в эндемичных регионах Восточной Европы ВПЧ чаще обнаруживают в плоскоклеточных опухолях орофарингеального рака, тогда как ВЭБ более ассоциирован с развитием назофарингеальных карцином [8, 9]. На основании того, что ВПЧ и ВЭБ реплицируются в орофарингеальных эпителиальных клетках, выдвигалась гипотеза, что коинфицирование высококанцерогенными типами ВПЧ и ВЭБ может быть причиной инициации или прогрессии рака полости рта [9].

В настоящее время данные о возможной ассоциации онковирусов ВПЧ/ВЭБ и рака полости рта довольно противоречивы и существенно варьируют в зависимости от географических регионов, расовой принадлежности и эндемической ситуации. Частота инфицированности ВПЧ при раке ротовой полости существенно выше на Ближнем Востоке и в Азии. В Иране, например, она составляет около 14% [10], а в Индии – 48% [11]. В эндемичных популяциях, например в Швеции, США, Греции, частота встречаемости ВПЧ в образцах

рака ротовой полости составляет 0, 1,3 и 11,3% соответственно, что подтверждали как ПЦР-детекцией ДНК ВПЧ, так и *in situ* гибридизацией [12–14].

Данные о распространённости ВЭБ при раке ротовой полости ограничены только публикациями шведских и иранских исследователей. Первые не подтверждают наличие вирусов ВПЧ и ВЭБ в образцах рака ротовой полости больных независимо от возраста [12, 15]. Вторые приводят данные о значительной частоте встречаемости ВЭБ при раке ротовой полости иранских больных [16]. Обычно для детектирования ВЭБ даже с низкой вирусной нагрузкой применяют самый чувствительный метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием многокопийной мишени BamHI-W [17]. Однако во избежание возможных ложноположительных результатов, а также для проведения количественного анализа по определению вирусной нагрузки предпочтительнее использовать ПЦР в реальном времени на однокопийные ВЭБ-специфичные маркеры, такие как *EBNA1*, *LMP1*, *BZLF1* [18].

Возможно, рак полости рта является гетерогенной группой злокачественных опухолей ротовой полости как ассоциированных, так и не ассоциированных с онковирусами. Следовательно, обнаружение вирусных этиологических факторов, а также молекулярных механизмов канцерогенеза рака полости рта представляет собой дополнительный интерес для последующей риск-адаптированной стратификации, разработки диагностических тест-систем и выбора наиболее оптимальных лечебных стратегий.

Цель настоящего исследования – оценка возможной представленности онковирусов ВПЧ и ВЭБ в гистологических образцах российских пациентов и их потенциального вклада в качестве инфекционных агентов в развитие рака слизистой оболочки полости рта.

Материал и методы

Пациенты. Образцы получены от 11 российских больных раком слизистой оболочки полости рта, прооперированных в 2017 г. в Московском научно-исследовательском онкологическом институте им. П.А. Герцена. Выборка больных включала 8 мужчин и 3 женщины в возрасте 42–74 лет (средний возраст – 56 лет). Классификацию злокачественных новообразований по международной системе TNM проводили в соответствии с критериями,

принятыми организацией «Объединение против рака» (Union Against Cancer, UICC) [19].

Образцы опухолей и выделение ДНК. Все исследуемые опухоли полости рта гистологически были представлены плоскоклеточными карциномами языка с локализацией во второй трети языка, с различной дифференцировкой и в стадии T3-4aN0M0. Лишь для 1 образца была определена стадия T4aNxM0. Замороженные образцы опухолей подвергали ручной микродиссекции под гистологическим контролем.

Из каждого образца замороженной ткани рака полости рта вырезали 3 секции размером 10 мкм. ДНК экстрагировали с использованием набора «QIAamp DNA Tissue Mini Kit» (Qiagen, Германия) в соответствии с протоколом изготовителя, и элюировали в 100 мкл воды, свободной от нуклеазы. Общее количество экстрагированной ДНК варьировало от 0,82 до 11,20 мкг.

