

---

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

---

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.327.2-006.04-078

Гурцевич В.Э., Сениута Н.Б., Ломая М.В., Игнатова А.В., Душенькина Т.Е.,  
Репкина И.А., Павловская А.И., Мудунов А.М.

### СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ВИРУСА ЭПШТЕЙНА-БАРР У БОЛЬНЫХ РАКОМ НОСОГЛОТКИ В СЛУЧАЯХ НЕВЫЯВЛЕННОГО ПЕРВИЧНОГО ОЧАГА

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, г. Москва

В работе описан метод диагностики неороговевающего рака носоглотки (нРНГ) в случаях невыявленного первичного очага. Метод базируется на объективной оценке титров IgG- и IgA-антител к вирусному капсидному (ВКА) и раннему (РА) антигенам вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ), определяемых у больных с увеличенными шейными лимфатическими узлами или патологическими изменениями неясной природы в носоглотке. Диагноз нРНГ ставили с помощью так называемого решающего правила. Оно было создано на основе математической обработки с помощью многофакторного анализа результатов тестирования на антитела к ВЭБ у 72 больных с клинически и морфологически подтвержденным диагнозом нРНГ и в качестве контрольной группы — у 72 больных с другими опухолями головы и шеи (ДОГШ), не ассоциированными с ВЭБ. Проверка работы решающего правила, проведенная у 77 больных с подтвержденным диагнозом нРНГ (с целью выявления ложнонегативных случаев) и 231 больного ДОГШ и некоторыми инфекционными заболеваниями (с целью обнаружения ложнопозитивных случаев) показала его высокую диагностическую специфичность. Количество ложнонегативных случаев составило 5,2% (4/77), ложнопозитивных случаев — 6,5% (17/231). У больных нРНГ в случае невыявленного первичного очага получены следующие результаты. Из 32 больных с подозрением на РНГ у 11 на основании решающего правила был установлен диагноз нРНГ, подтвержденный впоследствии морфологическими и инструментальными исследованиями. Только в 2 случаях тестирование дало ложнонегативный результат (2/32; 6,3%). Это свидетельствует о том, что серодиагностика нРНГ с помощью решающего правила является высокоспецифичной, хотя и не безошибочной. Таким образом, можно сделать вывод, что оценка гуморального ответа у больных с подозрением на РНГ с применением решающего правила является важным дополнительным методом диагностики этого нового образования.

Ключевые слова: вирус Эпштейна-Барр; неороговевающий рак носоглотки; невыявленный первичный очаг опухоли; решающее правило для диагностики неороговевающего рака носоглотки; серологический ответ на антигены вируса Эпштейна-Барр.

Для цитирования: Гурцевич В.Э., Сениута Н.Б., Ломая М.В., Игнатова А.В., Душенькина Т.Е., Репкина И.А., Павловская А.И., Мудунов А.М. Серологические маркеры вируса Эпштейна-Барр у больных раком носоглотки в случаях невыявленного первичного очага. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(5):205-212.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-5-205-212

Gurtsevitch V.E., Senyuta N.B., Lomaya M.V., Ignatova A.V., Dushenkina T.E., Repkina I.A.,  
Pavlovskaya A.I., Mudunov A.M.

### DIAGNOSTIC VALUE OF THE EPSTEIN-BARR VIRUS SEROLOGICAL MARKERS IN PATIENTS WITH NASOPHARYNGEAL CARCINOMA IN CASES OF UNDETECTABLE PRIMARY TUMOR LOCATION

FSBI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center», Moscow, 115478, Russian Federation

The goal of this work was to describe a method for diagnosis of the non-keratinizing nasopharyngeal carcinoma (nNPC) in cases of the undetectable primary tumor location. The method is based on evaluation of IgG and IgA antibody levels to the capsid (VCA) and early antigens (EA) of the Epstein-Barr virus (EBV). The diagnosis of nNPC is established by a so-called decision rule. The latter was created by mathematical processing of the method of multifactor analysis of the results of anti-EBV antibody testing of 72 patients with clinically and morphologically confirmed nNPC and 72 patients with other head and neck benign tumors (OHNT) not associated with EBV, which were tested as a control group. The diagnostic value of the decision rule which was tested in the group of 77 patients with confirmed nNPC and 231 patients of a control group was high. The numbers of false negative and false positive cases were equal to 5.2% (4/77) and 6.5% (17/231), respectively. Among 32 patients with undetectable primary tumors the decision rule was able to identify 11 cases of nNPC. This diagnosis later was confirmed by morphological and instrumental methods of study. Only in two cases, false negative result was obtained (2/32; 6.3%) indicating that the serological diagnostics of nNPC with the decision rule is highly specific but not exact. Thus, the data obtained allowed us to conclude that the serological testing of EBV specific antibody evaluated by the decision rule can be recommended as an important test supplementing the standard methods of pNPC diagnostics including cases with undetected primary tumor location.

Key words: Epstein-Barr virus (EBV); non-keratinizing carcinoma of nasopharynx (nNPC); undetectable primary tumor location; the decision rule for nNPC diagnostics; serological response to EBV antigens.

Для корреспонденции: Гурцевич Владимир Эдуардович, д-р мед. наук, проф., зав. лаб. вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, г. Москва. E-mail: gurvld532@yahoo.com

**For citation:** Gurtsevitch V.E., Senyuta N.B., Lomaya M.V., Ignatova A.V., Dushenkina T.E., Repkina I.A., Pavlovskaya A.I., Mudunov A.M. Diagnostic value of the Epstein–Barr virus serological markers in patients with nasopharyngeal carcinoma in cases of undetectable primary tumor location. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(5): 205-212. (In Russ.).

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-5-205-212

**For correspondence:** Vladimir E. Gurtsevitch, Doctor of medical Sciences, professor, Head, laboratory of viral carcinogenesis, Institute of Carcinogenesis, «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center», Moscow, 115478, Russian Federation. E-mail: gurvlad532@yahoo.com

**Information about authors:** Gurtsevitch V.E., <https://orcid.org/0000-0003-1840-4364>  
Mudunov A.M., <https://orcid.org/0000-0002-0918-3857>.

