

Диагностическая значимость уровней ДНК и антител к капсидному антигену вируса Эпштейна–Барр в плазме крови больных раком носоглотки в неэндемическом регионе

В.Э. Гурцевич¹, Н.Б. Сенюта¹, В.Н. Кондратова¹, Е.В. Гончарова², А.В. Игнатова²,
М.В. Ломая², М.А. Кропотов², А.М. Мудунов², А.В. Лихтенштейн¹

¹НИИ канцерогенеза ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24;

²Научно-исследовательский институт клинической онкологии ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»;
Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 23

Контакты: Владимир Эдуардович Гурцевич gurvlad532@yahoo.com

Вирус Эпштейна – Барр (ВЭБ), представитель семейства герпес-вирусов человека, является этиологическим агентом для ряда доброкачественных и злокачественных новообразований человека. Среди последних особое место занимает рак носоглотки (РНГ). В его возникновении ВЭБ играет ключевую роль, стимулируя прогрессирование патологического процесса от предраковых поражений до появления злокачественной опухоли. Для большинства больных РНГ характерны повышенные уровни гуморальных IgG- и IgA-антител к капсидному и раннему антигенам ВЭБ, причем титры этих антител поднимаются до высоких уровней задолго до диагностического рака. При учете этого феномена уже многие годы вирусспецифические антитела используются в качестве маркеров для диагностики РНГ, особенно в случаях невыявленного первичного очага. В последние годы в эндемичных для РНГ регионах (Южный Китай, страны Юго-Восточной Азии) проявлен большой интерес к использованию количественного определения копий ДНК ВЭБ в плазме крови больных РНГ в качестве метода раннего выявления рака и мониторинга опухолевого процесса.

Цель исследования – сравнительная оценка клинической значимости уровней ДНК ВЭБ и гуморальных антител к вирусу в плазме крови больных РНГ в неэндемичном регионе (России). Полученные результаты свидетельствуют о том, что оба маркера: ДНК ВЭБ и IgA-антитела к капсидному антигену ВЭБ могут быть успешно использованы для диагностики РНГ в неэндемичном регионе. Однако по сравнению с вирусспецифическими антителами число копий вирусной ДНК в плазме крови больных является более чувствительным и специфическим маркером, отражающим эффективность проведенной терапии, а также состояние ремиссии или рецидива болезни.

Ключевые слова: рак носоглотки, вирус Эпштейна–Барр, капсидный антиген, ранний антиген, титры IgG- и IgA-антител, ремиссия, рецидив, стабилизация опухолевого процесса, концентрация ДНК вируса Эпштейна–Барр в 1 мл плазмы крови, диагностика рака носоглотки

DOI: 10.17650/2313-805X.2015.2.2.004–?

Diagnostic significance of DNA and antibodies against capsid antigens of anti-Epstein–Barr virus antibodies levels in blood plasma of nasopharyngeal carcinoma patients from non-endemic region

V.E. Gurtsevich¹, N.B. Senyuta¹, V.N. Kondratova¹, E.V. Goncharova², A.V. Ignatova²,
M.V. Lomaya², M.A. Kropotov², A.M. Mudunov², A.V. Lichtenstein¹

¹Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center;
24 Kashirskoye Shosse, Moscow, 115478, Russia;

²Research Institute of Clinical Oncology, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center;
24 Kashirskoye Shosse, Moscow, 115478, Russia

Epstein–Barr virus (EBV), a representative of the herpesvirus family, is the etiological agent for a number of benign and malignant human neoplasms. Among the latter, the nasopharyngeal carcinoma (NPC) occupies a special place. In NPC development EBV plays a key role stimulating the progression of the pathological process from precancerous lesions to the cancer development. For most NPC patients, elevated levels of humoral IgG and IgA antibodies against capsid and early EBV antigens are characteristic and their antibody titers rise to high levels long before the diagnosis of cancer. Using this phenomenon, virus-specific antibodies are used for many years as markers for NPC screening, especially in cases of undiagnosed primary lesion. In recent years, in endemic for NPC regions (South China, South-East Asia) a great attention has been paid to the use of quantitative determination of EBV DNA copies in the blood plasma of patients with NPC as a method of early cancer detection and monitoring. The aim of this study was to compare clinical significance of EBV DNA and humoral antibodies levels in blood plasma of NPC patients in non-endemic region, Russia. The results obtained indicate that both markers DNA/EBV and IgA antibodies against capsid EBV antigens can be successfully used for diagnosis of NPC in non-endemic region. However, in comparison with the virus-specific antibody titers, the viral DNA levels in the patients plasma are more sensitive and specific as NPC marker reflecting the efficacy of the therapy, and the state of remission or relapse.

