

Т.Г. Клочкова, В.И. Евтушенко

Внеклеточная свободноциркулирующая вирусная ДНК и новые возможности для диагностики онкологических заболеваний

ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А. М. Гранова»
МЗ РФ, Санкт-Петербург

Обзор посвящён использованию свободноциркулирующей ДНК (сцДНК) вируса Эпштейна-Барр (EBV) и папилломавируса (HPV) в диагностике онкологических заболеваний. Обобщены результаты исследований последних лет, свидетельствующие о перспективности разработки сцДНК EBV и HPV в качестве диагностических маркёров. Подробно проанализированы противоречия в исследованиях различных авторов, свидетельствующие о необходимости стандартизации исследований для внедрения этих новых маркёров в клиническую практику.

Ключевые слова: сцДНК, онкогенные вирусы, EBV, HPV, опухоли головы и шеи, лимфомы, рак носоглотки, орофарингеальный рак, рак шейки матки

В последнее десятилетие вырос интерес к изучению свободноциркулирующих ДНК (сцДНК) и их возможного диагностического значения. Основными источниками сцДНК в настоящее время принято считать апоптоз, некроз нормальных и опухолевых клеток и секрецию ДНК нормальными и/или трансформированными клетками. С тех пор, как было показано, что сцДНК онкологических больных содержит фракцию, несущую молекулярные маркеры опухоли [4], стабильно увеличивается количество исследований, разрабатывающих подходы к использованию сцДНК в диагностике опухолей. Такие характеристики, как малоинвазивность и возможность быстро получить результат, делают исследование опухолевой сцДНК в биологических жидкостях человека перспективным направлением оптимизации диагностики онкологических заболеваний. Появление методик выделения внеклеточной ДНК и новых методов анализа (секвенирования следующего поколения (NGS), цифровой ПЦР) в значительной степени стимулировали эти исследования.

В отдельное направление можно выделить исследования циркулирующей вирусной внеклеточной ДНК канцерогенных вирусов человека как маркёров опухолевого процесса. В настоящее время считается, что больше 10% всех случаев онкологических заболеваний че-

ловека могут иметь вирусное происхождение [31]. Как правило, вирус либо персистирует в опухоли, либо встраивается в её ДНК. Это даёт возможность предполагать, что сцДНК онкогенных вирусов может быть специфическим диагностическим маркёром для соответствующих опухолей.

К таким вирусам относится прежде всего вирус Эпштейна-Барр (EBV). EBV является опухолеобразующим вирусом при нескольких локализациях: В- и Т-клеточных лимфомах, раке носоглотки (РНГ), некоторых формах рака желудка (РЖ). В основе патогенеза EBV-содержащих опухолей лежит способность вируса переходить в латентную фазу жизненного цикла, задерживаться в клетке в виде эписомы и экспрессировать продукты, являющиеся вирусными онкогенами (белки EBNA1, -2, -3A, -3C, LMP1). Общей чертой всех EBV-ассоциированных опухолей является, по-видимому, клональность, т. е. опухоль происходит из единственной трансформированной EBV клетки и несёт в себе клоны вирусного генома [28, 50]. Кроме того, было показано, что у опухоленосителей большая часть сцДНК EBV имеет опухолевое происхождение [48]. Это позволяет использовать вирусную ДНК в качестве маркёра опухолевого процесса.

В наибольшей мере диагностическое значение сцДНК EBV исследовано для рака носоглотки (РНГ). Впервые предположение о том, что сцДНК EBV может быть диагностическим маркёром РНГ было сделано после исследований Mutirangura, Pornthanakasem, Theamboonlers et al. (1998) [42]. Авторы обнаружили фрагменты ДНК EBV в плазме пациентов с диагнозом РНГ, типировали их методом ПЦР и пришли к выводу, что эти участки ДНК EBV имеют опухолевое происхождение. В подтверждение этого вывода была обнаружена корреляция апоптоза в опухолевой ткани с наличием ДНК EBV в плазме пациентов. В дальнейшем другие авторы выявили сцДНК EBV у 55 из 57 больных РНГ методом количественной ПЦР в реальном времени [37]. При этом, сцДНК EBV ДНК практически отсутствовала в плазме людей из контрольной группы. Оказалось, что копийность ДНК EBV коррелировала со стадией заболевания и вероятностью

рецидива после лечения. В дальнейшем этими же авторами была дана молекулярная характеристика сцДНК EBV и подтверждено её опухолевое происхождение [14]. В исследовании Lin, Wang, Chen et al. (2004) [33] также была установлена прогностическая и предиктивная значимость сцДНК EBV, и, при этом, было сделано интересное наблюдение. Оказалось, что для некоторых больных, прошедших лечение, и не содержащих ДНК EBV в плазме после этого, в случае рецидива заболевания сцДНК EBV вновь появлялась в крови задолго до проявления клинических признаков болезни. Это дало возможность предположить, что определение сцДНК EBV можно использовать в качестве скринингового маркера для определения заболевания на бессимптомной доклинической стадии. В настоящее время, таким образом, крупные когортные исследования и клинические испытания ведутся в отношении сцДНК EBV в следующих направлениях: 1) прогностическая значимость маркера; 2) предиктивная значимость; 3) возможность использования сцДНК EBV для скрининга популяции в целях раннего обнаружения РНГ.