**Funding.** The study was supported by RFBR grant 13-04-00063.

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

Received 16 February 2016  
Accepted 29 March 2016

## Введение

Выраженная связь между вирусом Эпштейна-Барр (ВЭБ) и раком носоглотки (РНГ), обнаруженная у больных в южных провинциях Китая, позволила впервые высказать предположение о принципиальной возможности использовать серологические маркеры вируса для диагностики этой опухоли [1]. В исследованиях, проведенных в 1978 г. Н. Но и соавт. [2], было показано, что для диагностики РНГ могут быть успешно использованы IgA-антитела к вирусному капсидному антигену (ВКА) ВЭБ (ВКА/ВЭБ) в титрах 1:10 и выше. Несколько менее выраженной, но достаточной диагностической ценностью обладали также IgG- и IgA-антитела к раннему антигену (РА) вируса [3, 4].

Антитела к ВКА/ВЭБ, относящиеся к иммуноглобулинам класса А, оказались полезными и для ранней диагностики РНГ. Их высокая диагностическая ценность была продемонстрирована при массовом обследовании населения в одной из южных провинций Китая (Гуанси). Из 148 тыс. лиц в возрасте старше 30 лет указанный маркер вируса был обнаружен у 1267. Анализ биопсийного материала, полученный из ротоглотки 203 из них, позволил установить наличие неороговевающего РНГ (нРНГ) в 46 случаях [5], причем у половины выявленных больных была диагностирована только I или II стадия болезни. Клиническое наблюдение за оставшимися IgA-серопозитивными лицами позволило в течение следующих 18 мес выявить еще 12 случаев РНГ [6]. Дальнейшие исследования показали, что, кроме южных провинций Китая, высокие и промежуточные уровни заболеваемости РНГ зарегистрированы в странах Юго-Восточной Азии, Северной Африки, среди населения инуитов Аляски, Гренландии и Северной Канады, а также мигрантов китайского и филиппинского происхождения [7]. Вне эндемичных районов это новообразование встречается довольно редко. Например, среди населения Колумбии, США, Финляндии, Зимбабве, Индии и Японии показатели заболеваемости РНГ в 1998—2002 гг. были в 30—60 раз ниже, чем среди населения Гонконга, относящегося к регионам высокого риска [8]. РНГ является редким заболеванием и среди населения стран бывшего СССР, включая Россию. В частности, в структуре злокачественных новообразований у больных в России в 2006 г. на долю опухолей носоглотки у мужчин приходилось 0,15%, у женщин — 0,08% [9].

В классификации ВОЗ 2005 г. выделяют 3 гистологических типа РНГ [10]: тип 1 — неороговевающий рак (non-keratinizing carcinoma), нРНГ; тип 2 — ороговева-

ющий плоскоклеточный рак (keratinizing squamous cell carcinoma); тип 3 — базалоидный плоскоклеточный рак (basaloid squamous cell carcinoma). К неороговевающему раку (гистологический тип 1) относятся 2 подтипа: недифференцированный (nondifferentiated non-keratinizing carcinoma) и дифференцированный (differentiated non-keratinizing carcinoma), клинически и прогностически не отличающиеся друг от друга. Распространенность каждого из типов рака зависит от географического региона. Типы РНГ 2 и 3, не ассоциированные с ВЭБ, как правило, преобладают в западной популяции, в то время как тесно ассоциированный с ВЭБ гистологический тип 1 в подавляющем большинстве случаев регистрируют в Южном Китае и странах Юго-Восточной Азии [11].

Поскольку Россия относится к регионам, не эндемичным по РНГ, проведение массовых серологических обследований населения с целью ранней диагностики этого заболевания не представляется целесообразным. В этих регионах выраженный гуморальный ответ на ВЭБ, вероятно, может быть использован достаточно эффективно на ранних этапах обследования больных для дифференцировки нРНГ от его иных гистологических типов, а также других опухолей головы и шеи (ДОГШ), не ассоциированных с ВЭБ. Особую клиническую ценность серологические маркеры ВЭБ, по-видимому, могут приобрести для обнаружения нРНГ в случае невыявленного первичного очага опухоли при ее метастазировании в лимфатические узлы шеи.

С учетом вышесказанного задачи данного исследования состояли в следующем:

— провести математический анализ различных значений титров IgG- и IgA-антител к антигенам ВЭБ, имеющих наибольшее значение для диагностики нРНГ в неэндемичном регионе (России); с помощью многофакторного анализа отобрать такие сочетания ВЭБ-специфических антител, которые в каждом конкретном случае позволят с высокой достоверностью дифференцировать нРНГ от других патологий, ДОГШ в частности;

— проверить диагностическую значимость отобранных для решающего правила серологических маркеров ВЭБ на группах больных с клинически и морфологически установленным диагнозом нРНГ, ДОГШ и некоторых инфекционных заболеваний;

— оценить с помощью решающего правила способность ВЭБ-специфической серологии диагностировать нРНГ при обследовании больных с метастазами в лимфатические узлы шеи при невыявленном первичном очаге.

## Материал и методы

**Материалы.** Материалом для исследования служили сыворотки (плазма) крови от 72 больных с клинически и морфологически установленным диагнозом нРНГ и 72 больных с подтвержденным диагнозом ДОГШ. Полученные данные использовали при создании решающего правила, применяемого для диагностики нРНГ. Для проверки специфичности диагностики нРНГ с помощью решающего правила использовали сыворотку (плазму) крови от 77 больных с клинически и морфологически установленным диагнозом нРНГ с целью выявления ложнонегативных случаев этой опухоли. Тестировали также сыворотку (плазму) крови от 171 больного ДОГШ, а также от 32 больных сифилисом и 28 больных туберкулезом с целью выявления ложнопозитивных случаев. После установления диагностической ценности решающего правила для выявления нРНГ исследовали 33 образца сыворотки (плазмы) крови больных с метастазами рака в лимфатических узлах шеи из невыявленного первичного очага или патологическими изменениями в носоглотке или лимфатических узлах в области шеи неясной природы с целью выявления случаев нРНГ. Клинический материал от больных нРНГ, ДОГШ и с невыявленным первичным очагом опухоли был собран в период с 2000 по 2015 г. в отделениях опухолей головы и шеи и опухолей верхних дыхательно-пищеварительных путей ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина». Клинический материал от больных инфекционными заболеваниями (сифилисом и туберкулезом) получен из инфекционной клинической больницы № 1 г. Москвы.