Key words: nasopharyngeal carcinoma, Epstein–Barr virus, capsid antigen, early antigen, IgG- and IgA-antibody titers, remission, relapse or stabilization of the tumor process, Epstein–Barr virus DNA concentration in 1 ml of blood plasma, nasopharyngeal carcinoma diagnostics

Введение

Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ), представитель семейства герпес-вирусов человека, в 1964 г. исходно выделенный из клеток лимфомы Беркитта Майклом Энтони Эпштейном и его коллегой Ивонной Барр, обладает уникальными биологическими свойствами. Им инфицировано более 90 % населения планеты, как правило, без клинических проявлений у вирусоносителей. В то же время вирус признан этиологическим агентом для ряда доброкачественных и злокачественных заболеваний [1]. Среди последних особое место занимает рак носоглотки (РНГ), в возникновении которого ВЭБ играет ключевую роль, стимулируя прогрессирование патологического процесса от предраковых поражений до появления злокачественной опухоли [2]. Заболеваемость РНГ в мире характеризуется географической и этнической вариабельностью [3]. Она наиболее высокая в южных провинциях Китая и странах Юго-Восточной Азии (25–30 случаев на 100 000 населения в год), несколько ниже – в арабских странах Северной Африки, в Гренландии и у эскимосов на Аляске [4]. В западных странах РНГ регистрируют нечасто, реже чем 0,5 случая на 100 000 населения в год [5]. Примерно с такой же частотой РНГ встречается и на территории бывшего СССР, включая Россию, в структуре злокачественных новообразований которой в 2006 г. опухоли носоглотки у мужчин составляли 0,15 %, а у женщин – 0,08 % [6]. Согласно классификации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) РНГ морфологически подразделяется на 2 типа: плоскоклеточный ороговевающий рак (keratinising squamous cell carcinoma) и неороговевающий рак (non-keratinising squamous cell carcinoma), в состав которого как подтип входит недифференцированный РНГ (нРНГ) (undifferentiated carcinoma) [7]. Для неороговевающего рака обычно характерна обильная лимфоидная инфильтрация, состоящая из лимфоцитов, гистиоцитов, эозинофилов и других реактивных клеточных элементов [8, 9]. Молекулярно-эпидемиологические исследования показали, что для больных РНГ ассоциация с ВЭБ не зависит от географического происхождения и этнической принадлежности [10]. Однако для реализации онкогенной потенции вируса и возникновения опухоли необходимо воздействие на организм ряда вредных факторов внешней и внутренней среды, обладающих мутагенными свойствами, которые приводят к метилированию генов опухолевых супрессоров, активации или супрессии других генов, а также собственно хозяйских факторов. К последним относят ослабленный иммунный ответ на вирусную инфекцию, ослабленный локальный иммунный ответ, определенный НЛА-генотип хозяина, наследственную предрасположенность и т.д. [11–13]. Практически все случаи нРНГ являются ВЭБ-позитивными, при этом вирус присутствует во всех опухолевых клетках в отличие от ряда других патологий, ассоциированных с этим вирусом.

Вирусный геном у этих больных можно обнаружить уже на ранних стадиях опухолевого процесса [14].

Для большинства больных нРНГ характерны повышенные титры гуморальных антител к ВЭБ [15, 16], которые поднимаются до высоких уровней задолго до установления диагноза [17]. Это позволило предположить, что ВЭБ может участвовать в патогенезе нРНГ еще в доклинической фазе болезни. При этом обнаружение антител, относящихся к иммуноглобулину (Ig) класса А против вирусного капсидного и раннего антигенов ВЭБ (ВКА и ВРА соответственно), широко используется для скрининга нРНГ в эндемичных по этому заболеванию регионах Китая [18].