ПЦР-амплификация для выявления ДНК ВПЧ и ВЭБ. Для выявления и количественного определения ДНК ВПЧ высокого канцерогенного риска типов 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59 в клиническом материале проводили ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией с использованием коммерческого набора «АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL» (ООО «Интерлабсервис», РФ). Для достоверного выявления ДНК вирусов ВПЧ амплификацию проводили на 50 нг ДНК, в 2 повторностях, в соответствии с протоколом изготовителя.

Для выявления ДНК ВЭБ проводили ПЦР-амплификацию на таком же количестве ДНК (50 нг) с использованием праймеров и зонда, специфичных для многокопийного фрагмента VamNI-W вируса: прямой 5'-CCCAACACTCCACCACACC-3', обратный 5'-TCTTGGAGCTGTCCGAGGG-3' и зонд 5'-FAM-CACACA STACACACACCCACCCGCTCTC-BHQ1-3'. Чтобы исключить возможные ложноотрицательные результаты, обусловленные возможной деградацией ДНК, интегральность ДНК оценивали путём амплификации фрагмента гена β-глобина человека с использованием пары праймеров (прямой 5'-GTGCACCTGACTCCTGAGGAGA-3, обратный 5'-CCTTGATACCAACCTGCCAG-3'), и гибридационного зонда 5'-Hex-AAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTGG-bhq1'. Все образцы с отсутствием детекции β-глобина были исключены из дальнейшего анализа. Реакционная смесь содержала 0,4 мкМ праймеров и 5 ЕД ДНК-полимеразы TaqF в общем объеме 20 мкл, циклирование началось с этапа денатурации при 95 °С в течение 8 мин и составляло 45 циклов в следующем режиме ПЦР: 95 °С – 15 с, 60 °С – 15 с и 72 °С – 15 с. Для каждого прогона ПЦР был включён положительный контроль (ДНК из ВЭБ-позитивной клеточной линии В95-8) и отрицательный контроль (вода без нуклеазы). Ожидаемый размер ампликона составлял 86 пар нуклеотидов (п.н.) для VamNI-W ВЭБ и 140 п.н. для ампликона β-глобина. Детекцию ВЭБ мишени *EBNA1* проводили количественной ПЦР в том же температурном режиме с использованием олигонуклеотидов *EBNA1*, представленных в публикации [18]. Ожидаемый размер ампликона *EBNA1* составлял 81 п.н. Амплифицированные продукты визуализировали с помощью электрофореза на 2,5% агарозных гелях с последующим окрашиванием бромистым этидием.

ПЦР-амплификация и секвенирование С-концевого региона гена *LMP1*. Для выявления делеционного полиморфизма С-концевого региона гена латентного мембранного белка 1 (*LMP1*) ВЭБ проводили «гнездовую» ПЦР-амплификацию с использованием пар внешних и

внутренних праймеров, как было предложено в работе J. Ai и соавт. [20]. Ожидаемый размер ампликона (относительно параметров референтного изолята В95-8) при первом раунде ПЦР-амплификации составлял 357 п.н., при втором раунде – 260 п.н. Перед секвенированием амплифицированные продукты визуализировали с помощью электрофореза на 2,5% агарозных гелях с последующим окрашиванием бромистым этидием. Секвенирование ПЦР-продукта, амплифицированного с внешними праймерами, проводили на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3100 с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции и обработкой данных в программах Chromas 230 и Vector NTI.

Результаты

Были проанализированы на наличие вирусов ВПЧ и ВЭБ методом ПЦР в режиме реального времени 10 из 11 образцов рака слизистой полости рта, так как 1 образец был признан невалидным из-за непрохождения контрольной реакции на β-глобин.

В данной выборке образцов варианты ВПЧ высокого канцерогенного риска не обнаружены, что было подтверждено в дублированной постановке (результаты не показаны). В то же время методом ПЦР в реальном времени с использованием многокопийной мишени VamNI-W в 7 (70%) из 10 образцов рака слизистой оболочки полости рта была выявлена геномная ДНК ВЭБ.

