



Вирус Эпштейна–Барр (*Herpesviridae: Gammaherpesvirinae: Lymphocryptovirus: Human gammaherpesvirus 4*) у калмыков и славян, проживающих на территории России: типы вируса, варианты онкогена *LMP1* и злокачественные опухоли

Гурцевич В.Э.¹, Лубенская А.К.¹, Сенюта Н.Б.¹, Душенькина Т.Е.¹, Смирнова К.В.^{1,2}

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

²ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова (РНИМУ)» Минздрава России, 117997, Москва, Россия

Введение. Открытие типов вируса Эпштейна–Барр (*Herpesviridae: Gammaherpesvirinae: Lymphocryptovirus: Human gammaherpesvirus 4*) (ВЭБ) – ВЭБ-1 и ВЭБ-2, обладающих различной трансформирующей способностью *in vitro*, стимулировало изучение их распространённости в популяциях с целью выяснения связи со злокачественными новообразованиями.

Цели работы – изучение распространённости ВЭБ-1 и ВЭБ-2 у представителей 2 этносов России, калмыков и славян, сиквенный анализ онкогена *LMP1* в изолятах вируса и анализ корреляции между типами вируса и заболеваемостью определенными формами опухолей.

Материалы и методы. Из биологического материала смывов полости рта, полученных от этнических калмыков Республики Калмыкия (РК) ($n = 50$) и славян, жителей Московской области (МО) ($n = 40$), выделяли образцы ДНК. Последние использовали для амплификации ДНК ВЭБ, с последующим определением её концентрации на 1 клетку смыва, амплификацией в вирусных образцах онкогена *LMP1*, их секвенированием и определением белковых вариантов *LMP1*.

Результаты. Установлено, что при одинаковой нагрузке ВЭБ среди представителей обоих этносов в группе калмыков соотношение лиц, инфицированных трансформирующим и нетрансформирующим типами вируса, было практически одинаковым (ВЭБ-1 – 51%; и ВЭБ-2 – 49%), а в группе славян доминировал трансформирующий тип ВЭБ-1 (80,6%). Доминантное инфицирование представителей славян 1-м типом вируса (ВЭБ-1) коррелировало с повышенными показателями заболеваемости некоторыми формами опухолей у населения МО при сравнении с аналогичными показателями у населения РК, представители которой инфицированы обоими типами вируса. Различия между сравниваемыми показателями онкозаболеваемости не были статистически значимыми. Анализ вирусных изолятов показал близкий набор вариантов *LMP1* у обеих этнических групп.

Заключение. С целью установления влияния типов ВЭБ на заболеваемость злокачественными новообразованиями необходимы дополнительные исследования с участием представителей различных этнических групп из разных географических регионов.

Ключевые слова: вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ); калмыки; славяне; типы ВЭБ-1 и ВЭБ-2; *LMP1*; полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ); сиквенный анализ; опухоли с встречающимися ВЭБ-ассоциированными случаями

Для цитирования: Гурцевич В.Э., Лубенская А.К., Сенюта Н.Б., Душенькина Т.Е., Смирнова К.В. Вирус Эпштейна–Барр (*Herpesviridae: Gammaherpesvirinae: Lymphocryptovirus: Human gammaherpesvirus 4*) у калмыков и славян, проживающих на территории России: типы вируса, варианты онкогена *LMP1* и злокачественные опухоли. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(3): 246–257. DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-120

Для корреспонденции: Гурцевич Владимир Эдуардович, д-р мед. наук, главный научный консультант лаборатории вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва, Россия. E-mail: gurtsevitch-vlad-88@yandex.ru

Участие авторов: Гурцевич В.Э. – идея и дизайн исследования, оформление графического и иллюстративного материала, написание текста статьи; Лубенская А.К. – определение типов вируса, амплификация онкогена; Сенюта Н.Б. – систематизация результатов исследования, анализ сиквенсов, определение вариантов онкогена; Душенькина Т.Е. – сбор и обработка биологического материала; Смирнова К.В. – организация исследования, анализ полученных результатов, редактирование текста.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт государственного бюджета.

Благодарности. Авторы выражают признательность всем сотрудникам лаборатории вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии (НМИЦО) им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Исследование проводилось при информированном согласии участников исследования. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ ОИМ. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Протокол № 1726 от 15.03.2022).

Поступила 26.04.2022
Принята в печать 02.06.2022
Опубликована 30.06.2022

ORIGINAL ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-120>

Epstein–Barr virus (*Herpesviridae: Gammaherpesvirinae: Lymphocryptovirus: Human gammaherpesvirus 4*) in Kalmyks and Slavs living in Russia: virus types, *LMP1* oncogene variants, and malignancies

Vladimir E. Gurtsevitch¹, Alexandra K. Lubenskaya¹, Natalia B. Senyuta¹,
Tatiana E. Dushenkina¹, Ksenia V. Smirnova^{1,2}

¹Research Institute of Carcinogenesis, FSBI «National Medical Research Center of Oncology named after N.N. Blokhin» of the Ministry of Health of Russia 115478, Moscow, Russia;

²FSAEI HE «Pirogov Russian National Medical University of the Ministry of the Health of Russia (Pirogov Medical University)», 117997, Moscow, Russia

Introduction. The discovery of the Epstein-Barr virus types (*Herpesviridae: Gammaherpesvirinae: Lymphocryptovirus: Human gammaherpesvirus 4*) (EBV) – EBV-1 and EBV-2, which have different transforming abilities in vitro, stimulated the study of their prevalence in populations in order to elucidate the relationship with malignant neoplasms.

The aims of the work are to study the prevalence of EBV-1 and EBV-2 among representatives of 2 ethnic groups of Russia, Kalmyks and Slavs, sequencing analysis of the *LMP1* oncogene in virus isolates, and analysis of the correlation between virus types and the incidence of certain forms of tumors.

Materials and methods. DNA samples were isolated from the biological material of oral swabs obtained from ethnic Kalmyks of the Republic of Kalmykia (RK) ($n = 50$) and Slavs, residents of the Moscow Region (MR) ($n = 40$). DNA samples were used to amplify EBV DNA, followed by determination of its concentration per 1 cell of washout, amplification of the *LMP1* oncogene in viral samples, their sequencing, and determination of *LMP1* protein variants.

Results. It has been established that with the same burden of EBV among representatives of both ethnic groups in the Kalmyk group, the ratio of persons infected with transforming and non-transforming types of the virus was almost the same (EBV-1 – 51%; and EBV-2 – 49%). Meanwhile, in the group of Slavs the transforming EBV-1 type virus dominated (80.6%). The predominance of EBV-1 type in representatives of the Slavs correlated with increased incidence of certain forms of tumors in the population of the MR when compared with similar values in the population of the RK, where both types of the virus were prevalent. Differences between the compared rates of cancer incidence were not statistically significant. Analysis of viral isolates showed a similar set of *LMP1* variants in both ethnic groups.

Conclusion. In order to establish the influence of EBV types on the incidence of malignant tumors, additional studies involving representatives of various ethnic groups from different geographical regions are needed.

Keywords: Epstein–Barr virus (EBV); EBV-1 and EBV-2 types; latent membrane protein 1 (*LMP1*); sequence analysis; Kalmyks; Slavs; real-time polymerase chain reaction (PT-PCR); tumors with EBV-associated cases

For citation: Gurtsevitch V.E., Lubenskaya A.K., Senyuta N.B., Dushenkina T.E., Smirnova K.V. Epstein–Barr virus (*Herpesviridae: Gammaherpesvirinae: Lymphocryptovirus: Human gammaherpesvirus 4*) in Kalmyks and Slavs living in Russia: virus types, *LMP1* oncogene variants, and malignancies. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(3): 246–257. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-120>

For correspondence: Vladimir E. Gurtsevitch, D. Sci. (Med.), Chief Scientific Advisor, Viral Carcinogenesis Laboratory, Research Institute of Carcinogenesis, FSBI «National Medical Research Center of Oncology named after N.N. Blokhin» of the Ministry of Health of Russia 115478, Moscow, Russia. E-mail: gurtsevitch-vlad-88@yandex.ru

Information about the authors:

Gurtsevitch E.V., <https://orcid.org/0000-0003-1840-4364>

Lubenskaya A.K., <https://orcid.org/0000-0003-3953-7449>

Senyuta N.B., <https://orcid.org/0000-0001-8915-8274>

Dushenkina T.E., <https://orcid.org/0000-0001-8279-514X>

Smirnova K.V., <https://orcid.org/0000-0001-6209-977X>

Contribution: Gurtsevitch V.E. – study idea and design, preparing of graphic and illustrative material, text writing; Lubenskaya A.K. – virus types determination, oncogene amplification; Senyuta N.B. – study results systematization, sequences analysis, oncogene variants determination; Dushenkina T.E. – biological material collection and processing; Smirnova K.V. – study organization, results analysis, text editing.