В последнее время наблюдается нарастающий интерес к тестированию в плазме крови ассоциированных с опухолью нуклеиновых кислот в качестве метода, применяемого для раннего выявления рака и мониторинга опухолевого процесса [19–21]. На сегодняшний день ДНК ВЭБ в плазме крови больных РНГ – один из наиболее изученных опухолевых маркеров [22]. Количественное определение копий ДНК представляется особенно полезным методом мониторинга как для идентификации остаточной (клинически скрытой) опухоли после проведенной радиотерапии [23], так и для прогнозирования эффективности лечения [24].

С учетом диагностической значимости обоих указанных выше методов исследования можно ожидать, что в плазме крови больных РНГ между концентрациями ДНК ВЭБ и титрами IgA-антител к ВКА существует корреляция, но такие исследования даже для эндемичных регионов оказались единичными и полностью отсутствуют для неэндемичных регионов.

Цель исследования – сравнительная оценка клинической значимости уровней ДНК ВЭБ и гуморальных антител к вирусу в плазме крови больных РНГ в неэндемичном регионе, России. В частности, представляло интерес выяснить, какой из изучаемых маркеров наиболее адекватен для диагностики РНГ и оценки клинического статуса после проведенной химиолучевой терапии. Полученные результаты свидетельствуют о том, что оба маркера: ДНК ВЭБ и IgA-антитела к ВКА могут быть успешно использованы для диагностики нРНГ в неэндемичном регионе. Однако число копий ДНК ВЭБ в плазме больных является наиболее чувствительным и специфическим маркером, отражающим эффективность проведенной терапии, а также состояние ремиссии или рецидива болезни.

Материалы и методы

Клинические образцы. Материалом для исследования служила плазма крови 17 больных РНГ и 24 пациентов с другими опухолями слизистой оболочки полости рта (ДОПР), проходивших лечение в ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина». В качестве контроля изучены образцы плазмы крови 19 доноров. Из 17 больных РНГ 5 были первичными, а 12 – после проведе-

ния одного или нескольких стандартных курсов химиотерапии (ХТ) с лучевой терапией (ЛТ) или без последней. Соотношение мужчин и женщин было 16:1, средний возраст составил 46,5 года. У всех больных был диагностирован нРНГ согласно классификации ВОЗ (III тип). В состав пациентов с ДОПР вошли больные раком слизистой оболочки полости рта, языка и с некоторыми другими злокачественными поражениями полости рта. Соотношение мужчин и женщин было 3:1, средний возраст составил 57,5 года. Проведенное исследование, в которое пациенты с РНГ и ДОПР вошли с их согласия в результате случайной выборки, одобрено комитетом по этике при ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина».

Серологический тест на антитела к ВЭБ. Количественное определение титров IgG- и IgA-антител к ВКА ВЭБ осуществляли непрямым методом иммунофлюоресценции, используя конъюгированные с флуоресцеин изотиоцианатом козы антитела против IgG и IgA человека (Jackson Immune Research Laboratories, Inc.) Для определения антител к ВКА использовали клеточную линию P3HR1, продуцирующую вирус. Клеточные линии культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки Gibco, при 37 °С и 5 % CO₂. Для усиления экспрессии ВКА клетки в течение 3–6 сут обрабатывали индуктором 12-0-тетрадеканойл-форбол-13-ацетатом (20 нг/мл). Приготовленный таким образом пул клеток наносили на предметные стекла, фиксировали и использовали в качестве антигена. Четырехкратные разведения известной ВЭБ-положительной сыворотки использовали в качестве контроля. Образцы плазмы также 4-кратно разводили натрий-фосфатным буфером, начиная с 1:10. У здоровых лиц титры IgG-антител к ВКА колеблются от 1:10 до 1:160, а IgA-антитела к ВКА, как правило, присутствуют в низких титрах и в незначительном проценте случаев. Для больных же нРНГ характерны высокие титры антител к ВЭБ обоих классов.