Исследование, в которое больные РНГ и ДОГШ были включены с их согласия в результате случайной выборки, было одобрено Комитетом по этике при ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина».

**Реакция непрямой иммунофлуоресценции.** Для тестирования образцов сывороток (плазмы) крови на наличие ВЭБ-специфических антител использовали клеточную линию P3HR1, продуцирующую вирус и синтезирующую его ВКА, и не продуцирующую вирус клеточную линию Raji, синтезирующую после обработки индукторами РА вируса. Для получения примерно 10% антигенсодержащих клеток клеточную линию Raji обрабатывали ТРА (12-0-тетрадеканол-форбол-13-ацетат) в концентрации 20 нг/мл в сочетании с бутиратом натрия в дозе 3 мкМ/мл в течение 3—5 дней, а клеточную линию P3HR1 обрабатывали только ТРА в течение 3—6 дней в той же дозе. Обработанную таким образом клеточную суспензию каждой линии наносили на предметные стекла в виде изолированных капель, которые после высушивания на воздухе и фиксирования охлажденным ацетоном использовали в качестве антигенных препаратов. При постановке реакции использовали 10-кратные разведения изучаемых образцов сывороток (плазмы) от 1:10 до 1:2560, а в качестве контроля — известные высокопозитивные или негативные сыворотки в разведении 1:20, которые наносили на предметные стекла с приготовленными антигенными препаратами. ВЭБ-специфические антитела обнаруживали с помощью козыг антител к IgG или IgA человека, меченных FITC («Sigma», США; НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Россия). Реакцию оценивали с использованием флуоресцентного микроскопа фирмы «Nikon» (Германия). Присутствие антител к вирусу определяли по ярко-зеленому свечению клеток на фоне негативных

клеток. Титром антител считали последнее разведение сыворотки (плазмы), с которым обнаруживали не менее 5% специфически флуоресцирующих клеток (при четких позитивном и негативном контролях). В каждой группе обследуемых лиц подсчитывали средние геометрические значения (СГЗ) титров антител.

## Результаты

Высокие титры антител к ВЭБ, сопровождающие возникновение и течение РНГ, впервые обнаружены в эндемичных по этому заболеванию регионах: южных провинциях Китая и странах Юго-Восточной Азии. Для дифференцирования этого новообразования от других опухолей авторы многочисленных исследований рекомендовали использовать высокие титры IgA- и/или IgG-антител к различным антигенам вируса. Отбор диагностически значимых титров антител, как правило, проводился эмпирически, а число одновременно оцениваемых серологических маркеров никогда не превышало 2. До настоящего времени не существует объективной комплексной оценки гуморального ответа на ВЭБ, с высокой степенью достоверности позволяющей дифференцировать РНГ от других неоплазий.

Для решения этой проблемы нами на базе предварительных исследований, показавших у больных РНГ в России и странах бывшего СССР высокие показатели гуморального ответа на ВЭБ, было разработано так называемое решающее правило, основанное на информативности различных серологических маркеров вируса для диагностики нРНГ. При этом титры гуморальных IgG- и IgA-антител к набору ВЭБ-ассоциированных антигенов (ВКА и РА) у 72 больных с инструментально и морфологически подтвержденным диагнозом нРНГ сравнивали с аналогичными показателями гуморального ответа на ВЭБ у 72 больных ДОГШ. Исследование проводили до начала лечения больных. Используя алгоритм экстремального разбиения признака на градации в двух сравниваемых группах больных (от 1 до 4), мы получили характерные частоты конечных разведений сывороток (плазмы), в которых обнаруживали антитела различной специфичности (табл. 1). Так, IgG-антитела к ВКА в разведении 1:160 в группе больных нРНГ встречались в 1,4% случаев, тогда как в группе больных ДОГШ — в 58,3%. Наоборот, антитела указанной специфичности в высоких титрах (1:640) значительно чаще выявляли у больных нРНГ (69,4 против 2,8% у больных ДОГШ). Аналогичную закономерность наблюдали в отношении IgA-антител к РА. Наиболее резкое различие в сравниваемых группах больных выявлено при сопоставлении частот обнаружения IgA-антител к ВКА: у больных нРНГ титры 1:10 и выше были обнаружены в 80,6% случаев и полностью отсутствовали у больных ДОГШ. Антитела к РА, относящиеся к иммуноглобулинам класса А, при полном их отсутствии у больных ДОГШ в 58,3% случаев наблюдали у больных нРНГ.

Степень различия гуморального ответа у больных РНГ и ДОГШ оценивали с помощью коэффициента информативности (КИ) по Шеннону [12]. Высокое значение этого коэффициента говорило о том, что титры вирусспецифических антител к данному антигену в двух сравниваемых группах больных существенно различаются, и, наоборот, низкие значения коэффициентов указывали на небольшие различия. Из табл. 1 следует, что больные нРНГ максимально отличались от больных ДОГШ по титрам IgA-антител к ВКА (КИ = 0,60). Раз-

Таблица 1

Титры гуморальных IgG- и IgA-антител к различным антигенам ВЭБ у больных РНГ и ДОГШ и их информативность для дифференциальной диагностики нРНГ

Специфичность антител	Группа №	Титры антител	Частота обнаружения вирусспецифических антител у больных				КИ
			нРНГ (72 случая)		ДОГШ (72 случая)		
			абс.	%	абс.	%	
ВКА/IgG	1	≥160	1	1,4	42	58,3	0,51
	2	320	7	9,7	22	30,6	
	3	640	14	19,4	6	8,3	
	4	>640	50	69,4	2	2,8	
РА/IgG	1	20	10	13,9	63	87,5	0,45
	2	40; 80	26	36,1	9	12,5	
	3	>80	36	50,0	0	0	
ВКА/IgA	1	0	6	8,3	62	86,1	0,60
	2	10	8	11,1	10	13,9	
	3	>10	58	80,6	0	0	
РА/IgA	1	0	30	41,7	72	100	0,34
	2	>0	42	58,3	0	0	

Примечание. Здесь и в табл. 3: нРНГ — низкодифференцированный гистологический вариант рака носоглотки; ДОГШ — другие опухоли головы и шеи; КИ — коэффициент информативности.