Ещё в 2010 году ESMO предложила считать определение концентрации ДНК вируса Эпштейна-Барр в плазме крови больных РНГ до начала лечения и после его окончания прогностически значимым (Минимальные клинические рекомендации Европейского общества медицинской онкологии (ESMO, Москва, 2010). С тех пор количество публикаций, посвящённых диагностическому значению определения сцДНК EBV при РНГ, непрерывно увеличивается. Подавляющая масса исследований по этой тематике выполняется в восточно-азиатском регионе, являющемся эндемичным для РНГ. Большое количество пациентов даёт возможность проводить в этом регионе обширные когортные и ретроспективные исследования [23, 46]. Ежегодно выполняются аналитические исследования в рамках мета-анализов [34, 66]. В свою очередь, для неэндемичных районов также было выявлено прогностическое значение уровня сцДНК EBV в плазме крови больных РНГ. Это направление представлено пока только одной работой [3] и требует более широких когортных исследований.

В последние годы было показано, что сцДНК EBV — более эффективный маркер, позволяющий следить за ходом лечения при радиотерапии, чем циркулирующие опухолевые клетки и антитела к капсиду EBV [1, 52, 56]. И хотя для утверждения сцДНК EBV в качестве стандартного предиктивного маркера РНГ необходимо проведение дорогостоящих многоцентровых исследований в ранге клинических испытаний [45], многие клиники мира в настоящий момент используют этот показатель для индивидуализации

лечения. Однако, результаты клинических исследований NPC-0502 неожиданно выявили неоднозначность сцДНК EBV как предиктивного маркера [11]. Оказалось, что, вопреки ожиданиям, продолжение терапии у больных с выявленной после первой очереди хеморадиотерапии сцДНК EBV в плазме не приводит к увеличению продолжительности жизни пациентов. Объяснение, возможно, заключалось в неудачно подобранных препаратах для терапии, поскольку, предположительно, проявлялись циркулирующие клоны, устойчивые к проводимому курсу. По-видимому, для успешной терапии необходим анализ мутаций в циркулирующих опухолевых клетках и подбор препарата на основании данной информации. Таким образом, ценность сцДНК EBV как предиктивного маркера на основе этих сведений несколько снижается.

Разработка высокочувствительного скринингового маркера РНГ является особенно важной, как отмечалось, для стран Юго-Восточной Азии, являющейся эндемичным районом для EBV-ассоциированных опухолей. В 2017 году в рамках государственных клинических испытаний в Гонконге было осуществлено проспективное скрининговое исследование с участием 20174 человек, которое показало, что сцДНК EBV является хорошим скрининговым маркером на бессимптомной стадии РНГ [13]. Однако, экономическая выгода скрининга групп риска и населения из эндемичных районов с помощью этого маркера пока обсуждается [36]. Одной из проблем, мешающих широкому использованию сцДНК EBV в качестве скринирующего маркера, является низкая прогностическая ценность (positive prognostic value, PPV). Так, в исследовании Chan, Woo, King et al., 2017 [13] она составила всего 11%. Это связано как с неуклонно снижающейся частотой случаев РНГ, так и с тем, что ДНК EBV может содержаться в плазме не только опухоленосителей, но и здоровых людей. Авторы другой работы высказали предположение, что ДНК EBV опухолевого происхождения, циркулирующая в плазме должна отличаться по молекулярным характеристикам от ДНК EBV неопухолевого происхождения [28]. В ходе данного исследования установили, что в плазме больных РНГ циркулировали более длинные фрагменты ДНК EBV и количество такой ДНК было больше, чем в плазме лиц, не страдающих РНГ, и параллельно определили пороговый уровень различий. Включение в тест этапа сравнения с этим пороговым уровнем подняло PPV с 11% до 19% в рамках исследования, что делает более перспективным использование сцДНК EBV для скрининга популяции в эндемичных районах.

Таким образом, наибольшую клиническую значимость в настоящий момент имеет использование сцДНК EBV в качестве прогностиче-

ского маркера. Значение сцДНК EBV для предсказания успеха лечения и широкого скрининга нуждается в дальнейших исследованиях.

Была также показана клиническая значимость сцДНК EBV при некоторых формах РЖ [51, 17]. Для РЖ диагностика ассоциированности с EBV имеет принципиальное значение для выбора метода лечения пациента, поскольку, EBV-ассоциированные опухоли, составляющие в разных регионах мира до 10 % всех опухолей желудка [6], в отличие от других форм РЖ, отвечают на иммунотерапию. Следует отметить, что во всех случаях наличие сцДНК EBV или возрастание её количества в плазме крови считаются негативным прогностическим маркером, хотя EBV-ассоциированные опухоли, как правило, имеют лучший прогноз по сравнению с опухолями той же локализации не связанными с EBV [51]. Также было показано, что количество сцДНК EBV убывает при результативном лечении и возрастает при рецидивах. Это делает сцДНК EBV перспективным маркером, указывающим на активность опухоли. Однако, при этом может возникнуть проблема, связанная с тем, что EBV может присутствовать в организме больного и неспецифично по отношению к опухоли. В случае РЖ эта проблема является решаемой, поскольку EBV-ассоциированные гастроканциномы являются опухолями клонального происхождения и все клетки этой опухоли и внеклеточная ДНК опухолевого происхождения содержат клон исходной последовательности EBV. Таким образом, для подтверждения происхождения сцДНК EBV достаточно в сомнительных случаях прибегнуть к анализу ДНК EBV из плазмы и опухоли методом NGS.