Экстракция циркулирующей ДНК. Кровь (5 мл), собранную в пробирки с этилендиаминтетрауксусной кислотой, центрифугировали при 1500g, плазму отбирали и хранили при температуре –60 °С. Полученные образцы плазмы объемом 0,5–1,0 мл депротеинизировали фенолом и хлороформом, после чего обессоливали путем диализа или центрифугирования через фильтры Amicon. Для выделения нуклеиновых кислот из плазмы крови применили оригинальный метод (изотахофорез в агарозном геле), который обеспечивает полное извлечение всех молекул независимо от размера, что особенно важно при исследовании фрагментированной ДНК [25]. Концентрацию ДНК определяли флуориметрически с красителем SYBR Green I на приборе Plate Reader Chameleon V multilabel counter (Hidex O, Финляндия).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени (ПЦР-РВ). Число копий вирусной ДНК в 1 мл плазмы крови определяли посредством ПЦР-РВ.

Для построения калибровочных кривых использовали ДНК диплоидных клеток Namalwa, содержащих 2 интегрированных генома ВЭБ. При этом исходили из соотношения 3,3 пг геномной ДНК – 1 копия вирусной ДНК [26]. Для ПЦР-РВ применяли праймеры к фрагменту размером 76 пар нуклеотидов в области BamHI-W вирусной ДНК (GenBank accession number V01555): sense primer – W-44F (5'-CCCAA-CACTCCACCACACC), antisense primer – W-119R (5'-TCTTAGGAGCTGTCCGAGGG), флуоресцентный зонд – W-67T (5'-FAMCACACACTACACACACC-CACCCGTCTC-RTQ1) [22]. В качестве контроля способности ДНК плазмы служить матрицей в ПЦР использовали уникальный ген *KRAS*, как описано ранее [27]. Реакцию вели в 96-луночных планшетах на приборе CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США) в 50 мкл реакционной смеси («Синтол», Россия), содержащей 0,3 мкМ каждого из праймеров, 25 нМ флуоресцентного зонда, 4 мМ MgCl₂, 200 мкМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 1 ед. Taq-полимеразы, 10 мкл раствора ДНК в буфере TE (соответствует 50 мкл плазмы). В каждый анализ включали 2 негативных контроля (образцы, не содержащие ДНК). Условия ПЦР: денатурация 5 мин при температуре 95 °С, 40 циклов 15 с при температуре 95 °С и 30 с при температуре 56,5 °С. Данные ПЦР-РВ анализировали с помощью программы Bio-Rad CFX manager.

Статистический анализ. Содержание тотальной и вирусной ДНК в плазме крови лиц, входящих в состав разных групп, сравнивали посредством непараметрического критерия (U-критерий Манна–Уитни). Рассчитывали точное значение *p* (различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$). Титры антител представляли в виде их среднегеометрических значений (СГЗ). Статистическую значимость различий частот изучаемых признаков оценивали с помощью критерия χ^2 , для малых выборок рассчитывали точный критерий Фишера. Меру линейной связи оценивали с помощью коэффициента корреляции рангов Спирмена. Вычисления проводили с помощью статистических пакетов Statistica for Windows 6.0 и SPSS.

Результаты

Проведенные исследования показали, что частота обнаружения IgG-антител к ВКА в плазме больных РНГ и здоровых лиц составляет 100 % (22/22) и лишь незначительно ниже у больных с ДОПР (91,7 %, 22/24). Частота же выявления IgA-антител к ВКА в группах пациентов с РНГ и ДОПР различалась существенно. У больных РНГ (первичных и в состоянии рецидива) антитела указанной специфичности обнаружены в 100 % и в 92,3 % (12/13) случаев у больных в состоянии ремиссии. У пациентов с ДОПР частота выявления IgA-антител к ВКА оказалось гораздо ниже – 16,7 % (4/24) случаев. В плазме крови здоровых лиц антивирусные антитела указанной специфичности отсутствовали. Различие в содержании IgA-антител

Уровни IgG- и IgA-антител к ВКА в плазме крови пациентов с РНГ, ДОПР и здоровых лиц