ПЦР-детекция ВЭБ с использованием VamNI-W – наиболее чувствительный метод выявления ВЭБ, что обусловлено детекцией многокопийной специфичной мишени, представленной примерно в 7–11 копиях на геном ВЭБ. Однако, по данным W. Tang и соавт., в некоторых ВЭБ-инфицированных лимфомах и гастроинтестинальных новообразованиях из-за частичного делегирования или перестановок в геноме ВЭБ количество копий VamNI-W крайне вариабельно, и может оказаться ниже, чем количество однокопийных мишеней *EBNA1* и онкогена *LMP1* [21].

Для подтверждения наличия ВЭБ и определения количества копий ВЭБ в образцах рака полости рта была поставлена ПЦР в реальном времени с детекцией маркера *EBNA1*. Мишень *EBNA1* была детектирована в тех же семи образцах рака полости рта, как показано на рис. 1. Количество копий в пересчете на 100 000 клеток в образцах рака полости рта варьировало от 288 до 17×10^3 . Хотя образец рака полости рта с наибольшей вирусной нагрузкой по этому маркеру соответствовал стадии T4, отсутствие других образцов рака слизистой оболочки полости рта в стадии T4 не позволяет проанализировать наличие корреляции вирусной нагрузки ВЭБ с тяжестью заболевания.

Ещё одним маркером детекции ВЭБ был выбран фрагмент С-концевой области гена *LMP1*, являющегося основным онкогеном ВЭБ. Предполагается, что онкогенный потенциал ВЭБ может быть связан с некоторыми полиморфизмами С-концевой области *LMP1* [22]. Такие полиморфизмы, как вариабельное количество 33 нуклеотидных повторов, 15-нуклеотидная делеция в позициях 272–276 аминокислотных остатков (PHDPLP) и Сао-делеция 10 аминокислот (30 п.н.) в позиции 346–355 аминокислотных остатков, характеризующиеся повышенной трансформирующей активностью, чаще обнаруживали в ВЭБ, выделенных из опухолей носоглотки [22, 23]. Полученные нами данные показали, что

Характеристика инфицированных вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ) образцов опухолей ротовой полости, полученных от пациентов с диагнозом «плоскоклеточная карцинома второй трети языка»

Образец	Стадия по TNM	Возраст, годы	Пол	β-Глобин/ ПЦР	VamHI-W на 10 ⁵ клеток	EBNA1 на 10 ⁵ клеток	LMP1: С-концевые повторы и делеции/дикий тип	Изоляты ВЭБ по LMP1-классификации**
1-1	T3	52	М	9870	698	520	6,5 + делеции	China1
2-4	T3	54	М	62 630	18 180	10 300	4,5 + дикий тип	B95-8
3-1	T3	51	М	16 028	568	371	4,5 + делеции	Med+
4-2	T3	42	М	7800	267	288	н/д*	н/д
5-6	T3	53	М	17 900	3880	2230	4,5 + делеции	Med+
9-1	T3	74	Ж	40 600	11 540	8800	4,5 + делеции	Med+
10-2	T4	60	М	74 900	16 140	17 300	5,5 + делеции	China1

Примечание. *н/д – нет данных; ** изоляты ВЭБ в соответствии с классификацией [24]; «Med+» – Mediterranean+.

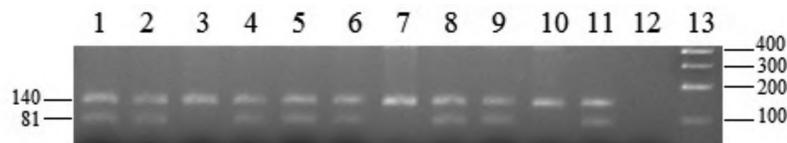


Рис. 1. ПЦР-амплификация EBNA1 и β-глобина в образцах опухолей слизистой оболочки полости рта.

Линии 1–10 – образцы рака слизистой оболочки полости рта; линия 11 – положительный контроль; линия 12 – отрицательный контроль; линия 13 – маркер длин фрагментов, соответствующий 100–400 п.н. Фрагмент β-глобина соответствует длине 140 п.н. Фрагмент EBNA1 соответствует 81 п.н.

полиморфный по длине С-концевой фрагмент LMP1 (в диапазоне размеров 260-300 п.н.) был детектирован ПЦР-амплификацией в 6 из 7 образцов рака полости рта (рис. 2, линии 1–6), так как в образце с минимальной вирусной нагрузкой LMP1 детектировать не удалось (см. рис. 2, линия 7).