Исторически EBV связывали прежде всего с разными Т- и В-клеточными лимфомами. На протяжении ряда лет делаются попытки использовать сцДНК EBV в качестве диагностического маркера в EBV-ассоциированных лимфомах. Почти 20 лет назад было показано наличие сцДНК EBV в плазме пациентов с EBV-ассоциированными лимфомами: лимфомой Ходжкина [20], лимфомами, ассоциированными с трансплантацией [32], ВИЧ-ассоциированными лимфомами [53], лимфомой Бёркита и НК/Т-клеточной лимфомами [30]. За прошедшие годы в исследованиях разного уровня было показано, что сцДНК EBV может быть прогностическим и предиктивным маркером для НК/Т-клеточной [30, 57], Т-клеточной [22], детской В-клеточной неходжкинской лимфом [39]. Особенно хорошо исследована в этом отношении лимфома Ходжкина, взрослая и детская [60, 61]. Однако, вопрос о том, что в случае EBV-ассоциированных лимфом ДНК EBV в плазме крови больных имеет опухолевое происхождение, а не явля-

ется продуктом амплификации вируса в неопухолевых клетках, остаётся открытым. Ещё меньше на сегодняшний момент исследована диагностическая роль ДНК EBV в плазме при редкой EBV-ассоциированной форме эпителиальной опухоли — лимфоэпителиоме лёгких. В исследовании Ngan, Yip, Cheng et al., 2002 [44] впервые показано наличие сцДНК EBV в плазме крови пациентов с этим диагнозом, а её возможное прогностическое значение было продемонстрировано лишь недавно [62].

Внеклеточная свободно циркулирующая ДНК другого онкогенного вируса человека — папилломавируса (HPV) также исследуется как возможный прогностический маркер ассоциированных с HPV заболеваний. Основным канцерогенным механизмом HPV является интеграция в геном клетки-хозяина, благодаря которой утрачивается ген-репрессор вирусных онкогенов *E6* и *E7*, причём место интеграции индивидуально для каждой опухоли, в редких же случаях вирус может оставаться в эписомальной форме [5]. Всё это относится только к типам HPV высокого канцерогенного риска. Ниже мы будем обсуждать результаты, полученные именно для этих типов HPV.

Наибольшее количество исследований относится к раку шейки матки (РШМ). Одновременно с представлениями о том, что HPV является этиологическим фактором для РШМ, появились и начали развиваться исследования возможности использования циркулирующего в крови вируса в качестве специфического опухолевого маркера. Первые работы были выполнены с использованием методов ПЦР или ПЦР в реальном времени, и частота обнаружения сцДНК HPV у опухоленосителей увеличивалась по мере совершенствования метода детекции. Так, в работе Dong, Pai, Rha et al., 2002 [18] это было выявлено только у 18% (10 из 55 пациентов), у 20% (4 из 20 пациентов) в исследовании Liu, Tsang, Yip et al., 2001 [35], 50% (25 из 50) в исследовании Yang, Liu, Tsang et al., 2004 [63]. Применение метода детекции следующего поколения — капельного цифрового ПЦР (ddPCR) — позволило ещё больше повысить частоту обнаружения сцДНК HPV в плазме больных РШМ. Например, метод ddPCR дал возможность выявить ДНК HPV у 39 из 47 пациентов (83%) в плазме, причём авторы отмечали, что уровень позитивности возрастает, если образцы плазмы до анализа хранились при температуре не выше -80°C [25]. При этом, в эксперименте участвовали образцы пациентов, находящихся на разных стадиях заболевания. Авторы другой работы, взяв в своё ретроспективное исследование только сыворотки пациентов с метастазами, обнаружили у 100% пациентов (19/19) сцДНК

HPV [26]. Таким образом, технический прогресс в области детекции ДНК позволил приблизить чувствительность обнаружения HPV в плазме или сыворотке крови к требуемой в клинической практике. Следует отметить, что в большинстве исследований обнаружена корреляция наличия или количества сцДНК HPV с размером опухоли, стадией заболевания или успешностью лечения [43], что позволяет предполагать, что данный маркер может быть использован как предиктивный и прогностический.