Группа	Титры антител к ВЭБ					
	IgG к ВКА			IgA к ВКА		
	всего	%	СГЗ	всего	%	СГЗ
Больные РНГ:						
первичные	6	100	285,1	6	100	61,2
после полиХТ/ЛТ (ремиссия)	13	100	356,0	12	92,3	78,6
после полиХТ/ЛТ (рецидив)	3	100	806,3	3	100	201,6
Пациенты с ДОПР	22	91,7	46,7	4	16,7	1,8
Здоровые лица	19	100	50,0	0	0	0

к ВКА у больных РНГ и у представителей 2 контрольных групп было статистически достоверным ($p < 0,05$, χ^2 test) (таблица).

Интересно отметить, что СГЗ титров IgG- и IgA-антител к ВКА ВЭБ (сочетанные комбинации титров которых используются в качестве серологических маркеров РНГ) в группах первичных больных и больных после проведенной терапии в состоянии стабилизации и ремиссии колебались незначительно. В группе первичных больных они были равны 285,1 и 61,2 соответственно, в группе больных с положительным эффектом после проведенной терапии – 356,0 и 78,6 соответственно. Однако в группе больных с рецидивом опухолевого процесса анализируемые показатели оказались выше более чем в 2 раза (806,3 и 201,6 соответственно). Из этих данных следует, что положительный терапевтический эффект не сопровождался снижением титров вирусоспецифических антител, но они существенно возрастают у больных в состоянии рецидива. У пациентов с ДОПР СГЗ IgG- и IgA-антител к ВКА ВЭБ приближались к нормальным показателям: они равнялись 46,7 и 1,8 соответственно, а в группе здоровых лиц были обнаружены только IgG-антитела (СГЗ = 50,0) (см. таблицу). Индивидуальные значения титров IgG- и IgA-антител к ВКА ВЭБ представлены на рис. 1.

При анализе уровней ДНК ВЭБ и IgG- и IgA-антител к ВКА ВЭБ в периферической крови обследуемых лиц выявлены следующие закономерности. Высокая концентрация вирусной ДНК в крови первичных больных (медиана 33 709 копий/мл; межквартильный интервал (МКИ) 32 254–52 918 копий/мл) падает до фоновых значений у пациентов, находящихся после лечения в состоянии ремиссии или стабилизации процесса (медиана 0 копий/мл; МКИ 0–535 копий/мл), но резко возрастает при рецидиве болезни (медиана 220 955 копий/мл), тогда как у пациентов с ДОПР и у доноров уровень вирусной ДНК не превышает фоновых значений ($p < 0,001$; U-критерий Манна–Уитни) (рис. 2). При этом гуморальный ответ больных РНГ на антигены ВЭБ не полностью коррелирует с концентрацией вирусной ДНК в крови этих

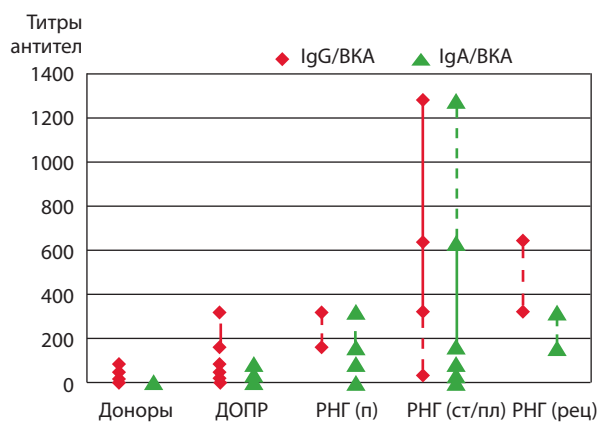


Рис. 1. Индивидуальные значения титров IgG- и IgA-антител у пациентов с РНГ, ДОПР и доноров крови. Число образцов: доноров (здоровых лиц) – 19, ДОПР – 24, первичного РНГ (РНГ (п)) – 6, РНГ со стабилизацией процесса после лечения (РНГ (ст/пл)) – 13, рецидива РНГ (РНГ (рец)) – 3

больных. Высокие СГЗ титров IgG- и IgA-антител к ВКА в группе первичных больных (285,1 и 61,2 соответственно) не снижаются у больных в состоянии ремиссии, как это происходит с числом копий ДНК ВЭБ, а скорее даже несколько возрастают (356,0 и 78,6 соответственно). В то же время у больных с рецидивом опухолевого процесса СГЗ титров указанных выше антител, как и число копий вирусной ДНК, возрастают значительно (806,3 и 201,6 соответственно; $p < 0,05$) (см. таблицу, рис. 1 и 2).