Funding. The research was funded by the State budget.

Acknowledgement. The authors are grateful to the colleagues of the Viral Carcinogenesis Laboratory, Research Institute of Carcinogenesis, FSBI «National Medical Research Center of Oncology named after N.N. Blokhin» of the Ministry of Health of Russia.

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

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the study participants. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Research Institute of Carcinogenesis, FSBI «National Medical Research Center of Oncology named after N.N. Blokhin» of the Ministry of Health of Russia (Protocol No. 1726 dated March 15, 2022).

Received 26 April 2022
Accepted 02 June 2022
Published 30 June 2022

Введение

Вирус Эпштейна–Барр (*Herpesviridae: Gammaherpesvirinae: Lymphocryptovirus: Human gammaherpesvirus 4*) (ВЭБ, EBV) – один из наиболее распространённых на земном шаре вирусных патогенов. Ранее этот агент обозначался как *Human herpesvirus 4 (HHV4)* [1]. Сложный геном ВЭБ состоит из линейной двухцепочечной ДНК длиной 170–185 т.п.н., включающей около 85 возможных кодирующих областей [2]. Единственный естественный хозяин вируса – человек. Известно, что свыше 90% взрослого населения планеты являются носителями ВЭБ [3]. Заражение происходит в раннем детском возрасте и протекает бессимптомно; при этом инфицированный пожизненно остаётся носителем вируса, как правило, без каких-либо клинических проявлений. В некоторых случаях ВЭБ принимает участие в возникновении доброкачественных или злокачественных новообразований. Количество их впервые выявленных случаев может достигать 200 тыс. в год [3, 4]. В отличие от других онкогенных вирусов человека, таких как вирусы папилломы (*Papillomaviridae: Alphapapillomavirus: Human papillomavirus*), полиомавируса клеток Меркеля (*Polyomaviridae: Alphanpolyomavirus: Human polyomavirus 5*; прежнее название – *Merkel cell polyomavirus*) (MCPyV, MCV), вирус Т-клеточного лейкоза взрослых 1-го типа (*Retroviridae: Deltaretrovirus. Primate T-lymphotropic virus 1: Human T-lymphotropic virus 1*) (HTLV-1), вирус гепатита В (*Hepadnaviridae: Orthohepadnavirus: Hepatitis B virus*) (HBV), проявляющих свой онкогенный потенциал только по отношению к определённым клеткам-мишеням, ВЭБ обладает широким клеточным тропизмом. С ним ассоциировано возникновение целого спектра новообразований лимфоидного и эпителиального происхождения. В частности, данный патоген известен как этиологический агент для 2 нозологических форм В- и Т/НК-клеточных злокачественных лимфопролиферативных заболеваний (В-cell/Т/НК-cell lymphoproliferative disorders; В-LPD и Т/НК-LPD). Показана роль ВЭБ в возникновении по крайней мере 9 патогенетически различающихся неоплазий. К ним относятся лимфомы Бёркитта (Burkitt Lymphoma, BL) и Ходжкина (Hodgkin lymphoma, HL), диффузная В-крупноклеточная лимфома (diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL), плазмобластная (плазмо-

бластическая) лимфома (plasmablastic lymphoma, PBL), лимфома из Т/НК-клеток (natural killers – натуральных, или естественных, киллеров) (NK/T-cell lymphoma), рак носоглотки (nasopharyngeal carcinoma, NPC) и рак желудка (gastric carcinoma, GC), лейомиосаркома, а также первичная выпотная лимфома (primary effusion lymphoma PEL), в которой всегда присутствует вирус саркомы Капоши (*Herpesviridae: Gammaherpesvirinae: Rhadinovirus: Human gammaherpesvirus 8*) (KSHV) [3]. Из этих 9 опухолей 5, в том числе PEL, происходят из В-клеточной популяции. Другие же новообразования развиваются из инфицированных Т- и/или НК-клеток, а также из эпителия носоглотки, желудка и гладких мышц у лиц с иммунодефицитным синдромом.

В ходе эволюции ВЭБ приобрёл уникальный набор латентных, так называемых рост-трансформирующих генов. Спектр их активации в разных инфицируемых субстратах включает несколько вариантов, обозначаемых типами латенции (программы роста) [5]. Для содержащих вирусный геном лимфобластоидных клеточных линий (lymphoblastoid cell lines, LCL) характерен III тип латенции, включающий экспрессию кодируемых вирусом ядерных антигенов EBNA-1 (поддерживает среди прочего эписомальное состояние генома ВЭБ), EBNA-2, -3A, -3B, -3C и EBNA-LP (активаторы/регуляторы транскрипции), а также латентных мембранных белков LMP1 (latent membrane protein 1, латентный мембранный белок 1), LMP2A и LMP2B (сигнальные преобразователи). На низком уровне экспрессируются EBER – ВЭБ малые некодирующие, нкРНК ВЭБ, и два блока микроРНК (так называемые BHRF1- и BART-miRNAs). Латенция II типа, сопровождаемая экспрессией EBNA-1, LMP1, LMP2A/2B, а также EBER и BART-miRNAs, характерна для HL и NPC. Наконец, определяемый в клетках ВЭБ-позитивной BL вариант латенции I типа характеризуется экспрессией EBNA-1, EBER и BART-miRNAs.

На основе генетического полиморфизма, обнаруженного в генах *EBNA-2, -3A, -3B* и *-3C*, идентифицированы два основных штамма ВЭБ, соответствующие его типам: ВЭБ-1 и ВЭБ-2 [6]. Результаты многочисленных исследований показали, что в разных географических регионах они встречаются с неодинаковой частотой [7]. При этом важным отличием одного типа

ВЭБ от другого выступает их неодинаковая трансформирующая активность *in vitro*. ВЭБ-1 легко трансформирует В-клетки в культуре ткани, что обуславливает рост иммортализованных LCL, тогда как ВЭБ-2 подобным свойством не обладает [6, 8]. Различная способность к иммортализации В-клеток *in vitro* позволяет предположить, что *in vivo* вирусы этих типов используют альтернативные подходы для установления латенции. Имеются данные в пользу того, что, в отличие от ВЭБ-1, ВЭБ-2 характеризуется уникальным тропизмом к Т-клеткам, являясь естественной частью его жизненного цикла [8]. Относительно же ВЭБ-2 парадокс заключается и в том, что хотя заражение В-клеток в культуре не приводит к образованию LCL, ВЭБ-2 регулярно выявляется в клетках эндемической BL [9]. Таким образом, неспособность к В-клеточной трансформации *in vitro* не свидетельствует об отсутствии онкогенного потенциала вируса этого типа *in vivo*.

Экспериментальные исследования продемонстрировали, что из более чем 85 генов ВЭБ наиболее выраженным трансформирующим и онкогенным потенциалом обладает *LMP1*, что послужило основанием отнести его к основным (классическим) онкогенам вируса [10]. Кодированный этим геном одноимённый протеин состоит из 356 аминокислот, включает короткий цитоплазматический N-концевой домен, 6 трансмембранных и длинный цитоплазматический C-концевой домен [11]. *LMP1* характеризуется способностью стимулировать клеточный рост, ингибировать апоптоз и усиливать подвижность клеток различных типов *in vitro*, вызывать трансформацию фибробластов грызунов (*Rodentia*) и В-лимфоцитов человека, а также индуцировать гиперплазию и лимфому у трансгенных мышей (*Mus*) [12]. При этом белок отличается выраженным полиморфизмом, часто отражающим географическое происхождение вируса, что позволило R.H. Edwards и соавт. в 1999 г. предложить широко используемую в настоящее время классификацию. В соответствии с ней все изученные авторами образцы *LMP1* разделены на варианты, различающиеся по содержанию ключевых аминокислотных замен по отношению к прототипному варианту *LMP1*-B95.8 [13]. В предложенной классификации разновидности *LMP1* получили названия в соответствии с географическим происхождением: Alaskan (Ala), China1, -2 и -3 (Chi1, Chi2, Chi3), Mediterranean+ (Med+), Mediterranean- (Med-) и North Carolina (NC). В последнее время описаны несущие уникальные аминокислотные замены новые варианты *LMP1* в штаммах ВЭБ из Таиланда (Thai1 и Thai2), Юго-Восточной Азии (SEA1, SEA2) и Аргентины (Arg) [14–16].