Для использования сцДНК HPV в качестве маркера при РШМ следует преодолеть проблему специфичности, поскольку источником HPV в плазме крови могут быть не только клетки опухоли шейки матки. В большинстве работ было показано, что тип HPV (HPV16 или HPV18), обнаруженный в плазме/сыворотке крови, совпадал с типом HPV из опухолевой ткани [15, 26]. Для повышения специфичности анализа некоторые авторы предлагают детектировать состояние вируса (эписомальное или интегрированное в хозяйский геном с определением сайта интеграции) в сцДНК [5, 24]. Показано, что такая своеобразная «молекулярная подпись» может быть высокоспецифичным маркером, отражающим динамику опухоли.

HPV является этиологическим вирусом и для плоскоклеточного рака головы и шеи (ПРГШ), преимущественно орофарингеального (ОФР). Доля ОФР, вызванных HPV, в последние годы резко возросла, и, по некоторым оценкам, может достигать до 90% [40]. Особенностью ОФР, ассоциированного с HPV, является более лёгкое течение заболевания по сравнению с ОФР, вызванным другими причинами.

В одной из первых работ по выявлению сцДНК HPV при ОФР было исследовано 70 пациентов, страдающих плоскоклеточным раком головы и шеи [8]. При этом ДНК HPV16 была обнаружена у 9% пациентов в сыворотке крови. Авторы другой работы обнаружили, что из 200 образцов плазмы пациентов с ПРГШ 14% было HPV-позитивных; при этом был использован метод ПЦР в реальном времени [41]. В исследовании 40 пациентов с диагнозом ОФР с помощью того же метода было показано, что 65% из них содержат в плазме ДНК HPV до лечения [7]. С помощью цифрового ПЦР удалось обнаружить ДНК HPV в сыворотке 8 из 8 (100%) больных ПРГШ [25].

Показано, что наличие ДНК HPV в пуле свободноциркулирующей внеклеточной ДНК до лечения свидетельствует о благоприятном прогнозе заболевания [55], причем, наличие ДНК HPV в плазме/сыворотке после лечения коррелирует с плохим прогнозом и повышенной вероятностью рецидива [2, 29, 47]. Кроме того, было

продемонстрировано, что циркулирующая ДНК HPV присутствует в плазме крови пациентов с HPV-ассоциированными опухолями даже на субклинической стадии и её уровень коррелирует с динамикой опухоли [25].

Однако, до сих пор тесты на наличие сцДНК HPV в плазме/сыворотке больных ОФР не вошли в клиническую практику. Одной из причин этого является, видимо, недостаточная чувствительность тестов. Повысить чувствительность неинвазивного определения HPV высокого канцерогенного риска у пациентов с диагнозом ОФР можно, если одновременно анализировать наличие ДНК вируса в слюне пациента, как свидетельствует исследование Ahn, Chan, Zhang, 2014 [2]. Исследование ДНК слюны в целом является перспективным направлением в неинвазивной диагностике. Достаточно хорошая корреляция наличия маркеров HPV в ткани опухоли и ДНК в слюне или оральных смывах продемонстрировано в нескольких работах [9, 10, 59]. Однако, показано, что детекция HPV ДНК исключительно в слюне обладает меньшей чувствительностью, чем аналогичное исследование, выполненное только с использованием плазмы [58].

Отдельно стоит остановиться на анализе сцДНК онкогенных вирусов в моче. Этот метод является истинно неинвазивным по сравнению с малоинвазивными методами, использующими плазму/сыворотку, и, предположительно, может быть более информативным для урологических и генитальных опухолей. Как правило, анализ ДНК в моче предполагает определение суммарной ДНК из разных источников, как клеточной, так и свободноциркулирующей [38]. Наибольшее количество данных по диагностическому значению ДНК онкогенных вирусов получено для РШМ. В нескольких исследованиях показано, что наличие и тип HPV в моче хорошо коррелирует с данными, анализа цитологических образцов шейки матки [16, 27, 54]. Полученные результаты позволяют предполагать, что анализ мочи на наличие ДНК HPV — это удобный способ широкомасштабного скринирования населения на наличие HPV высокого канцерогенного риска. В исследовании Ducancelle, Legrand, Pivert et al., 2014 [19] генотип и вирусная нагрузка в моче и ткани шейки матки в высокой степени совпадали, а повышенное количество HPV в образцах мочи и ткани соответствовало наличию участков поражения слизистой оболочки шейки матки. Более специфичный маркер РШМ и предраковых состояний был предложен в другой работе, авторы которой показали, что типирование и определение метилированных паттернов ДНК HPV в моче (вместе с анализом ДНК клеток эпителия шейки матки) может быть полезно

при персонализированном подходе к диагностике предраковых состояний и РШМ [21].

Возможно, ДНК HPV в моче является перспективным диагностическим маркером и для опухоли другой локализации — рака предстательной железы (РПЖ). В моче больных РПЖ, получивших хирургическое лечение, папилломавирусная ДНК обнаружена в 50% случаев [65]. Данные исследований последних лет позволяют предполагать ассоциацию HPV и повышенного риска РПЖ [64], но диагностическое значение ДНК HPV в моче при РПЖ ещё предстоит установить.