Для выявления вариантов изолятов ВЭБ в зависимости от полиморфизмов в С-концевой области провели секвенирование 6 LMP1-положительных образцов рака слизистой оболочки полости рта. Обнаруженные варианты ВЭБ в образцах рака полости рта в зависимости от полиморфизмов LMP1, вирусная нагрузка, рассчитанная по маркерам VamHI-W и EBNA1 относительно β-глобина, представлены в таблице.

Анализ первичной нуклеотидной последовательности секвенированных образцов показал, что в соответствии с классификацией R. Edwards и соавт. [24] среди изоля-

тов ВЭБ рака полости рта выявлены три, относящиеся к Mediterranean, два – к China1, а один соответствовал дикому типу B95-8 (см. таблицу).

Кроме того, изоляты ВЭБ различались между собой по количеству 11 аминокислотных повторов в гене LMP1. В частности, среди вариантов China1 один имел 6,5 повтора, а другой – 5,5 повтора. У всех вариантов Mediterranean было по 4,5 повтора. Вариант B95-8 также содержал 4,5 повтора. Только в образцах с С-делецией были детектированы нуклеотидные замены, вызывающие миссенс-мутацию S309N, тогда как в образце с вариантом B95-8 она отсутствовала. Кроме того, в образцах 1-1, 3-1 и 9-1 были обнаружены дополнительные мутации D293G, Q281R и Q322E, соответственно. Однако нет оснований считать, что наличие данных мутаций в образцах связано с определённым вариантом LMP1. Скорее всего, это отражает процесс накопления мутаций при персистенции ВЭБ в опухоли.

Обсуждение

По результатам исследования, в 70% образцов опухолей российских пациентов, страдающих раком слизистой полости рта, локализованным во второй трети языка, было выявлено инфицирование ВЭБ, но не ВПЧ. Этот результат согласуется с недавно представленными данными иранских исследователей о наличии ВЭБ в 72,3% рака полости рта той же локализации, полученными на выборке из 94 образцов [16]. Однако шведские авторы не обнаружили ВПЧ и ВЭБ в подобных образцах [15]. Отсутствие детекции ВПЧ на выборке из 10 образцов в нашем исследовании выглядит вполне достоверно и согласуется с ранее приведёнными данными о незначительной представленности ВПЧ в раке полости рта в европейских неэндемических популяциях [13, 14]. Кроме того, полученные данные о преимущественном инфицировании рака слизистой полости рта ВЭБ в российской популяции интересны в связи с тем, что в североамериканской популяции были обнаружены случаи как ВПЧ-инфекции, так и ВПЧ/ВЭБ-коинфекции [7].

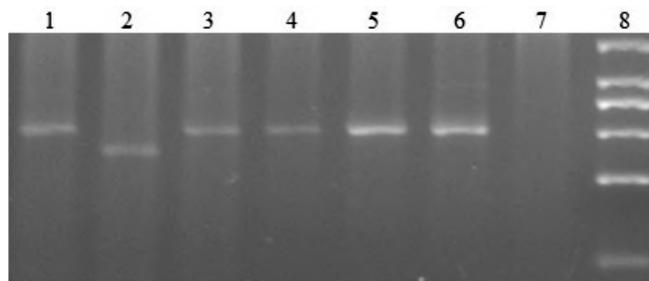


Рис. 2. ПЦР-амплификация С-концевого фрагмента LMP1 в образцах опухолей слизистой оболочки полости рта..

Линии 1–6 – ампликоны размером 260–300 п.н., полученные в результате второго раунда амплификации полиморфного участка гена LMP1 из образцов рака слизистой оболочки полости рта (линия 2 соответствует образцу с длиной фрагмента гена LMP1, равной 260 п.н.); линия 7 – образец опухоли слизистой оболочки полости рта с низкой вирусной нагрузкой ВЭБ, в котором не был детектирован фрагмент гена LMP1; линия 8 – маркер длин фрагментов, соответствующий 100–800 п.н.