С учетом небольшого числа наблюдений изучить наличие корреляции между титрами IgA-антител к ВКА ВЭБ и/или концентрацией в плазме ДНК ВЭБ и классификацией TNM или стадией болезни у больных РНГ не представилось возможным. Все же наличие взаимосвязи между уровнями вирусной ДНК в плазме и титрами IgA-антител к ВКА ВЭБ могут подтвердить наблюдения за конкретными больными. В качестве примера на рис. 3 представлены данные титров IgA-антител к ВКА ВЭБ и числа копий ДНК ВЭБ в плазме больного А. 42 лет с РНГ Т3NхM0 III стадии, у которого после проведенной терапии наступила ремиссия.

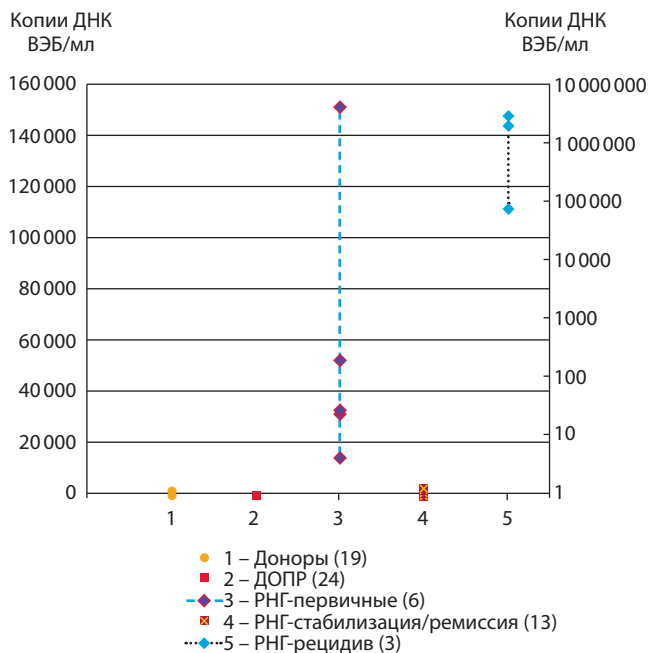


Рис. 2. Индивидуальные значения числа копий ДНК ВЭБ в плазме крови доноров, пациентов с ДОПР и больных РНГ при различных клинических состояниях после проведенного лечения

Из рис. 3 видно, что концентрация ДНК ВЭБ в плазме больного, высокая до лечения (33 709 копий/мл), уже после 1-го курса ХТ снизилась до нуля и практически сохранялась на этом же уровне после 2-го и 3-го курсов. При этом опухолевый процесс перешел в стадию ремиссии. Высокие до лечения титры IgG- и IgA-антител после 1-го курса ХТ оставались на прежнем высоком уровне, но после 2-го курса ХТ не снизились вслед за снижением уровня вирусной ДНК, а, напротив, резко возросли, возможно, как от-