сДНК вируса Эпштейна–Барр также была найдена в моче у больных РНГ [12]. Авторы другого исследования изучили диагностическую значимость этого маркера и показали, что уровень сДНК EBV в моче коррелировал с уровнем в плазме и изменялся параллельно уровню в плазме до и после лечения [49]. Это свидетельствует о высоком диагностическом потенциале сДНК EBV в моче. Следует всё же отметить, что чувствительность обнаружения ДНК EBV в моче была значительно ниже, чем в плазме в обоих исследованиях, а фрагменты ДНК, обнаруженные в моче, были короче по сравнению с фрагментами ДНК, полученными из плазмы, что, видимо, связано с прохождением трансуретрального барьера.

В качестве оценки мочи как материала для жидкой биопсии и анализа сДНК следует заметить, что по сравнению с плазмой/сывороткой, отбор мочи является неинвазивной процедурой, которую легко может произвести практически любой человек. Таким образом, моча является идеальным материалом для самообследования и может быть использована для быстрого скрининга большой популяции людей. Однако, в качестве источника свободно циркулирующих нуклеиновых кислот моча всё же уступает плазме/сыворотке из-за более агрессивного и нестабильного химического состава. Моча требует методически более сложного процесса выделения нуклеиновых кислот и выход их несколько меньше по количеству, фрагменты трансуретральной ДНК, кроме того, короче фрагментов сДНК, выделенных из плазмы [38].

В заключение следует отметить, что сДНК онкогенных вирусов является перспективным диагностическим маркером. Для широкого внедрения в клиническую практику исследований вирусной сДНК следует решить несколько методических вопросов: 1. Необходимо стандартизовать процедуру отбора биологического материала, поскольку состав биологических жидкостей очень сильно варьирует в зависимости от времени суток, питания и физиологического состояния организма. 2. Следует стандартизовать

процедуру выделения и анализа сДНК. 3. Для повышения информативности анализа следует разрабатывать наиболее специфичные варианты маркеров с учётом биологии каждого онкогенного вируса и основ его патологического действия. 4. Для каждого разрабатываемого маркера необходимы широкомасштабные исследования на больших когортах пациентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сенюта Н.Б., Игнатова А.В., Ломая М.В. и др. Вирус Эпштейна–Барр у больных раком носоглотки и здоровых лиц в двух географически различных регионах России // *Инфекция и иммунитет*. — 2017. — Т. 7. — С. 41–50.
2. Ahn S., Chan J., Zhang Z. et al. Saliva and plasma quantitative polymerase chain reaction-based detection and surveillance of human papillomavirus-related head and neck cancer. // *JAMA Otolaryngol. Head Neck Surg.* — 2014. — Vol. 140. — P. 846–854.
3. Alfieri S., Iacovelli N., Marcegaglia S. et al. Circulating pre-treatment Epstein-Barr virus DNA as prognostic factor in locally-advanced nasopharyngeal cancer in a nonendemic area // *Oncotarget*. — 2017. — Vol. 8. — P. 47780–47789.
4. Anker P., Mulcahy H., Qi Chen X. et al. Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients // *Cancer Metastasis Rev.* — 1999. — Vol. 18. — P. 65–73.
5. Campitelli M., Jeannot E., Peter M. et al. Human papillomavirus mutational insertion: specific marker of circulating tumor DNA in Cervical Cancer Patients // *PLoS ONE*. — 2012. — Vol. 7(8). — e43393. — doi:10.1371/journal.pone.0043393.
6. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma // *Nature*. — 2014. — Vol. 513. — P. 202–209.
7. Cao H., Banh A., Kwok S. Quantitation of human papillomavirus DNA in plasma of oropharyngeal carcinoma patients // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* — 2012. — Vol. 82(3). — P. e351–8. — doi: 10.1016/j.ijrobp.2011.05.061.
8. Capone R., Pai S., Koch W. et al. Detection and quantitation of human papillomavirus (HPV) DNA in the sera of patients with HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma // *Clin. Cancer Res.* — 2000. — Vol. 6. — P. 4171–4175.
9. Chai R., Lambie D., Verma M., Punyadeera C. Current trends in the etiology and diagnosis of HPV-related head and neck cancers // *Cancer Med.* — 2015. — Vol. 4. — P. 596–607.
10. Chai R., Lim Y., Frazer I. et al. A pilot study to compare the detection of HPV-16 biomarkers in salivary oral rinses with tumour p16INK4a expression in head and neck squamous cell carcinoma patients // *BMC Cancer*. — 2016. — Vol. 16. — P. 178.
11. Chan A., Hui E., Ngan R. et al. A multicenter randomized controlled trial (RCT) of adjuvant chemotherapy (CT) in nasopharyngeal carcinoma (NPC) with residual plasma EBV DNA (EBV DNA) following primary radiotherapy (RT) or chemoradiation (CRT) // *J. Clin. Oncol.* — 2017. — Vol. 35. — P. 6002.
12. Chan K., Leung S., Yeung S. et al. Quantitative analysis of the transrenal excretion of circulating EBV DNA in