личие было несколько меньшим, но достаточно значимым при сопоставлении титров IgG-антител к этому же антигену (КИ = 0,45). Более низкой информативностью обладали IgA-антитела к РА (КИ = 0,34). Это связано с тем, что антитела указанной специфичности, хотя и были характерны только для больных нРНГ, в изучаемой группе их обнаруживали лишь у незначительного числа больных. Таким образом, метод многофакторного анализа, использованный в этой работе, позволил объективно сравнить гуморальный ответ на различные антигены ВЭБ у больных нРНГ и ДОГШ и выделить отдельные серологические маркеры вируса, наиболее характерные для нРНГ.

Таблица 2

Решающее правило для дифференциальной диагностики нРНГ по титрам IgG- и IgA-антител к антигенам ВЭБ

Специфичность антител	Группа №	Разведение сыворотки	Диагностический вес значений титров антител, усл. ед.
IgG-антитела к ВКА	1	1:160	-48
	2	1:320	-51
	3	1:640	42
	4	>1:640	57
IgG-антитела к РА	1	1:20	-60
	2	1:40, 1:80	34
	3	>1:80	26
IgA-антитела к ВКА	1	0	-135
	2	1:10	61
	3	>1:10	74

Для выявления у больных нРНГ наиболее типичных вариантов иммунного ответа на спектр ассоциированных с ВЭБ антигенов был использован метод многофакторной статистики, разработанной Т.Г. Глазковой и В.И. Вапником (РОНЦ им. Н.Н. Блохина). С помощью указанного метода были отобраны такие сочетания титров вирусспецифических антител, которые в каждом конкретном случае позволяли дифференцировать нРНГ от ДОГШ. На основании полученных данных выведено решающее правило (табл. 2). Оно позволяет по сочетанным показателям титров IgG- и IgA-антител к ВКА и IgG-антител к РА вируса объективно осуществлять диагностику нРНГ с высокой достоверностью. Каждому из значений вышеуказанных титров антител соответствуют так называемые диагностические веса, которые следует сложить и сумму трех чисел сравнить с нулем. Любая положительная сумма указывает с достоверностью 90% на наличие у больного нРНГ, а отрицательная с той же достоверностью отрицает наличие этой опухоли и свидетельствует о наличии либо ДОГШ, либо иного заболевания.

Диагностическая значимость серологических маркеров ВЭБ решающего правила была проверена при тестировании больных с клинически и морфологически подтвержденным диагнозом нРНГ, ДОГШ и инфекционной патологией. Результаты анализа представлены в табл. 3. Из этой таблицы следует, что исходя из решающего правила у 73 (94,8%) из 77 больных нРНГ гуморальный ответ на вирус был оценен как характерный для этого заболевания. Лишь в 4 (5,2%) случаях был получен ложнонегативный результат. Количество ложнопозитивных случаев с типичным (по решающему правилу) для нРНГ гуморальным ответом на ВЭБ в группе больных ДОГШ составило 7,6% (13/171), а вместе с инфекционными заболеваниями — 6,5% (2/32). Ни одного позитивного случая не было обнаружено в группах больных туберкулезом ( $n = 28$ ) и доноров крови ( $n = 83$ ).

На основании полученных данных далее представля-

Таблица 3

Ложнонегативные и ложнопозитивные случаи среди больных нРНГ, ДОГШ и некоторыми инфекционными заболеваниями

Изучаемая патология	Число наблюдений	Ложнонегативные случаи, абс. (%)	Ложнопозитивные случаи, абс. (%)
нРНГ	77	4 (5,2)	0
Рак языка	22	—	4 (18,2)
Рак щитовидной железы	21	—	3 (14,3)
Рак миндалин	10	—	1 (10,0)
Рак гортани	33	—	3 (9,1)
Лимфосаркома носоглотки	14	—	0
Рак околоушной слюнной железы	18	—	0
ДОГШ	53	—	2 (3,8)
Сифилис	32	—	2 (6,3)
Туберкулез	28	—	0
Всего РНГ	77	4 (5,2)	—
Всего ДОГШ + инфекционные болезни	231	0	15 (6,5)

лось важным оценить специфичность серологической диагностики нРНГ при невыявленном первичном очаге. Больные с метастазами в шейные лимфатические узлы без выявленного очага опухоли встречаются довольно часто среди онкологических больных (3—9%), поступающих на обследование в специализированные учреждения [13—16]. Локализацию так называемых скрытых опухолей в течение длительного времени не удается выявить ни клинически, ни инструментально. Такие опухоли иногда локализуются в носоглотке и представляют собой недифференцированную форму рака. Однако клиническое проявление болезни в результате ее длительного бессимптомного течения и анатомо-топографических особенностей строения носоглотки, а также несовершенства традиционных, широко применяемых диагностических тестов существенно запаздывает. Об этом свидетельствует и тот факт, что 70—80% больных поступают в стационар для проведения лечения уже с III—IV стадией болезни [17, 18]. В этой ситуации актуальны дополнительные методы исследования, способствующие раннему выявлению опухоли. Результаты проведенных нами исследований свидетельствуют о том, что одним из методов диагностики нРНГ при невыявленном первичном очаге может стать серологический тест на ВЭБ-специфические антитела. Для проверки данного предположения сыворотки (плазма) крови 32 больных с метастазами рака в лимфатические узлы шеи из невыявленного первичного очага или с патологическими изменениями в носоглотке или шейных лимфатических узлах неясной природы изучали на наличие IgG- и IgA-антител к ВКА и РА ВЭБ. Большинство из указанных больных отвечали следующим требованиям [16]: в их анамнезе не было других злокачественных заболеваний или хирургических вмешательств по неясным причинам; в анамнезе отсутствовала симптоматика, связанная с патологией других органов; не было клинических или лабораторных доказательств конкретной локализации опухоли; обнаружен один или несколько вовлеченных в патологический процесс лимфатических узлов. Обследуемые нами больные либо только что поступили на обследование, либо находились под врачебным контролем до проведения им специфической терапии. Оценку гуморального ответа больных на вирусспецифические антитела проводили с помощью решающего правила. При этом получаемые результаты делили на 2 категории: положительные, т. е. с 90% достоверностью указывающие на наличие нРНГ, и отрицательные, т. е. с такой же степенью достоверности указывающие на его отсутствие. При последующем клиническом наблюдении и повторном (в ряде случаев многократном) инструментальном, а также морфологическом исследовании у 24 из 32 больных очаг первичной опухоли или иного патологического процесса был обнаружен и установлен заключительный диагноз. Этот диагноз сопоставляли с предварительным диагнозом, установленным на основании данных серологического исследования. Полученные результаты представлены в табл. 4, из которой следует, что диагноз нРНГ, установленный с помощью решающего правила на основании данных серологического тестирования, был подтвержден данными клинико-морфологических исследований в 11 случаях. В 1 случае (П-6) высокие титры вирусспецифических антител, расцениваемые как характерные для нРНГ, были обнаружены у больного лимфомой Ходжкина (ЛХ). Диагностическая ошибка в данном случае вполне объяснима, так как определенные