Обнаружение новых, ранее не известных разновидностей *LMP1* позволяет предположить связь молекулярной структуры вируса и его онкогена *LMP1* не только с географическим регионом происхождения, но и с генетическими особенностями населения (этносов), проживающих в этих регионах. Процесс отбора вирусных рекомбинантов и/или вариантов ВЭБ *in vivo* протекает под влиянием иммунного надзора и определяется способностью патогена сохраняться на протяжении своего жиз-

ненного цикла в организме. В свою очередь, иммунный надзор зависит от типов МНС (major histocompatibility complex, главный комплекс гистосовместимости), так как функциональные эпитопы подвергаются модификациям в зависимости от их представления антигенам МНС. Поскольку преобладающие типы последнего различаются между этносами и популяциями из разных географических регионов, указанные факторы могут иметь важное значение в определении структурных модификаций вируса [17, 18].

Целью настоящей работы позиционировано определение уровня инфицированности и преобладающих типов ВЭБ у этнических калмыков из Республики Калмыкия (РК) и этнических славян Московской области (МО) в продолжение исследований, посвящённых изучению особенностей ВЭБ-инфекции у древних этносов Российской Федерации [19]. Представлялось также важным установить превалирующие варианты гена *LMP1* у штаммов, инфицирующих представителей указанных этносов, а также выявить возможную зависимость показателей заболеваемости населения РК и МО злокачественными новообразованиями, в состав которых могут входить ВЭБ-ассоциированные опухоли, от типа ВЭБ.

Материалы и методы

Объекты исследования. Изучению подвергали смывы полости рта (СПР) 50 жителей г. Элисты (столица РК), являющихся этническими калмыками не менее чем в 3 поколениях. Данная группа состояла из 19 мужчин и 31 женщины; средний возраст их составлял 38,8 года. Аналогичные образцы биологического материала получали от коренных жителей МО, этнических славян – 21 мужчины и 19 женщин (средний возраст – 34,7 года). Каждый смыв представлял собой суспензию клеток, полученных индивидуально от каждого лица, после полоскания полости рта в течение 30 с стерильным физиологическим раствором (0,9% хлорида натрия, NaCl) в объёме 15 мл. Образцы смывов, собранные в герметично закрывающиеся пластиковые пробирки, хранились при температуре 4°C не более 2 сут до начала исследования. От всех участников получено письменное информированное согласие на проведение исследовательского протокола. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГБУ «НМИЦО им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Протокол № 1726 от 15.03.2022).

Экстракция ДНК и амплификация гена *LMP1*. Из собранных после центрифугирования клеток СПР выделяли тотальную ДНК путём фенол-хлороформной депротенинизации (экстракции). Наличие и концентрацию ДНК ВЭБ в выделенных образцах анализировали методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ), описанным нами ранее [19]. Амплификацию гена *LMP1* проводили в два этапа с внешними и внутренними праймерами в соответствии с использованной нами ранее методикой [20]. Каждый ПЦР-продукт очищали на мини-колонке (QIAquick PCR Purification kit, cat. 28104, Qiagen, Германия) согласно инструкции производителя. Для ре-

акции использовали ~100–200 нг ПЦР-продукта; концентрацию ДНК оценивали визуально в агарозном геле. В качестве положительного контроля служила выделенная из клеточной линии LMP1-B95.8 (стандарт) ДНК в количестве 1 мкг, а отрицательного контроля – вода (H₂O).

Типирование ВЭБ. Детекцию нуклеиновой кислоты ВЭБ 1-го и 2-го типов осуществляли посредством гнёздной (гнездовой, или «вложенной») ПЦР (англ. nested PCR). Используемые праймеры продемонстрировали высокую специфичность и отсутствие перекрёстной реактивности с геномом человека, другими вирусами или микроорганизмами [21]. Пары праймеров были следующими:

1-й этап амплификации – 5'-AGG GAT GCC TGG ACA CAA GA-3' и 5'-TGG TGC TGC TGG TGG TGG CAA-3';

2-й этап амплификации:

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 осуществляли в смеси объёмом 24 мкл, которая включала: 3 мкл матрицы; 2,5 мкл 10x буфера для ПЦР (pH 8,3); 0,2 мкл ДНК-полимеразы; по 0,2 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата общим объёмом 0,2 мкл; 0,6 мкл внешних праймеров (в разведении 5 пкМ на 100 мкл) и 17,5 мкл стерильной H₂O. Проводимая в амплификаторе для ДНК Mastercycler Personal (Eppendorf, Германия) ПЦР-амплификация включала этап начальной денатурации при 94°C в течение 5 мин, затем 30 циклов: денатурация при 94°C на протяжении 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 первого раунда в качестве матрицы. Состав ПЦР-смеси был следующим: 2,5 мкл 10x буфера для ПЦР (pH 8,3); 0,2 мкл ДНК-полимеразы; по 0,2 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата общим объёмом 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). Программа для второго 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 линии человеческих клеток BL Namalva. Ампликоны обнаруживали с помощью электрофореза, используя 12 мкл образца в 1,5% агарозном геле с содержанием 1 мкг/мл бромида этидия (C₂₁H₂₀BrN₃). Ожидаемые размеры целевых фрагментов ВЭБ-1 и ВЭБ-2 составляли 497 и 165 п.н. соответственно. ПЦР-анализ повторяли дважды для каждого клинического образца.

Количественное измерение вирусной ДНК. Число копий ДНК ВЭБ в каждом СПР определяли посредством ПЦР-РВ, следуя методике, описанной в работе Y.M. Lo и соавт. [22]. Для построения калибровочных кривых использовали ДНК клеточной линии Namalva, содержащих 2 интегрированных вирусных генома; при этом исходили из соотношения 3,3 пг геномной ДНК на 1 копию нуклеиновой кислоты вируса [23]. Детали проведения реакции описаны нами ранее [24].

Секвенирование ПЦР-продуктов гена LMP1. Ампликоны LMP1 секвенировали в обоих направлениях. Процесс секвенирования осуществляли с применением набора реактивов ABI PRISM BigDye Terminator v. 3.1 (ThermoFisher Scientific, США) и последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3100-Avant (ThermoFisher Scientific). Обработку данных выполняли при помощи программ Chromas 230 и Vector NT (Invitrogen, США).

Классифицирование образцов гена LMP1. Нуклеотидные последовательности образцов LMP1, амплифицированные из смывов ротоглотки и транслированные в аминокислотные последовательности, подверглись анализу на основании известной в литературе классификации R.H. Edwards и соавт. [13]. Последняя сформирована на базе сиквенсного анализа транслированных последовательностей гена LMP1, полученных от имеющих ВЭБ-ассоциированные заболевания и здоровых вирусоносителей из различных географических регионов мира.

Статистический анализ. Количество копий ДНК ВЭБ в СПР участников исследуемых групп оценивали с использованием U-критерия Манна–Уитни. Результаты представляли в виде значений медиан с межквартильным интервалом (МКИ) (25-й и 75-й процентиля). При помощи точного теста Фишера (Fisher's exact test) рассчитывали точные величины *p* при сравнении числа инфицированных ВЭБ 1-го или 2-го типов; различия считали статистически значимыми при *p* ≤ 0,05. Вычисления производили с помощью статистических программных пакетов Statistica for Windows v10.0.

Результаты

Инфицированность ВЭБ в группах калмыков и славян, типы вируса. Проведённое исследование показало, что уровни инфицированности ВЭБ полости рта у представителей калмыков и славян приблизительно одинаковы (табл. 1). Значение медианы копий вирусной ДНК на 1 клетку СПР у представителей каждой этнической группы практически равнялось нулю (*M* = 0,007 и 0,000 соответственно) при незначительно различающихся МКИ. Указанные факты позволяют предположить, что показатели концентрации вируса в кровеносном русле сравниваемых групп также существенно не различаются.

Изучение типов вируса у представителей указанных популяций позволило выявить соотношение ВЭБ-1 и ВЭБ-2, а также концентрацию патогена в каждой из них (рис. 1).