- nasopharyngeal carcinoma patients // *Clin. Cancer Res.* — 2008. — Vol. 14. — P. 4809-4813.
13. Chan K., Woo J., King A. et al. Analysis of plasma Epstein-Barr virus DNA to screen for nasopharyngeal cancer // *N. Engl. J. Med.* — 2017. — Vol. 377. — P. 513–22.
 14. Chan K., Zhang J., Chan A. et al. Molecular characterization of circulating EBV DNA in the plasma of nasopharyngeal carcinoma and lymphoma patients // *Cancer Res.* — 2003. — Vol. 63. — P. 2028-2032.
 15. Cocuzza C., Martinelli M., Sina F. et al. Human papillomavirus DNA detection in plasma and cervical samples of women with a recent history of low grade or precancerous cervical dysplasia // *PLoS ONE.* — 2017. — Vol. 2(11). — P. e0188592.
 16. Combita A., Gheit T., Gonzalez P. et al. Comparison between urine and cervical samples for HPV DNA detection and typing in young women in Colombia // *Cancer Prev. Res. (Phila).* — 2016. — Vol. 9. — P. 766–771.
 17. Dennis Lo Y., Chan W., Ng E. et al. Circulating Epstein-Barr virus DNA in the serum of patients with gastric carcinoma // *Clin. Cancer Research.* — 2001. — Vol. 7. — P. 1856–1859.
 18. Dong S., Pai S., Rha S.-H. et al. Detection and quantitation of human papillomavirus DNA in the plasma of patients with cervical carcinoma // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* — 2002. — Vol. 11. — P. 3–6.
 19. Ducancelle A., Legrand M., Pivert A. et al. Interest of human papillomavirus DNA quantification and genotyping in paired cervical and urine samples to detect cervical lesions // *Arch Gynecol Obstet.* — 2014. — Vol. 290. — P. 299–308.
 20. Gallagher A., Armstrong A., MacKenzie J. et al. Detection of Epstein-Barr virus (EBV) genomes in the serum of patients with EBV-associated Hodgkin's disease // *Int. J. Cancer.* — 1999. — Vol. 84. — P. 442–448.
 21. Guerrero-Preston R., Valle B., Jedlicka A. et al. Molecular triage of premalignant lesions in liquid-based cervical cytology and circulating cell-free DNA from urine, using a panel of methylated human papilloma virus and host genes // *Cancer Prev. Res. (Phila).* — 2016. — Vol. 9. — P. 915–924.
 22. Haverkos B., Huang Y., Gru A. et al. Frequency and clinical correlates of elevated plasma Epstein-Barr virus DNA at diagnosis in peripheral T-cell lymphomas // *Int. J. Cancer.* — 2017. — Vol. 140. — P. 1899–1906.
 23. He S.-S., Wang Y., Bao Y. et al. Dynamic changes in plasma Epstein-Barr virus DNA load during treatment have prognostic value in nasopharyngeal carcinoma: a retrospective study // *Cancer Med.* — 2018. — Vol. 7. — P. 1110–1117.
 24. Holmes A., Lameiras S., Jeannot E. et al. Mechanistic signatures of HPV insertions in cervical carcinomas // *Genomic Medicine.* — 2016. — Vol. 1. — P. 16004. — doi:10.1038/npjgenmed.2016.4.
 25. Jeannot E., Becette V., Campitelli M. Circulating human papillomavirus DNA detected using droplet digital PCR in the serum of patients diagnosed with early stage human papillomavirus-associated invasive carcinoma // *J. Pathol.: Clin. Res.* — 2016. — Vol. 2. — P. 201–209.
 26. Kang Z., Stevanović S., Hinrichs C., Cao L. Circulating cell-free DNA for metastatic cervical cancer detection, genotyping, and monitoring // *Clin. Cancer Res.* — 2017. — Vol. 23. — P. 6856-6862.