Обнаружение в 1 из 6 образцов рака полости рта варианта ВЭБ В95-8, являющегося доминирующим в российской популяции, как у здоровых лиц, так и у больных ВЭБ-ассоциированными заболеваниями [25], не позволяет говорить о специфичной ассоциации определённых вариантов ВЭБ с развитием рака полости рта. В остальных образцах были обнаружены варианты China1 и Mediterranean, которые, в отличие от В95-8, содержали Сао-делеции. В совокупности частота выявления вариантов *LMP1* China1 и Med+, обладающих повышенной трансформирующей активностью, составила 83,3% (5 из 6). Интересно, что подобную частоту этих вариантов *LMP1*-Сао (72,7%) с преобладанием варианта Mediterranean ранее обнаружили российские авторы в ВЭБ-ассоциированных образцах опухолевой ткани [25].

В отличие от исследований образцов рака полости рта, анализ вариантов и вариативности *LMP1* в ВЭБ-ассоциированных образцах рака носоглотки проводили довольно интенсивно. Известно, что в европейских популяциях доминирующими вариантами *LMP1* в изолятах ВЭБ из образцов рака носоглотки являются варианты Mediterranean, однако в России также недавно были обнаружены варианты China1 и North Carolina (NC) [26]. Тем не менее ни один из вариантов *LMP1* не был специфически ассоциирован с раком носоглотки, хотя предполагается, что заражение штаммами ВЭБ с высокоонкогенными мутациями *LMP1*-Сао более предпочтительно для инициации ВЭБ-ассоциированного канцерогенеза [25].

Полученные нами результаты о значительной частоте инфицирования ВЭБ опухолей полости рта у российских пациентов позволяют предположить возможную ассоциацию ВЭБ с риском развития рака полости рта. В литературе этот вопрос остаётся нерешённым. Данные метаанализа по подгруппам, дифференцируемым по географическим регионам, указывают на возможную положительную связь между ВЭБ-инфекцией и риском развития рака полости рта в Азии, Европе и США [27], тогда как другие авторы не подтверждают обнаружения ВЭБ- и ВПЧ-инфицирования в образцах опухолей полости рта [15]. Нельзя исключить, что возможными факторами, приводящими к различной интерпретации результатов, являются различия в диагностической чувствительности методов обнаружения ВЭБ в образцах тканей, используемых разными авторами, неточность в гистологической классификации опухолевых тканей, и, наконец, отсутствие стандартизированной методики определения порога клинической значимости вирусной нагрузки ВЭБ.

Заключение

На данной выборке образцов не обнаружено ассоциации ВПЧ с раком слизистой оболочки ротовой полости. В то же время инфицирование ВЭБ в значительном количестве (70%) проанализированных образцов рака полости рта предполагает потенциальную роль ВЭБ как инфицирующего агента в патогенезе рака слизистой оболочки ротовой полости. Дальнейший анализ на более широкой выборке позволит прояснить частоту вирус-ассоциированных случаев рака слизистой полости рта. Количественной ПЦР-амплификацией с использованием панели из 3 ВЭБ-специфичных маркеров, включающей *VamNI-W*, *EBNA1* и *C*-концевого фрагмента гена *LMP1*, было однозначно подтверждено наличие ВЭБ в образцах рака слизистой оболочки полости рта, а

также определена вирусная нагрузка по маркеру *EBNA1*, которая варьировала от 288 до 17×10^3 копий на 100 000 клеток. Секвенирование ПЦР-продуктов *C*-концевого фрагмента гена *LMP1* 6 образцов рака полости рта выявило существенное преобладание вариантов *LMP1* с делецией Сао, обладающих высокотрансформирующим потенциалом (83,3% (5/6)). Однако среди выявленных вариантов с делецией Сао (Med+, China 1) не было вариантов, специфично ассоциированных с раком полости рта. Для подтверждения возможной ассоциации ВЭБ с развитием рака слизистой оболочки ротовой полости необходимы дальнейшие исследования не только с увеличением числа анализируемых образцов, но и с учётом других географических регионов России.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 3-24, 27 см. REFERENCES)