Как следует из **рис. 1**, ВЭБ обоих типов в группе калмыков распределились приблизительно одинаково (52% для 1 и 48% – для 2-го типа вируса), в то время как у славян ВЭБ-1 доминировал по отношению к ВЭБ-2 (80,6 против 19,4% соответственно). Различие в этих показателях для 1-го и 2-го типов ВЭБ, обнаруженное у представителей обоих этносов, свидетельствует о том, что этнический, а возможно, географический и другие факторы могут существенно влиять на распространённость и соотношение типов ВЭБ в разных этнических популяциях РФ. Из **рис. 1** также видно, что в группе калмыков число смывов, содержащих копии вирусной ДНК (обоих типов) было несколько выше, чем у славян (70,2%; 33/47 против 48,6%; 18/37 соответственно). Указанный факт может быть объяснён большим количеством вирусосодержащих клеток в образцах СПР в первом случае.

Полиморфизм гена LMP1 ВЭБ у калмыков и славян. Распределение вариантов гена *LMP1* в изолятах вируса, полученных из биоматериала представителей калмыцкого и славянского этносов, отражает характер полиморфизма штаммов ВЭБ (в частности, в STAR областях изучаемых образцов онкобелка), циркулирующих в соответствующих популяциях (**табл. 2**). Анализ нуклеотидных и дедуктивных аминокислотных последовательностей 29 ампликонов *LMP1*, полученных из СПР калмыков ($n = 50$) и славян ($n = 40$), выявил определённые черты сходства. Во всех случаях доминировали образцы *LMP1*, относящиеся к его прототипному варианту LMP1-B95.8 (75,9 и 82,5% соответственно). В обеих этнических группах обнаружены и другие разновидности белка: Med– (3,4 и 2,5% соответственно) и NC (3,4 и 7,5% соответственно). Отличие же состояло в том, что вариант China выявлялся только у славян (75,9%), а Med+ – среди калмыков. Обе эти разновидности характеризуются наличием так называемой Сао-делеции (по названию варианта гена *LMP1* Сао, амплифицированного из опухолевой ткани больного с NPC в 2000-х гг.) и относятся к высоко трансформирующим вариантам [25].

Сиквенный анализ амплифицированных образцов *LMP1* группы калмыков позволил в 6 образцах из 29 (20,7%) обнаружить в области STAR2 (С-терминальная активирующая область, С-terminal activator region) Сао-ассоциированную замену S366A/T, а в области STAR3 (8 проб из 29) – замену S309T/N. Следует отметить, что 5 проб этой группы *LMP1* содержали делецию 30 п.н. (позиции 326–355), формирующую, в свою очередь, характерную для варианта del-LMP1 делецию 10 аминокислот [26]. О том, насколько подобные мутации типичны для всей указанной популяции, вероятно, можно будет судить при существенном расширении выборки наблюдений.

Генотипирование изолятов ВЭБ в образцах группы этнических калмыков. Известно, что С-концевой домен *LMP1* имеет три С-терминальных активирующих области, инициирующих процессы передачи сигналов: STAR1 (регион 191–232 а.о.), STAR2 (351–386 а.о.) и расположенную между ними STAR3 (275–330 а.о.). Показано также, что этот домен содержит различное число повторов (мотивов), состоящих из локализованных между позициями 253 и 306 а.о. 11 аминокислот (PQDPDNTDDNG) [11, 27]. При этом прототипный вариант LMP1-B95.8 содержит 4 аналогичных фрагмента, а также 2 вставки из 5 аминокислот (PHDPL): между 2 и 3 повторами (275–279 а.о.) и после последнего повтора (302–306 а.о.). Высокотрансформирующий вариант LMP1-Сао несёт 7 указанных повторов и вставку PHDPL, локализованную также после последнего повтора. Значение изменения количества повторяющихся участков PQDPDNTDDNG до настоящего времени не известно. Состоящая же из 5 аминокислот вставка представляет собой так называемый JAK3-сайт области STAR3 (275–330 а.о.), предположительно участвующей в JACK3/STAT-сигналинге [23, 27].

Анализ 29 образцов *LMP1*, полученных из СПР этнических калмыков, позволил в 24 (82,3%) случаях выявить структуру, состоящую из фрагмента в 11 аминокислот и вставки PHDPL, подобную прототипному варианту LMP1-B95.8 (**рис. 2**).

Остальные 5 образцов содержали 7 повторов из 11 аминокислот и вставку 5 фрагментов PHDPL так-

Таблица 1. Инфицированность полости рта вирусом Эпштейна–Барр в группах калмыков и славян

Table 1. The rate of Epstein–Barr virus infection of the oral cavity of the Kalmyks and Slavs

Показатель Parameter	Этнические калмыки, Республика Калмыкия Ethnic Kalmyks, Republic of Kalmykia	Этнические славяне, Московская область Ethnic Slavs, Moscow Region
Число обследованных, мужчины/женщины (n) Number of persons studied, male/female (n)	19/31	15/25
Средний возраст (годы) Average age (years)	38,8	34,7
Число копий вируса на 1 клетку смыва полости рта Number of virus copies per 1 cell of oral cavity wash sample	МКИ/IQR = 0,000–0,184 Медиана/Median = 0,007	МКИ/IQR = 0,000–0,257 Медиана/Median = 0,000
Всего Total	50	40

Примечание. МКИ – межквартильный интервал.

Note. IQR, interquartile range.

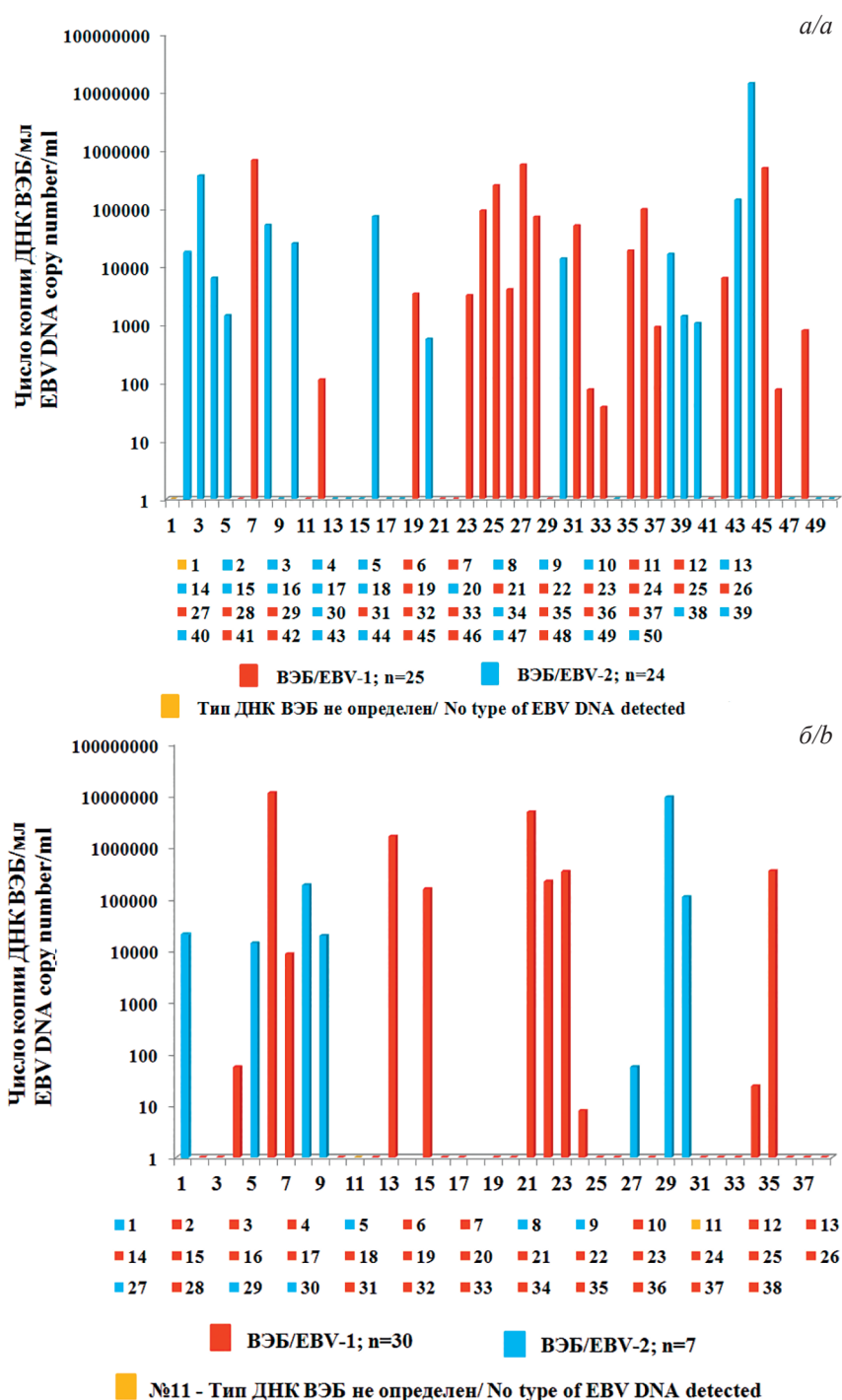


Рис. 1. Типы вируса Эпштейна–Барр и концентрация ДНК в 1 мл смыва полости рта: *а* – в группе калмыков; *б* – в группе славян.
Fig. 1. Epstein–Barr virus types and DNA concentrations per 1 ml of oral cavity wash sample: *a*, in the Kalmyk group; *b*, in the Slavic group.