 27. Keer S., Tjalma W., Pattyn J. et al. Human papillomavirus genotype and viral load agreement between paired first-void urine and clinician-collected cervical samples // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* — 2018. — Vol. 37. — P. 859–869.
 28. Lam W., Jiang P., Chan K. et al. Sequencing-based counting and size profiling of plasma Epstein-Barr virus DNA enhance population screening of nasopharyngeal carcinoma // *PNAS Latest Articles.* — 2018. — P. 1–10.
 29. Lee J., Garcia-Murillas I., Cutts R. et al. Predicting response to radical (chemo)radiotherapy with circulating HPV DNA in locally advanced head and neck squamous carcinoma // *Br. J. Cancer.* — 2017. — Vol. 117. — P. 876-883.
 30. Lei K., Chan L., Chan W. et al. Quantitative analysis of circulating cell-free Epstein Barr virus (EBV) DNA levels in patients with EBV-associated lymphoid malignancies // *Br. J. Haematol.* — 2000. — Vol. 111. — P. 239–246.
 31. Lévy P., Bartosch B. Metabolic reprogramming: a hallmark of viral oncogenesis // *Oncogene.* — 2016. — Vol. 35. — P. 4155–4164.
 32. Limaye A., Huang M., Atienza E. et al. Detection of Epstein-Barr virus DNA in sera from transplant recipients with lymphoproliferative disorders // *J. Clin. Microbiol.* — 1999. — Vol. 37. — P. 1113-1116.
 33. Lin J.-C., Wang W.-Y., Chen K. et al. Quantification of plasma Epstein-Barr virus DNA in patients with advanced nasopharyngeal carcinoma // *N. Engl. J. Med.* — 2004. — Vol. 350. — P. 2461-2470.
 34. Liu T., Zheng Z., Pan J. et al. Prognostic role of plasma Epstein-Barr virus DNA load for nasopharyngeal carcinoma: a meta-analysis // *Clin. Invest. Med.* — 2017. — Vol. 40. — P. E1-E12.
 35. Liu V., Tsang P., Yip A. et al. Low incidence of HPV DNA in sera of pretreatment cervical cancer patients // *Gynecol. Oncol.* — 2001. — Vol. 82. — P. 269-272.
 36. Li Y., Khin N., Chua M. The evolution of Epstein-Barr virus detection in nasopharyngeal carcinoma // *Cancer Biol. Med.* — 2018. — doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2017.0176.
 37. Lo Y., Chan L., Lo K. et al. Quantitative analysis of cell-free Epstein-Barr virus DNA in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma // *Cancer Res.* — 1999. — Vol. 59. — P. 1188-1191.
 38. Lu T., Li J. Clinical applications of urinary cell-free DNA in cancer: current insights and promising future // *Am J Cancer Res.* — 2017. — Vol. 7. — P. 2318–2332.
 39. Machado A., Da Silva Robaina M., Magalhães De Rezende L. et al. Circulating cell-free and Epstein-Barr virus DNA in pediatric B-non-Hodgkin lymphomas // *Leuk. Lymphoma.* — 2010. — Vol. 51. — P. 1020-1027.
 40. Mallen-St Clair J., Alani M., Wang M., Srivastan E. Human papillomavirus in oropharyngeal cancer: The changing face of a disease // *BBA.* — 2016. — Vol. 1866. — P. 141–150.
 41. Mazurek A., Rutkowski T., Fiszler-Kierzkowska A. et al. Assessment of the total cfDNA and HPV16/18 detection in plasma samples of head and neck squamous cell carcinoma patients // *Oral. Oncol.* — 2016. — Vol. 54. — P. 36–41.
 42. Mutirangura A., Pornthanakasem W., Theamboonlers A. et al. Epstein-Barr viral DNA in serum of patients with nasopharyngeal carcinoma // *Clin. Cancer Res.* — 1998. — Vol. 4. — P. 665-669.
 43. Nalliah S., Karikalan B., Kademane K. Multifaceted usage of HPV related tests and products in the management of