- Федяев И.М., Байриков И.Н., Белова Л.П., Шувалова Т.В. *Злокачественные опухоли челюстно-лицевой области*. М.: Медицинская книга; 2000.
- Гончарова Е.В., Сенюта Н.Б., Смирнова К.В., Щербак Л.Н., Гурцевич В.Э. Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) в России: инфицированность населения и анализ вариантов гена *LMP1* у больных ВЭБ-ассоциированными патологиями и здоровых лиц. *Вопросы вирусологии*. 2015; 60(2): 11-7.
- Сенюта Н.Б., Игнатова А.В., Ломая М.В., Гончарова Е.В., Щербак Л.Н., Душенькина Т.Е. и др. Вирус Эпштейна–Барр у больных раком носоглотки и здоровых лиц в двух географически различных регионах России. *Инфекция и иммунитет*. 2017; 7(1): 41-50.

REFERENCES

- Montero P.H., Patel S.G. Cancer of the oral cavity. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* 2015; 24(3): 491-508. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.soc.2015.03.006>
- Fedyayev I.M., Bayrikov I.N., Belova L.P., Shuvalova T.V. *Malignant Tumors of the Maxilla Facial Region [Zlokachestvennye opukhohi chelyustno-litsevoy oblasti]*. Moscow: Meditsinskaya kniga; 2000. (in Russian)
- Mroueh R., Haapaniemi A., Grénman R., Laranne J., Pukkila M., Almagush A., et al. Improved outcomes with oral tongue squamous cell carcinoma in Finland. *Head Neck*. 2017; 39(7): 1306-12. Doi: <https://doi.org/10.1002/hed.24744>
- Tota J.E., Anderson W.F., Coffey C., Califano J., Cozen W., Ferris R.L., et al. Rising incidence of oral tongue cancer among white men and women in the United States, 1973-2012. *Oral Oncol*. 2017; 67: 146-52. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2017.02.019>
- Patel S.C., Carpenter W.R., Tyree S., Couch M.E., Weissler M., Hackman T., et al. Increasing incidence of oral tongue squamous cell carcinoma in young white women, age 18 to 44 years. *J. Clin. Oncol*. 2011; 29(11): 1488-94. Doi: <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.31.7883>
- Llewellyn C.D., Johnson N.W., Warnakulasuriya K.A. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people – a comprehensive literature review. *Oral Oncol*. 2001; 37(5): 401-18.
- Jiang R., Ekshyyan O., Moore-Medlin T., Rong X., Nathan S., Gu X., et al. Association between human papilloma virus/Epstein-Barr virus coinfection and oral carcinogenesis. *J. Oral Pathol. Med.* 2015; 44(1): 28-36. Doi: <https://doi.org/10.1111/jop.12221>
- Svajdler M., Kaspirkova J., Mezencev R., Laco J., Torday T., Dubinsky P., et al. Human papillomavirus and Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma in a non-endemic eastern European population. *Neoplasma*. 2016; 63(1): 107-14. Doi: https://doi.org/10.4149/neo_2016_013
- Al Moustafa A.E., Chen D., Ghabreau L., Akil N. Association between human papillomavirus and Epstein-Barr virus infections in human oral carcinogenesis. *Med. Hypotheses*. 2009; 73(2): 184-6. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2009.02.025>