же после последнего повтора. Точечные (сайт-специфические) мутации D (Asp, аспарагиновая кислота) → G (Gly, глицин) в области повторов PQDPDNTDDMG наблюдали в 7 образцах.

На основании полученных данных можно заключить, что образцы LMP1 из группы калмыков обладают структурой повторяющихся элементов, подобной вариантам LMP1-B95.8 африканского и японского

происхождения [28]. Однако, в отличие от японских разновидностей белка, у вариантов LMP1 из РК встречаются точечные замены D→G, как и в LMP1-образцах других российских изолятов [28]. Различие в числе повторов фрагмента PQDPDNTDDMG и вставок PNDPL (JAK3-мотива) объясняется рекомбинациями, имеющими место в процессе репликации вируса [27]. Существуют также гипотезы, предполагающие зави-

Таблица 2. Полиморфизм гена *LMP1* в изолятах вируса Эпштейна–Барр из смывов полости рта в группах калмыков и славян
Table 2. *LMP1* gene polymorphism in Epstein–Barr virus isolates from oral cavity wash samples in groups of Kalmyks and Slavs

Число обследованных (<i>n</i>) Number of persons studied (<i>n</i>)	Число образцов <i>LMP1</i> (<i>n</i> %) Number of <i>LMP1</i> samples (absolute value/percentage)	Варианты <i>LMP1</i> по классификации Edwards и соавт. (1999) [13] из числа положительных образцов <i>LMP1</i> variants according to classification of Edwards et al. (1999) [13] out of positive samples					Мутации в областях STAR гена <i>LMP1</i> (позиции а.о.) (<i>n</i> %) Mutations in STAR regions of the <i>LMP1</i> gene (aa positions) (absolute value/percentage)		
		B95.8	China	Med+	Med–	NC	STAR1 191–232	STAR2 351–386	STAR3 275–330
Этнические калмыки, Республика Калмыкия Ethnic Kalmyks, Republic of Kalmykia									
50	29 (58,0)	22/29 (75,9%)	0/29 (0,0%)	5/29 (17,2%)	1/29 (3,4%)	1/29 (3,4%)	0 (0,0%)	S366A/T: 6/29 (20,7%)	S309T/N: 8/29 (27,6%)
Этнические славяне, Московская область Ethnic Slavs, Moscow region									
40	40 (100,0)	33/40 (82,5%)	3/40 (7,5%)	0/40 (0,0%)	1/40 (2,5%)	3/40 (7,5%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)

Примечание. STAR – С-терминальная активирующая область. B95.8, China, Med+, Med–, NC – варианты *LMP1* ВЭБ.

Note. STAR, C-terminal activator region. B95.8, China, Med+, Med–, NC are EBV *LMP1* variants.

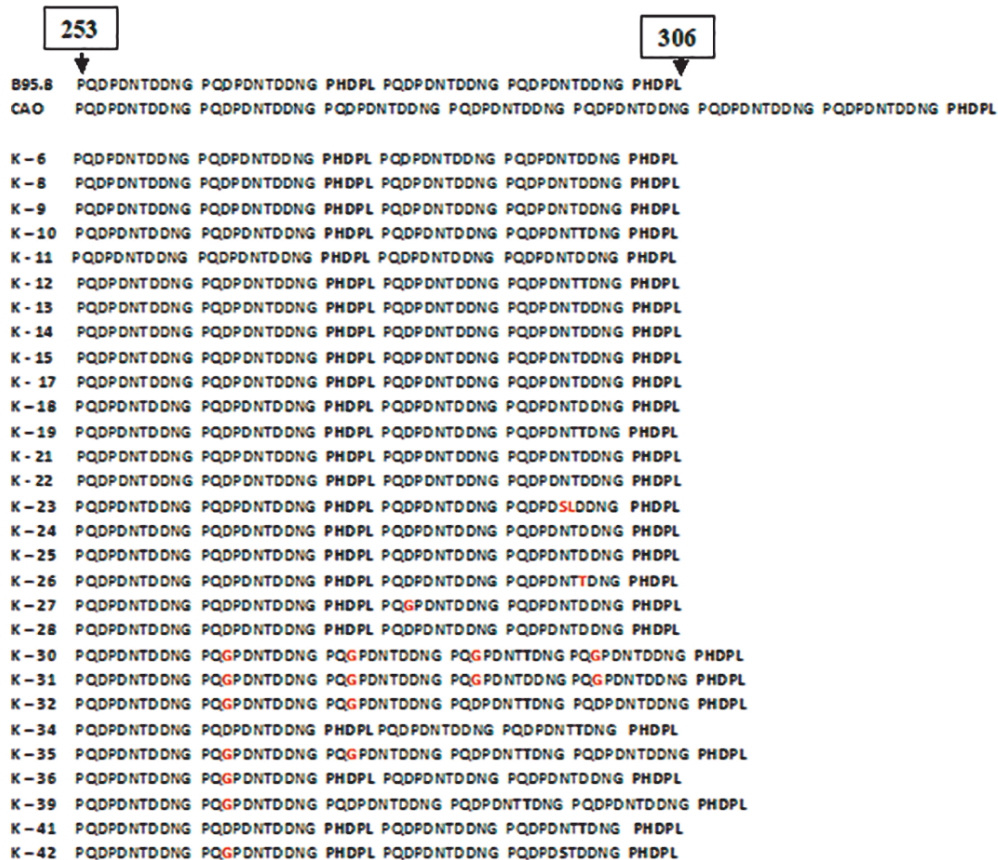


Рис. 2. Варианты повторов участков из 11 аминокислот в С-концевом домене изолятов гена *LMP1* вируса Эпштейна–Барр в группе этнических калмыков (Республика Калмыкия).

Примечание. B95.8, Ca0 – варианты гена *LMP1*; K-6–K-42 – кодовое обозначение изолятов *LMP1* группы калмыков; PQDPDNTDDNG – повторяющаяся группа 11 аминокислот; PHDPL – вставка из 5 последовательностей аминокислот (выделена жирным); D→G – точечные (сайт-специфические) мутации в области фрагмента из 11 аминокислот (позиции выделены красным цветом). Названия аминокислот даны в соответствии с международной номенклатурой.

Fig. 2. Variants of 11 amino acid repeat fragments in the C-terminal domain of Epstein–Barr virus *LMP1* gene in isolates from a group of ethnic Kalmyks, Republic of Kalmykia.

Note. B95.8, Ca0 are variants of the *LMP1* gene; K-6–K-42, coding for *LMP1* isolates from the Kalmyk group; PQDPDNTDDNG, repeat fragment of 11 amino acid residues; PHDPL, insertion of 5 amino acid residues (highlighted in bold); D→G, point (site-specific) mutations in 11 amino acid fragment (positions highlighted in red). The names of the amino acids are given according to the international nomenclature.