- cervical cancer // *Asian Pac. J. Cancer Prev.* — 2015. — Vol. 16. — P. 2145-2150.
44. Ngan R., Yip T., Cheng W.-W. et al. Circulating Epstein-Barr virus DNA in serum of patients with lymphoepithelioma-like carcinoma of the lung: a potential surrogate marker for monitoring disease // *Clin. Cancer Res.* — 2002. — Vol. 8. — P. 986–994.
 45. Peng H., Chen L., Chen Y.-P. et al. The current status of clinical trials focusing on nasopharyngeal carcinoma: A comprehensive analysis of ClinicalTrials.gov database // *PLoS ONE.* — 2018. — Vol. 13(5). — P. e0196730. — <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196730>.
 46. Peng H., Guo R., Chen L. et al. Prognostic impact of plasma Epstein-Barr virus DNA in patients with nasopharyngeal carcinoma treated using intensity-modulated radiation therapy // *Sci. Rep.* — 2016. — 22000. — doi: 10.1038/srep22000.
 47. Rutkowski T., Mazurek A., Śnietura M. et al. Post-Treatment circulating free HPV DNA as a marker of treatment outcome in patients with HPV-related oropharyngeal cancer after radio(chemo)therapy // *Cell. Mol. Med.* — 2017. — Vol. 3. — № 2. — P. 12. — doi: 10.21767/2573-5365.100035.
 48. Ryan J., Fan H., Swinnen L. et al. Epstein-Barr Virus (EBV) DNA in plasma is not encapsidated in patients with EBV-related malignancies // *Diagn. Mol. Pathol.* — 2004. — Vol. 13. — P. 61-68.
 49. Sengar M., Chorgha S., Jadhav K. et al. Cell-free Epstein-Barr virus-DNA in patients with nasopharyngeal carcinoma: plasma versus urine // *Head Neck.* — 2016. — Vol. 38. — Suppl 1. — P. E1666-1673.
 50. Shannon-Lowe C., Rickinson A., Bell A. Epstein-Barr virus-associated lymphomas // *Phil. Trans. R. Soc. B.* — 2017. — Vol. 372. — P. 20160271. — <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2016.0271>.
 51. Shoda K., Ichikawa D., Fujita Y. et al. Clinical utility of circulating cell-free Epstein-Barr virus DNA in patients with gastric cancer // *Oncotarget.* — 2017. — Vol. 8. — P. 28796-28804.
 52. Song Y., Xiao H., Yang Z. et al. The predictive value of pre- and post-induction chemotherapy plasma EBV DNA level and tumor volume for the radiosensitivity of locally advanced nasopharyngeal carcinoma // *EXCLI Journal.* — 2017. — Vol. 16. — P. 1268-1275.
 53. Stevens S., Vervoort M., van den Brule A. et al. Monitoring of Epstein-Barr virus DNA load in peripheral blood by quantitative competitive PCR // *J. Clin. Microbiol.* — 1999. — Vol. 37. — P. 2852-2857.
 54. Tshomo U., Franceschi S., Tshokey T. et al. Evaluation of the performance of Human Papillomavirus testing in paired urine and clinician-collected cervical samples among women aged over 30 years in Bhutan // *Virology J.* — 2017. — Vol. 14. — P. 74. — doi:10.1186/s12985-017-0744-2.
 55. Udager A., McHugh J. Human papillomavirus-associated neoplasms of the head and neck // *Surg. Pathol. Clin.* — 2017. — Vol. 10. — P. 35–55.
 56. Vo H., Nei W., Hu M., Phyo W. Comparison of circulating tumour cells and circulating cell-free Epstein-Barr virus DNA in patients with nasopharyngeal carcinoma undergoing radiotherapy // *Sci. Rep.* — 2016. — Vol. 6. — P. 13. — doi:10.1038/s41598-016-0006-3.
 57. Wang L., Wang H., Wang J. et al. Post-treatment plasma EBV-DNA positivity predicts early relapse and poor prognosis for patients with extranodal NK/T cell lymphoma in the era of asparaginase // *Oncotarget.* — 2015. — Vol. 6. — P. 30317-30326.
 58. Wang Y., Springer S., Mulvey C. et al. Detection of somatic mutations and HPV in the saliva and plasma of patients with head and neck squamous cell carcinomas // *Sci. Transl. Med.* — 2015. — Vol. 7(293). — P. 293ra104. — doi:10.1126/scitranslmed.aaa8507.
 59. Wasserman J., Rourke R., Purgina B. et al. HPV DNA in saliva from patients with SCC of the head and neck is specific for p16-positive oropharyngeal tumours // *J. Otolaryngol. Head Neck Surg.* — 2017. — Vol. 46. — P. 3. — doi: 10.1186/s40463-016-0179-6.
 60. Welch J., Schwartz C., Higman M. et al. Epstein-Barr virus DNA in serum as an early prognostic marker in children and adolescents with Hodgkin lymphoma // *Blood Adv.* — 2017. — Vol. 1. — P. 681–684.
 61. Westmoreland K., Montgomery N., Stanley C. et al. Plasma Epstein-Barr virus DNA for pediatric Burkitt lymphoma diagnosis, prognosis and response assessment in Malawi // *Int. J. Cancer.* — 2017. — Vol. 140. — P. 2509-2516.
 62. Xie M., Wu X., Wang F. et al. Clinical significance of plasma Epstein-Barr virus DNA in pulmonary lymphoepithelioma-like carcinoma (LELC) patients // *J. Thorac. Oncol.* — 2018. — Vol. 13. — P. 218-227.
 63. Yang H., Liu V., Tsang P. et al. Quantification of human papillomavirus DNA in the plasma of patients with cervical cancer // *Int. J. Gynecol. Cancer.* — 2004. — Vol. 14. — P. 903–910.
 64. Yang L., Xie S., Feng X. et al. Worldwide prevalence of human papillomavirus and relative risk of prostate cancer: a meta-analysis // *Sci. Rep.* — 2015. — Vol. 5. — P. 14667. — doi: 10.1038/srep14667.
 65. Zambrano A., Kalantari M., Simoneau A. et al. Detection of human polyomaviruses and papillomaviruses in prostatic tissue reveals the prostate as a habitat for multiple viral infections // *Prostate.* — 2002. — Vol. 53. — P. 263–276.
 66. Zhang J., Shu C., Song Y. et al. Epstein-Barr virus DNA level as a novel prognostic factor in nasopharyngeal carcinoma: A meta-analysis // *Medicine.* — 2016. — Vol. 95. — P. 40(e5130). — <http://dx.doi.org/10.1097/MD.0000000000005130>.

Поступила в редакцию 17.12.2018 г.

T.G. Klochkova, V.I. Evtushenko

Extracellular free-circulating viral DNA and new opportunities for the diagnosis of cancer

Russian Scientific Center for radiology and Surgical Technologies, St. Petersburg

The review focuses on the use of free-circulating DNA (fcDNA) of Epstein-Barr virus (EBV) and human papillomavirus (HPV) in the diagnosis of cancer. The results of researches of recent years indicate the perspective for the development of EBV and HPV scDNAs as diagnostic markers. Authors analyzed in details the contradictions in the various studies, indicating the need for standardization of research for the introduction of these new markers in clinical practice.

Key words: fcDNA, cancer viruses, EBV, HPV, head and neck tumors, lymphomas, nasopharyngeal cancer, oropharyngeal cancer, cervical cancer