10. Ashraf M.J., Hosseini S., Monabati A., Valibeigi B., Khademi B., Abedi E., et al. The prevalence of human papilloma virus in squamous cell carcinoma of oral tongue. *Iran. J. Pathol.* 2017; 12(2): 144-9.
11. Elango K.J., Suresh A., Erode E.M., Subhadra Devi L., Ravindran H.K., Iyer S.K., et al. Role of human papilloma virus in oral tongue squamous cell carcinoma. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2011; 12(4): 889-96.
12. Sgaramella N., Coates P.J., Strindlund K., Loljung L., Colella G., Laurell G., et al. Expression of p16 in squamous cell carcinoma of the mobile tongue is independent of HPV infection despite presence of the HPV-receptor syndecan-1. *Br. J. Cancer.* 2015; 113(2): 321-6. Doi: <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.207>
13. Poling J., Ma X.J., Bui S., Luo Y., Li R., Koch W., et al. Human papillomavirus (HPV) status of non-tobacco related squamous cell carcinomas of the lateral tongue. *Oral. Oncol.* 2014; 50(4): 306-10. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2014.01.006>
14. Tsimplaki E., Argyri E., Xesfyngi D., Daskalopoulou D., Stravopodis D.J., Panotopoulou E. Prevalence and expression of human papillomavirus in 53 patients with oral tongue squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2014; 34(2): 1021-5.
15. Wilms T., Khan G., Coates P.J., Sgaramella N., Fåhraeus R., Hassani A., et al. No evidence for the presence of Epstein-Barr virus in squamous cell carcinoma of the mobile tongue. *PLoS One.* 2017; 12(9): e0184201. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184201>
16. Shahrabi-Farahani M., Karimi E., Mostaan L.V., Saba S., Yazdani N., M Amoli M. Association between Epstein Barr virus and tongue squamous cell carcinoma in Iranian patients. *Pathol. Res. Pract.* 2018; 214(1): 130-3. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.prp.2017.10.006>
17. Cheung A., Kieff E. Long internal direct repeat in Epstein-Barr virus DNA. *J. Virol.* 1982; 44(1): 286-94.
18. Ryan J.L., Fan H., Glaser S.L., Schichman S.A., Raab-Traub N., Gulley ML. Epstein-Barr virus quantitation by real-time PCR targeting multiple gene segments: a novel approach to screen for the virus in paraffin-embedded tissue and plasma. *J. Mol. Diagn.* 2004; 6(4): 378-85. Doi: [https://doi.org/10.1016/S1525-1578\(10\)60535-1](https://doi.org/10.1016/S1525-1578(10)60535-1)
19. Sobin L.H., Gospodarowicz M.K., Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumours*. Washington, DC, USA: Wiley-Blackwell; 2009: 22-45.
20. Ai J., Xie Z., Liu C., Huang Z., Xu J. Analysis of EBNA-1 and LMP-1 variants in diseases associated with EBV infection in Chinese children. *Virol. J.* 2012; 9: 13. Doi: <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-13>
21. Tang W., Fan H., Schroeder J., Dunphy C.H., Bryant R.J., Fedoriv Y., et al. Atypical Epstein-Barr viral genomic structure in lymphoma tissue and lymphoid cell lines. *Diagn. Mol. Pathol.* 2013; 22(2): 91-101.
22. Guiretti D.M., Chabay P.A., Valva P., Stefanoff C.G., Barros M.H., De Matteo E., et al. Structural variability of the carboxy-terminus of Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein 1 gene in Hodgkin's lymphomas. *J. Med. Virol.* 2007; 79(11): 1722-30. Doi: <https://doi.org/10.1002/jmv.21020>
23. Lorenzetti M.A., Gantuz M., Altcheh J., De Matteo E., Chabay P.A., Preciado M.V. Distinctive Epstein-Barr virus variants associated with benign and malignant pediatric pathologies: *LMP1* sequence characterization and linkage with other viral gene polymorphisms. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(3): 609-18. Doi: <https://doi.org/10.1128/JCM.05778-11>
24. Edwards R., 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: <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9855>
25. Goncharova E.V., Senyuta N.B., Smirnova K.V., Shcherbak L.N., Gurtsevich V.E. Epstein-Barr virus (EBV) in Russia: infection of the population and analysis of the *LMP1* gene variants in patients with EBV-associated pathologies and healthy individuals. *Voprosy virusologii.* 2015; 60(2): 11-7. (in Russian)
26. Senyuta N.B., Ignatova A.V., Lomaya M.V., Goncharova E.V., Shcherbak L.N., Dushen'kina T.E., et al. Epstein-Barr virus in the population of two geographically different regions of Russia. *Infektsiya i immunitet.* 2017; 7(1): 41-50. (in Russian)
27. She Y., Nong X., Zhang M., Wang M. Epstein-Barr virus infection and oral squamous cell carcinoma risk: A meta-analysis. *PLoS One.* 2017; 12(10): e0186860. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186860>

Поступила 07.02.2019

Принята в печать 02.04.19