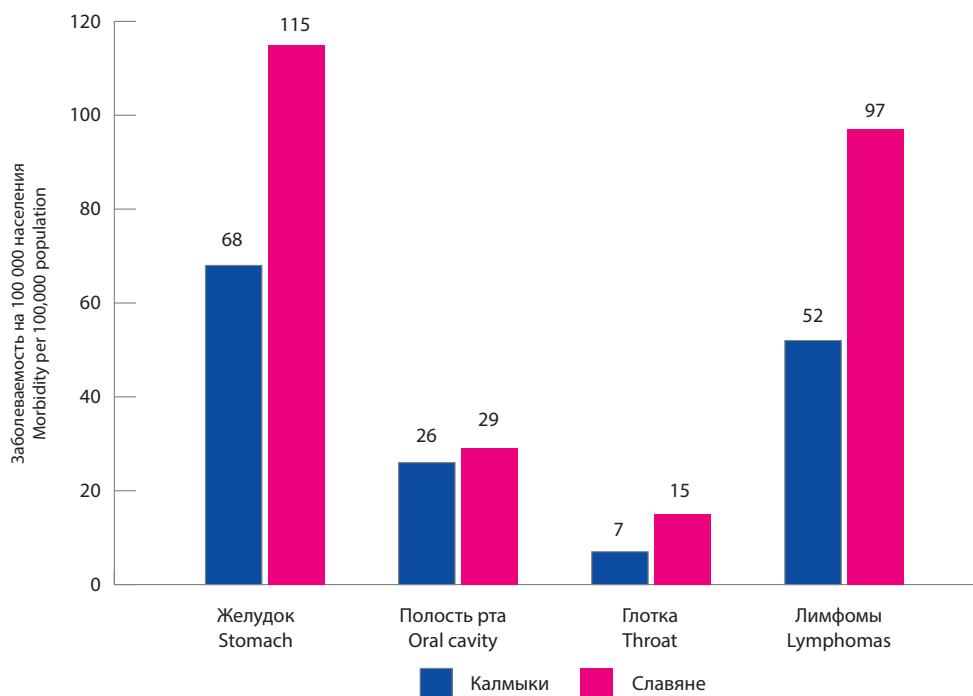


Рис. 3. Заболеваемость злокачественными опухолями, частично ассоциированными с вирусом Эпштейна–Барр, у населения Республики Калмыкия и Московской области в 2019 г.

Fig. 3. Incidence of malignant tumors partially associated with Epstein-Barr virus in the population of the Republic of Kalmykia and Moscow Region in 2019.

симость мутационных изменений от географического происхождения штаммов ВЭБ [29].

Корреляция типов ВЭБ с заболеваемостью злокачественными опухолями. Анализ взаимосвязи между типами ВЭБ у представителей двух этносов и уровнями заболеваемости злокачественными новообразованиями различных локализаций в соответствующих популяциях показал, что (рис. 3) заболеваемость злокачественными новообразованиями желудка и лимфомами у славянского населения МО была примерно в 2 раза выше, чем у населения РК.

Доминирование трансформирующего *in vitro* типа ВЭБ-1 среди этнических славян позволило предположить наличие более высокой заболеваемости соответствующими новообразованиями в МО (с весьма значительной долей славянского населения) по сравнению РК, где калмыки составляют 57,4%, при том, что представители обеих этнических групп инфицированы обоими типами ВЭБ примерно в равном соотношении. Действительно, стандартизованные показатели заболеваемости на 100 тыс. населения МО раком желудка, полости рта, глотки и злокачественными лимфомами, (среди которых встречались ВЭБ-ассоциированные случаи), были существенно выше, чем у населения РК (115, 29, 15 и 97 против 68, 26, 7 и 52 соответственно); различия, однако, оказались статистически недостоверными ($p > 0,05$). Полученные данные находятся в соответствии с зарубежными публикациями, согласно которым в странах с преобладающим распространением вируса 1-го типа, обладающего (в отличие от ВЭБ-2) способностью

трансформировать В-клетки *in vitro*, повышенная заболеваемость ВЭБ-ассоциированными опухолями не установлена [30]. По мнению ряда авторов, распространение вируса 2-го типа, характеризующегося Т-клеточным тропизмом, также не сопровождается ростом частоты ВЭБ-ассоциированных нозологических форм у населения [31].

Обсуждение

ВЭБ этиологически связан с развитием доброкачественных и злокачественных новообразований человека, характеризующихся их разнообразием и неоднородным распределением по всему миру. Изучение полиморфизма генов, влияющих на биологические функции вируса, призвано объяснить географические различия рисков возникновения ВЭБ-ассоциированных заболеваний, установить роль вируса в их возникновении и тем самым способствовать созданию эффективной вакцины против этого агента.

Полученные нами в настоящем и предыдущих исследованиях результаты свидетельствуют о том, что у этносов одной и той же страны (Российской Федерации) оба типа ВЭБ могут персистировать в разных соотношениях. В частности, по нашим данным, среди адыгейцев, проживающих на территории Республики Адыгея [32], доминирует тип 2 вируса (81%), в популяциях славян МО и татар Республики Татарстан [19] преобладает ВЭБ-1 (81 и 71% соответственно), а у калмыков РК наблюдается приблизительно равное распределение обоих типов (52 и 48% соответственно). Факт и характер инфицирования ВЭБ того или

инога типа, по-видимому, зависят от многих причин, включая генотип этносов, который, вероятно, способен определять исход инфекции, проявляющейся либо в форме хронического вирусоносительства, либо ВЭБ-ассоциированной патологии.

Результаты работы показали, что обнаружение у представителей обоих этносов того или иного типа ВЭБ не оказывает влияния на показатели заболеваемости опухолями (среди которых встречаются ВЭБ-ассоциированные случаи) у населения, представляющих соответствующие этнические группы. Отсутствие подобных ассоциаций объясняется прежде всего малым (в большинстве ситуаций) количеством ВЭБ-позитивных случаев среди анализируемых новообразований (рак желудка, полости рта, глотки и злокачественные лимфомы), не относящихся к категории высокоассоциированных с ВЭБ, как, например, NPC. Помимо этого, население как РК, так и МО состоит из представителей различных этносов, среди которых этнические калмыки и славяне составляют лишь некоторую часть (см. Дополнение). Показатели онкологической заболеваемости для этих регионов являются обобщёнными, отражающими структуру их этнически разнородных жителей. Следовательно, онкозаболеваемость всего населения указанных регионов не может быть связана с действием определённого типа ВЭБ, детектированного у выбранных этнических представителей. Различное соотношение ВЭБ-1 и ВЭБ-2 среди них также существенно не повлияло ни на спектр обнаруживаемых вариантов гена *LMP1*, ни на структуру повторяющихся элементов кодируемого им онкобелка.

Таким образом, анализ совокупности полученных данных делает возможным предположить, что штаммы ВЭБ, циркулирующие в двух этнических популяциях, обладают приблизительно одинаковыми биологическими свойствами. Обнаруженная же тенденция повышенной заболеваемости раком желудка, полости рта, глотки и злокачественными лимфомами у населения МО по отношению к жителям РК не связана с преимущественным распространением у представителей славян трансформирующего типа ВЭБ-1, а скорее всего, обусловлена генетической предрасположенностью лиц, проживающих на территории МО, к перичисленным опухолям. Лишь определение процентного соотношения вирус-ассоциированных случаев среди этих новообразований у представителей конкретных этносов позволит подтвердить или опровергнуть факт влияния типов ВЭБ на развитие злокачественных опухолей в соответствующих популяциях. При отсутствии подобных данных существование охарактеризованной связи остаётся до конца не исследованной проблемой и требует дальнейшего изучения.

Заключение

Полученные в работе данные позволяют прийти к выводу о том, что каждый из 2 типов ВЭБ в разных популяциях может иметь как преимущественный, так и смешанный тип распространения, что, возможно, связано с конкретным этносом, в част-