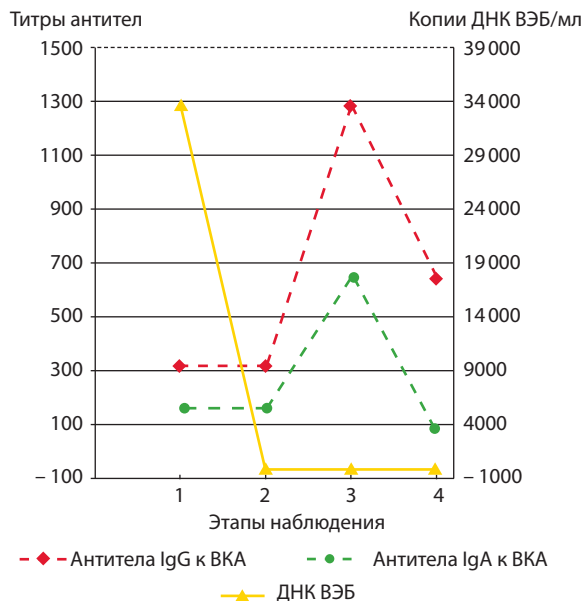


Рис. 3. Динамика маркеров ВЭБ у больного А. РНГ с положительным эффектом проведенной терапии: 1 – до начала лечения; 2 – после 1-го курса ХТ; 3 – после 2 курсов ХТ; 4 – после 3 курсов ХТ и ЛТ, завершившихся ремиссией

ражение усиления иммунного ответа на увеличившееся в организме больного количество вирусных белков из разрушенных ХТ опухолевых клеток. После 3-го курса ХТ титры вирусоспецифических антител довольно резко снизились, хотя и не до нормальных показателей, причем более значительно для IgA-антител к ВКА, отражая положительный эффект проведенной терапии.

Пример отсутствия эффекта проведенной терапии у больного Б. 44 лет с РНГ Т3N2M0 III стадии представлен на рис. 4, из которого видно, что исходный уровень ДНК ВЭБ в плазме крови больного до лечения был высоким (32 254 копии/мл), но после 1-го курса ХТ существенно снизился (1182 копии/мл). По-видимому, этот показатель отразил некоторый положительный ответ на проведенное лечение, сопровождавшееся зарегистрированным уменьшением размеров регионарных лимфатических узлов на 25 %. Однако после 2-го курса ХТ было отмечено резкое увеличение концентрации ДНК ВЭБ в плазме, что сочеталось с прогрессированием заболевания и появлением в костях опухолевых очагов. При этом титры IgG- и IgA-антител с уровнями концентрации ДНК не коррелировали. Высокие их титры, которые обнаружены при поступлении данного пациента в клинику, в отличие от уровней ДНК ВЭБ, отражающих динамику течения болезни, не снизились, а, напротив, повысились после проведенного 1-го курса ХТ. Но они снизились после 2-го курса ХТ, когда у больного было зарегистрировано прогрессирование опухолевого процесса. Последнее можно объяснить иммуносупрессией, обычно возникающей у больных в претерминальной стадии болезни [28].

В работах Y.M. Lo и других авторов [23, 24, 29] также сообщалось об увеличении концентрации ДНК

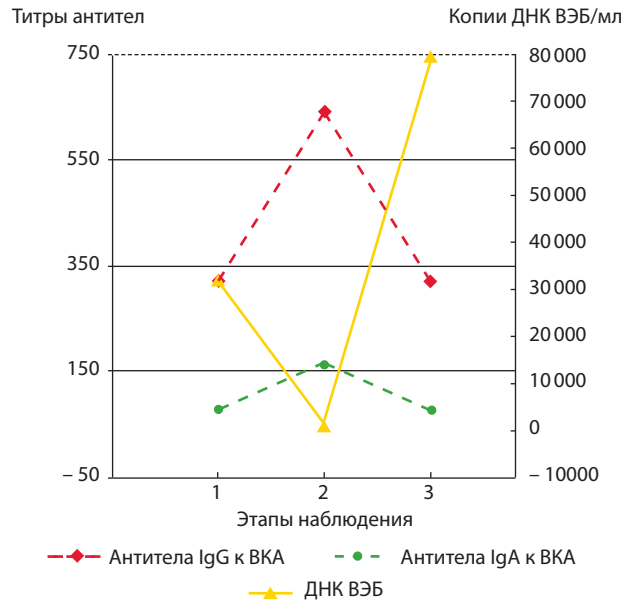


Рис. 4. Динамика маркеров ВЭБ у больного Б. РНГ с прогрессированием опухолевого процесса: 1 – до начала лечения; 2 – после 1-го курса ХТ (регресс лимфатических узлов на 25 %); 3 – после 2 курсов ХТ (прогрессирование опухолевого процесса, метастазирование в кости)

ВЭБ в плазме (сыворотке) больных РНГ, у которых регистрировали рецидив опухоли.