гистологические варианты ЛХ сопровождаются высокими титрами ВЭБ-специфических антител. У 2 больных (П-5 и П-32) с невыявленной локализацией опухоли результаты серологического тестирования оказались ложнонегативными (2/32), поскольку при морфологическом исследовании лимфатического узла у каждого больного были обнаружены клетки неороговевающего недифференцированного рака, т. е. опухолевые клетки, характерные для нРНГ. Таким образом, диагностическая ошибка при выявлении нРНГ на основании ВЭБ-специфических антител составила 6,25%. Негативные результаты по данным серологического исследования были получены у 5 больных с различными вариантами опухолевого процесса в носоглотке, не относящимися к недифференцированному гистологическому варианту рака (П-2, П-3, П-12, П-14) и не характеризующимся ассоциацией с ВЭБ. Серонегативными оказались также 3 больных лимфоаденопатией (П-17, П-18, П-29), причем в двух случаях с поражением носоглотки (П-17, П-18). У 3 больных с низкими титрами гуморальных антител к ВЭБ (П-1, П-7, П-8) отмечено отдаленное расположение первичной опухоли: в толстой кишке, молочной железе и прямой кишке. У 5 больных (П-9, П-11, П-23, П-24, П-30) локализация опухоли не установлена. При морфологическом исследовании патологически измененных лимфатических узлов в этих случаях выявлены клетки умеренно дифференцированного плоскоклеточного рака с тенденцией к ороговеванию, т. е. клетки, не характерные для нРНГ.

Таким образом, полученные нами данные доказали достаточно высокую надежность серологического теста для диагностики нРНГ, в том числе для случаев без выявленного первичного очага, представляющих значительные трудности для диагностики.

### Обсуждение

Проведенные исследования показали, что развитие нРНГ у больных в России и странах бывшего СССР, как и в эндемичных регионах, сопровождается высокими титрами антител к ВЭБ, что может быть использовано в качестве важного опухолевого маркера для диагностики этого заболевания. По нашим данным, высокую диагностическую ценность имеют сочетанные показатели титров IgG- и IgA-антител к ВКА и РА вируса. Решающее правило, полученное на основе многофакторного анализа трех маркеров серологического ответа на ВЭБ, позволило нам диагностировать нРНГ с достоверностью, приближающейся к 90%. Особую ценность приобретает проведение дифференциальной диагностики между нРНГ и другими опухолями этой же анатомической области. Учитывая клиническую особенность РНГ — раннее метастазирование в лимфатические узлы шеи без визуально и часто инструментально выявляемой патологии в носоглотке, следует отметить, что диагностика этого новообразования часто бывает затруднена или ошибочна.

Выполненные нами исследования подтверждают диагностическую ценность гуморального ответа и для диагностики нРНГ в случаях метастазирования опухоли в лимфатические узлы шеи из невыявленного первичного очага. Полученные данные в то же время показывают, что серологическая диагностика нРНГ не безошибочна, не «абсолютна» и не может заменить собой ни морфологические, ни инструментальные методы исследования. Исходя из сказанного становится очевидным, что