ности его генотипом. Нельзя исключить влияние на этот процесс и других факторов, включая географический, – особенностей окружающей среды региона проживания. Продолжение исследований, направленных на анализ распространённости типов ВЭБ в других популяциях и прежде всего у больных с высокой частотой ВЭБ-ассоциированных злокачественных опухолей (например, NPC), с большой долей вероятности позволит раскрыть молекулярные и субмолекулярные механизмы воздействия каждого из типов вируса на инициацию и развитие канцерогенеза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Davison A.J., Eberle R., Ehlers B., Hayward G.S., McGeoch D.J., Minson A.C., et al. The order *Herpesvirales*. *Arch. Virol.* 2009; 154(1): 171–7. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0278-4>
2. Dolan A., Addison C., Gatherer D., Davison A.J., McGeoch D.J. The genome of Epstein–Barr virus type 2 strain AG876. *Virology.* 2006; 350(1): 164–70. <https://doi.org/10.1016/j.viro.2006.01.015>
3. Young L.S., Rickinson A.B. Epstein–Barr virus: 40 years on. *Nat. Rev. Cancer.* 2004; 4(10): 757–68. <https://doi.org/10.1038/nrc1452>
4. Moore P.S., Chang Y. Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. *Nat. Rev. Cancer.* 2010; 10(12): 878–89. <https://doi.org/10.1038/nrc2961>
5. McGeoch D.J. Molecular evolution of the γ -*Herpesvirinae*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2001; 356(1408): 421–35. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0775>
6. Sample J., Young L., Martin B., Chatman T., Kieff E., Rickinson A., 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. <https://doi.org/10.1128/JVI.64.9.4084-4092.1990>
7. Gratama J.W., Ernberg I. Molecular epidemiology of Epstein–Barr virus infection. *Adv. Cancer Res.* 1995; 67: 197–255.
8. Coleman C.B., Wohlford E.M., Smith N.A., King C.A., Ritchie J.A., Baresel P.C., et al. Epstein–Barr virus type 2 latently infects T cells, inducing an atypical activation characterized by expression of lymphotactic cytokines. *J. Virol.* 2015; 89(4): 2301–12. <https://doi.org/10.1128/JVI.03001-14>
9. Kaymaz Y., Oduor C.I., Yu H., Otiemo J.A., Ong'echa J.M., Moormann A.M., et al. Comprehensive transcriptome and mutational profiling of endemic Burkitt lymphoma reveals EBV type-specific differences. *Mol. Cancer Res.* 2017; 15(5): 563–76. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-16-0305>
10. Bentz G.L., Whitehurst C.B., Pagano J.S. Epstein–Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) C-terminal-activating region 3 contributes to LMP1-mediated cellular migration via its interaction with Ubc9. *J. Virol.* 2011; 85(19): 10144–53. <https://doi.org/10.1128/JVI.05035-11>
11. Li H.P., Chang Y.S. Epstein–Barr virus latent membrane protein 1: structure and functions. *J. Biomed. Sci.* 2003; 10(5): 490–504. <https://doi.org/10.1007/BF02256110>
12. Dawson C.W., Port R.J., Young L.S. The role of the EBV-encoded latent membrane proteins LMP1 and LMP2 in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma (NPC). *Semin. Cancer Biol.* 2012; 22(2): 144–53. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2012.01.004>
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. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9855>
14. Saechan V., Settheetham-Ishida W., Kimura R., Tiwawech D., Mitarnun W., Ishida T. Epstein–Barr virus strains defined by the latent membrane protein 1 sequence characterize Thai ethnic groups. *J. Gen. Virol.* 2010; 91(Pt. 8): 2054–61. <https://doi.org/10.1099/vir.0.021105-0>
15. Saechan V., Mori A., Mitarnun W., Settheetham-Ishida W., Ishida T. 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. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2006.01.018>

16. Gantuz M., Lorenzetti M.A., Chabay P.A., Preciado M.V. A novel recombinant variant of latent membrane protein 1 from Epstein Barr virus in Argentina denotes phylogeographical association. *PLoS One*. 2017; 12(3): e0174221. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174221>

17. Burrows J.M., Bromham L., Woolfit M., Piganeau G., Tellam J., Connolly G., et al. Selection pressure-driven evolution of the Epstein-Barr virus-encoded oncogene LMP1 in virus isolates from Southeast Asia. *J. Virol.* 2004; 78(13): 7131–7. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.13.7131-7137.2004>

18. Lin H.J., Cherng J.M., Hung M.S., Sayion Y., Lin J.C. Functional assays of HLA A2-restricted epitope variant of latent membrane protein 1 (LMP-1) of Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma of Southern China and Taiwan. *J. Biomed. Sci.* 2005; 12(6): 925–36. <https://doi.org/10.1007/s11373-005-9017-y>

19. Smirnova K.V., Senyuta N.B., Botezatu I.V., Dushenkina T.E., Lubenskaya A.K., Frolovskaya A.A., et al. Epstein-Barr virus in the ethnic Tatars population: the infection and sequence variants of LMP1 oncogene. *Успехи молекулярной онкологии*. 2018; 5(3): 65–74. <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2018-5-3-65-74>

20. Hahn P., Novikova E., Scherback L., Janik C., Pavlish O., Arkhipov V., et al. The LMP1 gene isolated from Russian nasopharyngeal carcinoma has no 30-bp deletion. *Int. J. Cancer*. 2001; 91(6): 815–21. [https://doi.org/10.1002/1097-0215\(200002\)9999:9999<::aid-ijc1122>3.0.co;2-w](https://doi.org/10.1002/1097-0215(200002)9999:9999<::aid-ijc1122>3.0.co;2-w)

21. Salahuddin S., Khan J., Azhar J., Khan J., Muhammad N. Prevalence of Epstein-Barr virus genotypes in Pakistani lymphoma patients. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2018; 19: 3153–9. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2018.19.11.3153>

22. Lo Y.M., Chan L.Y., Chan A.T., Leung S.F., Lo K.W., Zhang J. 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.

23. Lawrence J.B., Villnave C.A., Singer R.H. Sensitive, high-resolution chromatin and chromosome mapping in situ: presence and orientation of two closely integrated copies of EBV in a lymphoma line. *Cell*. 1988; 52(1): 51–61. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90530-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90530-2)

24. Botezatu I.V., Kondratova V.N., Shelepov V.P., Lichtenstein A.V. DNA melting analysis: application of the “open tube” format for detection of mutant *KRAS*. *Anal. Biochem.* 2011; 419(2): 302–8. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.08.015>

25. Смирнова К.В., Дидук С.В., Сенюта Н.Б., Гурцевич В.Э. Молекулярно-биологические свойства гена LMP1 вируса Эпштейна-Барр: структура, функции и полиморфизм. *Вопросы вирусологии*. 2015; 60(3): 5–13.

26. Scheinfeld A.G., Nador R.G., Cesarman E., Chadburn A., Knowles D.M. Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 oncogene deletion in post-transplantation lymphoproliferative disorders. *Am. J. Pathol.* 1997; 151(3): 805–12.

27. Miller W.E., Edwards R.H., Walling D.M., Raab-Traub N. Sequence variation in the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *J. Gen. Virol.* 1994; 75(Pt. 10): 2729–40. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-10-2729>

28. Kanai K., Satoh Y., Saiki Y., Ohtani H., Sairenji T. Difference of Epstein-Barr virus isolates from Japanese patients and African Burkitt's lymphoma cell lines based on the sequence of latent membrane protein 1. *Virus Genes*. 2007; 34(1): 55–61. <https://doi.org/10.1007/s11262-006-0010-y>

29. Senyuta N., Yakovleva L., Goncharova E., Scherback L., Diduk S., Smirnova K., et al. Epstein-barr virus latent membrane protein 1 polymorphism in nasopharyngeal carcinoma and other oral cavity tumors in Russia. *J. Med. Virol.* 2014; 86(2): 290–300. <https://doi.org/10.1002/jmv.23729>

30. Schuster V., Ott G., Seidenspinner S., Kreth H.W. Common Epstein-Barr virus (EBV) type-1 variant strains in both malignant and benign EBV-associated disorders. *Blood*. 1996; 87(4): 1579–85.

31. Khanim F., Yao Q.Y., Niedobitek G., Sihota S., Rickinson A.B., Young L.S. Analysis of Epstein-Barr virus gene polymorphisms in normal donors and in virus-associated tumors from different geographic locations. *Blood*. 1996; 88(9): 3491–501.

32. Лубенская А.К., Сенюта Н.Б., Ботезату И.В., Душенькина Т.Е., Лихтенштейн А.В., Гурцевич В.Э., Смирнова К.В. Вирус Эпштейна-Барр у адьгейцев и славян в России: типы вируса, варианты LMP1 и злокачественные новообразования. Материалы VI Всероссийской конференции по молекулярной онкологии, 21–23 декабря 2021 г., Москва. *Успехи молекулярной онкологии*. 2021; 4(8): 96–97.

REFERENCES

1. Davison A.J., Eberle R., Ehlers B., Hayward G.S., McGeoch D.J., Minson A.C., et al. The order *Herpesvirales*. *Arch. Virol.* 2009; 154(1): 171–7. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0278-4>

2. Dolan A., Addison C., Gatherer D., Davison A.J., McGeoch D.J. The genome of Epstein-Barr virus type 2 strain AG876. *Virology*. 2006; 350(1): 164–70. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.01.015>

3. Young L.S., Rickinson A.B. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat. Rev. Cancer*. 2004; 4(10): 757–68. <https://doi.org/10.1038/nrc1452>

4. Moore P.S., Chang Y. Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. *Nat. Rev. Cancer*. 2010; 10(12): 878–89. <https://doi.org/10.1038/nrc2961>

5. McGeoch D.J. Molecular evolution of the γ -*Herpesvirinae*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2001; 356(1408): 421–35. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0775>

6. Sample J., Young L., Martin B., Chatman T., Kieff E., Rickinson A., 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. <https://doi.org/10.1128/JVI.64.9.4084-4092.1990>

7. Gratama J.W., Ernberg I. Molecular epidemiology of Epstein-Barr virus infection. *Adv. Cancer Res.* 1995; 67: 197–255.