Серологическая диагностика нРНГ в случаях невыявленного первичного очага опухоли

Паци- енты	Исучае- мые больные, возраст, годы	Предварительный клиниче- ский диагноз	Титры антител к ВЭБ при пер- вичном обследовании больных				Диагноз РНГ на основа- нии данных серологиче- ского исследования	Морфологический диагноз на основании исследования ЛУ из НПО
			IgG		IgA			
			ВКА	РА	ВКА	РА		
П-1	М., 54	Mts рака в ЛУ шеи из НПО	80	0	10	0	Отрицательный, не нРНГ	Рак толстой кишки
П-2	В., 45	То же	160	0	0	0	То же	Ангиофибросаркома с пораже- нием носоглотки
П-3	З., 65	" "	160	10	0	0	" "	Злокачественная лимфома носог- лотки гистиоцитарного типа
П-4	М., 41	" "	2560	40	80	0	Положительный, нРНГ	нРНГ
П-5	К., 54	" "	320	0	0	0	Отрицательный, не РНГ	нРНГ
П-6	Г., 61	" "	2560	320	40	0	Положительный, нРНГ	Лимфома Ходжкина
П-7	П., 35	" "	320	10	10	0	Отрицательный, не РНГ	Рак молочной железы
П-8	О., 71	" "	320	10	0	0	То же	Рак прямой кишки
П-9	Б., 56	" "	640	80	0	0	" "	Плоскоклеточный рак? Беспиг- ментная меланома?
П-10	Ц., 41	" "	1280	320	80	40	Положительный, нРНГ	нРНГ
П-11	С., 49	" "	320	0	0	0	Отрицательный, не нРНГ	оРНГ?
П-12	К., 27	Подозрение на РНГ	160	40	0	0	То же	Полипы носоглотки
П-13	К., 60	То же	320	0	0	0	" "	Лимфосаркома носоглотки
П-14	А., 40	" "	160	20	0	0	" "	То же
П-15	Ч., 23	Рак околоушной слюнной железы?	2560	20	40	0	Положительный, нРНГ	нРНГ
П-16	Ч., 47	Mts рака в ЛУ шеи из НПО	1280	80	20	10	То же	нРНГ
П-17	Ж., 26	То же	640	0	0	0	Отрицательный, не нРНГ	Синусовый гистиоцитоз с массивной лимфоаденопатией и поражением носоглотки
П-18	М., 19	Увеличение шейных и подмышечных ЛУ	640	0	0	0	То же	Двусторонний гайморит, реак- тивная лимфоаденопатия
П-19	М., 38	Увеличение шейных ЛУ	640	320	80	80	Положительный нРНГ	нРНГ
П-20	И., 66	Mts рака в ЛУ шеи из НПО	320	160	0	0	То же	нРНГ
П-21	К., 66	То же	640	160	320	80	" "	нРНГ
П-22	Н., 60	" "	160	80	10	10	" "	нРНГ
П-23	А., 77	" "	160	10	0	0	Отрицательный, не нРНГ	оРНГ
П-24	С., 57	" "	20	0	0	0	То же	оРНГ
П-25	С., 53	Рак носоглотки?	10	0	0	0	" "	Элементы злокачественного опу- холевого роста не обнаружены
П-26	М., 54	Опухоль основания черепа	640	160	1280	640	Положительный, нРНГ	нРНГ
П-27	С., 42	Нейроэндокринный рак носоглотки	320	40	160	80	То же	нРНГ
П-28	Ш., 33	Лимфома Беркитта	40	0	0	0	Отрицательный, не нРНГ	Диффузная В-крупноклеточная лимфома GCB-типа
П-29	Б., 56	Лимфоаденопатия неясно- го генеза	40	0	0	0	То же	Лимфоаденопатия с пораже- нием многих групп ЛУ, включая шейные
П-30	Ч., 57	Mts рака в ЛУ шеи из НПО	80	0	0	0	" "	оРНГ
П-31	П., 36	Плоскоклеточный РНГ	320	40	10	10	Положительный, нРНГ	нРНГ
П-32	М., 61	Mts рака в ЛУ шеи из НПО	80	0	0	0	Отрицательный, не нРНГ	нРНГ

Примечание. нРНГ — неороговевающий рак носоглотки; оРНГ — ороговевающий плоскоклеточный рак носоглотки; Mts рака — метастазы рака; ЛУ — лимфатический узел; НПО — невыявленный первичный очаг; ИГХ — иммуногистохимическое исследование.

лишь комплексный подход к обследованию указанных больных с обязательным тестированием их сывороток (плазмы) крови на ВЭБ-специфические антитела может облегчить и ускорить диагностику нетипично протекающих случаев РНГ. К аналогичному выводу склоняются и другие авторы, использующие, как правило, в большинстве проводимых ими исследований ограниченный набор серологических маркеров. В эндемичных же по РНГ регионах чаще всего прибегают к монотестированию на IgA-антитела к ВКА [18—22].

В последнее десятилетие по мере развития молекулярных технологий для диагностики злокачественных опухолей стали применять тесты, основанные на анализе присутствующих в крови внеклеточных, свободно циркулирующих нуклеиновых кислот. Эти молекулы, высвобождающиеся из гибнущих в организме клеток, могут служить маркерами того или иного процесса, в том числе неопластического [23—25].

Ло У.М. и соавт. [26], используя полимеразную цепную реакцию в реальном времени, обнаружили в плазме крови больных РНГ высокую концентрацию копий ДНК ВЭБ при низких фоновых значениях этой ДНК у больных ДОГШ и здоровых лиц. Находка стимулировала появление серии работ, посвященных количественному определению уровней свободной ДНК ВЭБ в плазме крови больных РНГ. Этот тест стал применяться не только для диагностики этой опухоли, но главным образом для оценки эффективности лечения и прогноза [26—29].

Сопоставление данных, касающихся гуморального ответа на ВЭБ и количественного содержания ДНК ВЭБ у больных РНГ, позволило обнаружить между ними корреляцию. Если учесть инерционность иммунного ответа на вирусную инфекцию, клиническая значимость ДНК-тестирования, по мнению ряда авторов, оказалась выше, чем серологического теста [30, 31]. Данные собственных предварительных исследований подтверждают этот вывод и для случаев РНГ в эндемичном регионе (России) [32].

### Заключение

Принимая во внимание простоту серологического теста, его высокую диагностическую ценность, базирующуюся на объективной оценке гуморального ответа с помощью решающего правила, можно утверждать, что этот тест может быть полезным, дополняющим стандартные методы исследования больных с подозрением на РНГ, особенно в случаях метастазирования опухоли в лимфатические узлы шеи без выявленного первичного очага. Кроме того, преимуществом серологического теста является в одинаковой степени пригодность для определения вирусспецифических антител и сыворотки, и плазмы крови, а постановка реакции не требует много времени и высокотехнологичного оборудования, необходимого для определения в плазме крови копий ДНК ВЭБ.

**Финансирование.** Исследование было поддержано грантом РФФИ 13-04-00063.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1—8, 10, 11, 13—16, 19—31 см. REFERENCES)

9. Давыдов М.И. Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ. *Вестник Российского онкологического научного центра имени Н.Н. Блохина РАМН*. 2008; 19 (2 приложение 1).