8. Coleman C.B., Wohlford E.M., Smith N.A., King C.A., Ritchie J.A., Baresel P.C., et al. Epstein-Barr virus type 2 latently infects T cells, inducing an atypical activation characterized by expression of lymphotactic cytokines. *J. Virol.* 2015; 89(4): 2301–12. <https://doi.org/10.1128/JVI.03001-14>

9. Kaymaz Y., Oduor C.I., Yu H., Otiemo J.A., Ong'echa J.M., Moormann A.M., et al. Comprehensive transcriptome and mutational profiling of endemic Burkitt lymphoma reveals EBV type-specific differences. *Mol. Cancer Res.* 2017; 15(5): 563–76. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-16-0305>

10. Bentz G.L., Whitehurst C.B., Pagano J.S. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) C-terminal-activating region 3 contributes to LMP1-mediated cellular migration via its interaction with Ubc9. *J. Virol.* 2011; 85(19): 10144–53. <https://doi.org/10.1128/JVI.05035-11>

11. Li H.P., Chang Y.S. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1: structure and functions. *J. Biomed. Sci.* 2003; 10(5): 490–504. <https://doi.org/10.1007/BF02256110>

12. Dawson C.W., Port R.J., Young L.S. The role of the EBV-encoded latent membrane proteins LMP1 and LMP2 in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma (NPC). *Semin. Cancer Biol.* 2012; 22(2): 144–53. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2012.01.004>

13. Edwards R.H., Seillier-Moiseiwitsch F., Raab-Traub N. Signature amino acid changes in latent membrane protein 1 distinguish Epstein-Barr virus strains. *Virology*. 1999; 261(1): 79–95. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9855>

14. Saechan V., Settheetham-Ishida W., Kimura R., Tiwawech D., Mitarnun W., Ishida T. Epstein-Barr virus strains defined by the latent membrane protein 1 sequence characterize Thai ethnic groups. *J. Gen. Virol.* 2010; 91(Pt. 8): 2054–61. <https://doi.org/10.1099/vir.0.021105-0>

15. Saechan V., Mori A., Mitarnun W., Settheetham-Ishida W., Ishida T. 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. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2006.01.018>

16. Gantuz M., Lorenzetti M.A., Chabay P.A., Preciado M.V. A novel recombinant variant of latent membrane protein 1 from Epstein Barr virus in Argentina denotes phylogeographical association. *PLoS One*. 2017; 12(3): e0174221. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174221>

17. Burrows J.M., Bromham L., Woolfit M., Piganeau G., Tellam J., Connolly G., et al. Selection pressure-driven evolution of the Epstein-Barr virus-encoded oncogene LMP1 in virus isolates from Southeast Asia. *J. Virol.* 2004; 78(13): 7131–7. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.13.7131-7137.2004>

18. Lin H.J., Cherng J.M., Hung M.S., Sayion Y., Lin J.C. Functional assays of HLA A2-restricted epitope variant of latent membrane protein 1 (LMP-1) of Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma of Southern China and Taiwan. *J. Biomed. Sci.* 2005; 12(6): 925–36. <https://doi.org/10.1007/s11373-005-9017-y>

19. Smirnova K.V., Senyuta N.B., Botezatu I.V., Dushenkina T.E., Lubenskaya A.K., Frolovskaya A.A., et al. Epstein-Barr virus in

- the ethnic Tatars population: the infection and sequence variants of LMP1 oncogene [*Virus Epshteyna-Barr u etnicheskikh tatar: infitsirovannost' i sikvensnye varianty onkogeny LMP1*]. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii*. 2018; 5(3): 65–74. <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2018-5-3-65-74> (in Russian)
20. Hahn P., Novikova E., Scherback L., Janik C., Pavlish O., Arkhipov V., et al. The LMP1 gene isolated from Russian nasopharyngeal carcinoma has no 30-bp deletion. *Int. J. Cancer*. 2001; 91(6): 815–21. [https://doi.org/10.1002/1097-0215\(200002\)9999:9999<::aid-ijc1122>3.0.co;2-w](https://doi.org/10.1002/1097-0215(200002)9999:9999<::aid-ijc1122>3.0.co;2-w)
 21. Salahuddin S., Khan J., Azhar J., Khan J., Muhammad N. Prevalence of Epstein–Barr virus genotypes in Pakistani lymphoma patients. *Asian Pac. J. Cancer Prev*. 2018; 19: 3153–9. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2018.19.11.3153>
 22. Lo Y.M., Chan L.Y., Chan A.T., Leung S.F., Lo K.W., Zhang J. 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.
 23. Lawrence J.B., Villnave C.A., Singer R.H. Sensitive, high-resolution chromatin and chromosome mapping in situ: presence and orientation of two closely integrated copies of EBV in a lymphoma line. *Cell*. 1988; 52(1): 51–61. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90530-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90530-2)
 24. Botezatu I.V., Kondratova V.N., Shelepov V.P., Lichtenstein A.V. DNA melting analysis: application of the “open tube” format for detection of mutant *KRAS*. *Anal. Biochem*. 2011; 419(2): 302–8. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.08.015>
 25. Smirnova K.V., Diduk S.V., Senyuta N.B., Gurtsevitch V.E.. Molecular biological properties of the Epstein-Barr virus LMP1 gene: structure, function and polymorphism. [*Molekulyarno-biologicheskie svoystva gena LMP1 virusa Epshteyna-Barra: struktura, funktsiya i polimorfizm*] *Voprosi Virusologii*. 2015; 60(3):5-13. (in Russian)
 26. Scheinfeld A.G., Nador R.G., Cesarman E., Chadburn A., Knowles D.M. Epstein–Barr virus latent membrane protein-1 oncogene deletion in post-transplantation lymphoproliferative disorders. *Am. J. Pathol*. 1997; 151(3): 805–12.
 27. Miller W.E., Edwards R.H., Walling D.M., Raab-Traub N. Sequence variation in the Epstein–Barr virus latent membrane protein 1. *J. Gen. Virol*. 1994; 75(Pt. 10): 2729–40. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-10-2729>
 28. Kanai K., Satoh Y., Saiki Y., Ohtani H., Sairenji T. Difference of Epstein–Barr virus isolates from Japanese patients and African Burkitt’s lymphoma cell lines based on the sequence of latent membrane protein 1. *Virus Genes*. 2007; 34(1): 55–61. <https://doi.org/10.1007/s11262-006-0010-y>
 29. Senyuta N., Yakovleva L., Goncharova E., Scherback L., Diduk S., Smirnova K., et al. Epstein–barr virus latent membrane protein 1 polymorphism in nasopharyngeal carcinoma and other oral cavity tumors in Russia. *J. Med. Virol*. 2014; 86(2): 290–300. <https://doi.org/10.1002/jmv.23729>
 30. Schuster V., Ott G., Seidenspinner S., Kreth H.W. Common Epstein–Barr virus (EBV) type-1 variant strains in both malignant and benign EBV-associated disorders. *Blood*. 1996; 87(4): 1579–85.
 31. Khanim F., Yao Q.Y., Niedobitek G., Sihota S., Rickinson A.B., Young L.S. Analysis of Epstein–Barr virus gene polymorphisms in normal donors and in virus-associated tumors from different geographic locations. *Blood*. 1996; 88(9): 3491–501.
 32. Lubenskaya A.K., Senyuta N.B., Botezatu I.V., Dushenkina T.E., Lichtenstein A.V., Gurtsevich V.E., Smirnova K.V. Epstein-Barr virus in Adyghes and Slavs in Russia: types of virus, LMP1 variants and malignancies. [*Virus Epshteyna-Barr u adygeytsev i slavyan v Rossii: tipy virusa, varianty LMP1 i zlokachestvennye novoobrazovaniya*] *Materialy VI Vserossiyskoy konferentsii po molekulyarnoy onkologii*, 21–23 dekabrya 2021 g., Moskva. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii*. 2021; 4(8): 96–97. (in Russian)