12. Лидовский В.В. *Теория информации. Учебное пособие*. М.; Компания «Спутник+»; 2004.  
17. Белоусова Н.В., Михайловский А.А., Алексеева Т.Р., Шатская В.А. Эндоскопическая диагностика множественного первичного рака верхних дыхательных путей. *Вестник оториноларингологии*. 1996; (2): 33—5.  
18. Белоусова Н.В., Поддубный Б.К., Унгиадзе Г.В., Кондратьева Т.Т., Азхипов В.В., Пробатова Н.А. и др. Современная диагностика рака носоглотки. *Современная онкология*. 2000; 2(3): 78—82.  
32. Гурцевич В.Э., Сенюта Н.Б., Кондратова В.Н., Гончарова Е.В., Игнатова А.В., Лома М.В. и др. Диагностическая значимость уровней ДНК и антител к капсидному антигену вируса Эпштейна-Барр в плазме крови больных раком носоглотки в эндемичном регионе. *Успехи молекулярной онкологии*. 2015; 2(2): 56—67.

### REFERENCES

- Henle G., Henle W. Epstein-Barr virus-specific IgA serum antibodies as an outstanding feature of nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Cancer*. 1976; 17: 1—7.
- Ho H.C., Ng M.H., Kwan H.C. Factors affecting serum IgA antibody to Epstein-Barr viral capsid antigens in nasopharyngeal carcinoma. *Br. J. Cancer*. 1978; 37: 356—62.
- Ho H.C., Kwan H.C., Wu P., Chan S.K., Ng M.H., Saw D. Epstein-Barr antibodies in suspected nasopharyngeal carcinoma. *Lancet*. 1978; 2(8099): 1094—5.
- Ho H.C., Kwan H.C., Ng M.H., de The G. Serum IgA antibodies to Epstein-Barr virus capsid antigen preceding symptoms of nasopharyngeal carcinoma. *Lancet*. 1978; 1(8061): 436.
- Yi Z., Yuxi L., Chunren L., Sanwen C., Jiheng W., Jisong Z. et al. Application of an immunoenzymatic method and an immunoradiographic method for a mass survey of nasopharyngeal carcinoma. *Intervirology*. 1980; 13(3): 162—8.
- Zeng Y., Pi G.H., Zhao W.P. Detection of EB virus nuclear antigen (EBNA) by anticomplement immunoenzymatic method. *Zhongguo Yi. Xue. Ke. Xue. Yuan Xue. Bao*. 1980; 2(2): 134—5.
- Parkin D.M., Bray F., Ferlay J., Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int. J. Cancer*. 2001; 94(2): 153—6.
- Parkin D.M., Bray F., Ferlay J., Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J. Clin*. 2005; 55(2): 74—108.
- Davydov M.I. Aksel' E.M. Statistics malignancies in Russia and CIS countries. *Vestnik Rossiyskogo onkologicheskogo nauchnogo tsentra imeni N.N. Blokhina RAMN*. 2008; 19 (2 prilozhenie 1). (in Russian)
- Barnes L., Eveson J.W., Reichart P., Sidransky D., eds. *Pathology and Genetics Head and Neck Tumors*. Lyon: IARC Press; 2005.
- Marks J.E., Phillips J.L., Menck H.R. The National Cancer Data Base report on the relationship of race and national origin to the histology of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer*. 1998; 83(3): 582—8.
- Lidovskiy V.V. *Information Theory. Tutorial [Teoriya informatsii. Uchebnoe posobie]*. Moscow: Kompaniya «Sputnik+»; 2004. (in Russian)
- Ho H.C., Ng M.H., Kwan H.C., Chau J.C. Epstein-Barr-virus-specific IgA and IgG serum antibodies in nasopharyngeal carcinoma. *Br. J. Cancer*. 1976; 34: 655—60.
- Pearson G.R. Epstein-Barr virus and nasopharyngeal carcinoma. *J. Cell Biochem. Suppl*. 1993; 17F: 150—4.
- Ringborg U., Henle W., Henle G., Ingimarsson S., Klein G., Silfversward C. et al. Epstein-Barr virus-specific serodiagnostic tests in carcinomas of the head and neck. *Cancer*. 1983; 52: 1237—43.
- Comess M.S., Beahrs O.H., Dockerty M.B. Cervical metastasis from occult carcinoma. *Surg. Gynecol. Obstet*. 1957; 104: 607—17.
- Belousova N.V., Mikhaylovskiy A.A., Alekseeva T.R., Shatskaya V.A. Endoscopic diagnosis of multiple primary cancers of the upper respiratory tract. *Vestnik otorinolaringologii*. 1996; (2): 33—5. (in Russian)
- Belousova N.V., Poddubnyy B.K., Ungiadze G.V., Kondrat'eva T.T., Azhkipov V.V., Probatova N.A. et al. Current diagnosis of nasopharyngeal cancer. *Sovremennaya onkologiya*. 2000; 2(3): 78—82. (in Russian)
- Li S., Deng Y., Li X., Chen Q.P., Liao X.C., Qin X. Diagnostic value of Epstein-Barr virus capsid antigen-IgA in nasopharyngeal carcinoma: a meta-analysis. *Chin. Med. J. (Engl.)*. 2010; 123: 1201—5.
- Ling W., Cao S.M., Huang Q.H., Li Y.H., Deng M.Q. Prognostic implication of pretreatment titer of serum immunoglobulin A against Epstein-Barr virus capsid antigen in nasopharyngeal carcinoma patients in Sihui, Guangdong. *Ai. Zhong*. 2009; 28(1): 57—9.

21. Luo Y.L., Ou G.P., Chi P.D., Liang Y.N., Liu Y.H., Huang M.Y. Combined determination of Epstein-Barr virus-related antibodies and antigens for diagnosis of nasopharyngeal carcinoma. *Ai. Zheng.* 2009; 28(1): 76—8.
22. Song C., Yang S. A meta-analysis on the EBV DNA and VCA-IgA in diagnosis of Nasopharyngeal Carcinoma. *Pak. J. Med. Sci.* 2013; 29: 885—90.
23. Sidransky D. Emerging molecular markers of cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2002; 2: 210—9.
24. Skvortsova T.E., Rykova E.Y., Tamkovich S.N., Bryzgunova O.E., Starikov A.V., Kuznetsova N.P. et al. Cell-free and cell-bound circulating DNA in breast tumours: DNA quantification and analysis of tumour-related gene methylation. *Br. J. Cancer.* 2006; 94: 1492—5.
25. Lichtenstein A.V., Melkonyan H.S., Tomei L.D., Umansky S.R. Circulating nucleic acids and apoptosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2001; 945: 239—49.
26. Lo Y.M., Chan L.Y., Chan A.T., Leung S.F., Lo K.W., Zhang J. et al. Quantitative and temporal correlation between circulating cell-free Epstein-Barr virus DNA and tumor recurrence in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.* 1999; 59: 5452—5.
27. Hou X., Zhao C., Guo Y., Han F., Lu L.X., Wu S.X. et al. Different Clinical Significance of Pre- and Post-treatment Plasma Epstein-Barr Virus DNA Load in Nasopharyngeal Carcinoma Treated with Radiotherapy. *Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol).* 2011; 23(2): 128—33.
28. Leung S.F., Chan K.C., Ma B.B., Hui E.P., Mo F., Chow K.C. et al. Plasma Epstein-Barr viral DNA load at midpoint of radiotherapy course predicts outcome in advanced-stage nasopharyngeal carcinoma. *Ann. Oncol.* 2014; 25: 1204—8.
29. Wang W.Y., Twu C.W., Chen H.H., Jan J.S., Jiang R.S., Chao J.Y. et al. Plasma EBV DNA clearance rate as a novel prognostic marker for metastatic/recurrent nasopharyngeal carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2010; 16: 1016—24.
30. Twu C.W., Wang W.Y., Liang W.M., Jan J.S., Jiang R.S., Chao J. et al. Comparison of the prognostic impact of serum anti-EBV antibody and plasma EBV DNA assays in nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2007; 67: 130—7.
31. Shao J.Y., Zhang Y., Li Y.H., Gao H.Y., Feng H.X., Wu Q.L. et al. Comparison of Epstein-Barr virus DNA level in plasma, peripheral blood cell and tumor tissue in nasopharyngeal carcinoma. *Anticancer Res.* 2004; 24: 4059—66.
32. Gurtsevich V.E., Senyuta N.B., Kondratova V.N., Goncharova E.V., Ignatova A.V., Lomaya M.V. et al. Diagnostic value of DNA levels and antibodies to capsid antigen of Epstein-Barr virus in the blood plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma in non-endemic region. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii.* 2015; 2(2): 56—67. (in Russian)

Получена 16.02.16

Принята в печать 29.03.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.36-002.2-022-06:616.36-004]:575.174.015.3.08

Масабаева М.Р.<sup>1</sup>, Аукунов Н.Е.<sup>1</sup>, Мусажанова Ж.Б.<sup>2</sup>, Саенко В.А.<sup>2</sup>, Рогунович Т.И.<sup>2</sup>, Шаймарданов Н.К.<sup>1</sup>, Курманова Б.Р.<sup>1</sup>, Баркибаева Н.Р.<sup>1</sup>, Yamashita Shunichi<sup>2</sup>, Рахыпбеков Т.К.<sup>1</sup>

## ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ В РАЙОНЕ ГЕНА *IL17A*: СВЯЗЬ С ХРОНИЧЕСКИМ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ И ПРОГРЕССИРОВАНИЕМ К ЦИРРОЗУ ПЕЧЕНИ В КАЗАХСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

<sup>1</sup> Государственный медицинский университет, 071400, г. Семей, Казахстан;

<sup>2</sup> Atomic Bomb Disease Institute, Nagasaki University, 852-8523, г. Нагасаки, Япония

**Введение.** Настоящая работа является первым ассоциативным генетическим исследованием потенциальной связи однонуклеотидных полиморфизмов rs8193036 и rs2275913, локализующихся в промоторе гена *IL17A* на хромосоме 6p12, с хроническим вирусным гепатитом и его прогрессированием в казахской популяции. **Цель исследования** — оценка влияния генетического полиморфизма в промоторном участке *IL17A* на предрасположенность к заболеванию хроническим вирусным гепатитом В и/или С и дальнейшее развитие цирроза печени. **Материалы и методы.** В ретроспективном ассоциативном исследовании, проведенном методом случай — контроль, приняли участие 862 человека. Из них 100 пациентов имели в анамнезе цирроз печени и хронический вирусный гепатит В и/или С, 341 — только хронический вирусный гепатит. В качестве популяционного контроля привлечен 421 донор, который не имел заболеваний печени и был HBV- и HCV-отрицательным. Однонуклеотидные полиморфизмы rs8193036[T/C] и rs2275913[G/A] определяли методом TaqMan, используя для генотипирования ДНК клеток периферической крови. **Результаты.** Частоты минорных аллелей rs8193036[C] и rs2275913[A] в группах пациентов практически не отличались от таковых в контрольной выборке, в которой они составили соответственно около 0,4 и 0,3. Многофакторный логистический регрессионный анализ в мультипликативной модели наследования выявил отношения шансов, близкие к 1 с доверительным интервалом, перекрывающим значение 1, и статистической значимостью  $p > 0,4$  для любых групп сравнения. **Вывод.** Взаимосвязь двух исследованных однонуклеотидных полиморфизмов rs8193036 и rs2275913 в промоторе гена *IL17A* с предрасположенностью к заболеванию хроническим вирусным гепатитом В и/или С и его прогрессированием в цирроз печени в казахской популяции не выявлена.

**Ключевые слова:** *IL17A*; однонуклеотидный полиморфизм; rs2275913; rs2275913; хронический вирусный гепатит; цирроз печени.

**Для цитирования:** Масабаева М.Р., Аукунов Н.Е., Мусажанова Ж.Б., Саенко В.А., Рогунович Т.И., Шаймарданов Н.К., Курманова Б.Р., Баркибаева Н.Р., Yamashita Shunichi, Рахыпбеков Т.К. Генетический полиморфизм в районе гена *IL17A*: связь с хроническим вирусным гепатитом и прогрессированием к циррозу печени в казахской популяции. *Вопросы вирусологии.* 2016; 61(5): 212-219.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-5-212-219

**Для корреспонденции:** Масабаева Меруерт Равильевна, докторант Государственного медицинского университета, 071400, г. Семей, Казахстан. E-mail: meruert-m@mail.ru