Обсуждение

Присутствие в плазме (сыворотке) больных со злокачественными опухолями высвобождающихся в кровеносное русло молекул ДНК из гибнущих в организме опухолевых клеток открыло новые возможности для малоинвазивной детекции и мониторинга целого ряда неоплазий [19, 20].

Поскольку РНГ тесно ассоциирован с ВЭБ, измерение концентрации вирусной ДНК в плазме тестируемых лиц стало эффективным методом обнаружения этого новообразования. Впервые высокая ценность уровней ДНК ВЭБ в плазме крови для диагностики РНГ была показана в эндемичных регионах по РНГ (Южном Китае и странах Юго-Восточной Азии). В настоящем исследовании, проводимом в неэндемичном регионе (России), также была показана четкая корреляция концентраций вирусной ДНК в плазме больных РНГ с их клиническим состоянием. У всех первичных больных зарегистрировано высокое число копий ДНК ВЭБ, что может служить важным диагностическим маркером. После проведенной терапии у больных, большинство которых находилось в состоянии ремиссии, этот показатель снижался до фоновых значений, но резко возрастал у всех пациентов с рецидивом опухолевого процесса. Этот факт может быть использован для мониторинга больных РНГ и прогноза. При этом в плазме крови пациентов с ДОПР и здоровых лиц уровни ДНК ВЭБ не превышали фоновых значений. Полученные нами результаты совпадают с данными, опубликованными Y.M. Lo et al. [22] и другими исследователями [23, 24, 29], обнаружившими высокий уровень содержания ДНК ВЭБ в плазме крови пациентов РНГ из эндемичных регионов и предложившими использовать этот тест для диагностики и мониторинга этих больных.

Тестирование больных РНГ на присутствие в их плазме (сыворотке) крови IgG-антител к ВКА, ВРА и IgA-антител к ВКА ВЭБ в качестве ценных маркеров для скрининга РНГ нами проводится уже в течение многих лет. Диагноз ставится на основании ре-

шающего правила, учитывающего совокупную значимость выявляемых титров антител обоих классов к ВКА и ВРА вируса. Особенно эффективным для диагностики РНГ оказалось серологическое тестирование больных с метастазами опухоли в лимфатические узлы шеи без выявленного первичного очага. Однако при длительном наблюдении за этими пациентами уровни вирусоспецифических антител не всегда отражали клиническое состояние больного, оставаясь, как правило, на высоком уровне. В настоящем исследовании нами обнаружены высокие уровни IgA-антител к ВКА ВЭБ у первичных больных РНГ и больных с рецидивом опухолевого процесса. В то же время у больных после ХТ и ЛТ при стабилизации опухолевого процесса или ремиссии, сопровождаемых падением концентраций вирусной ДНК, титры IgA-антител к ВКА ВЭБ не снижались, а по-прежнему оставались на высоком уровне (см. таблицу).

Заключение

Таким образом, результаты наших исследований, полученные при изучении больных РНГ в неэндемичном регионе, находятся в русле наблюдений Y.M. Lo и других авторов [22–24], проводивших свои исследования в эндемичных регионах и показавших ценность уровня копийности ДНК ВЭБ в качестве маркера, полезного для диагностики и мониторинга опухолевого процесса. Наши данные также позволяют сделать вывод о том, что уровни вирусной ДНК в плазме больных РНГ представляют собой более чувствительный и более специфический маркер, чем упомянутые титры IgG- и IgA-антител к ВКА, особенно для оценки эффективности терапии и прогноза, но последние остаются незаменимым маркером для первичной диагностики заболевания в случае метастазирования опухоли из невыявленного очага. Продолжение этих исследований нацелено на внедрение в клинику измерения вирусной ДНК и IgA-антител к ВКА в плазме крови больных РНГ в качестве полезных маркеров не только для ранней диагностики, оценки эффективности лечения и прогноза, но также для уточнения стадии заболевания, мониторинга локального рецидива и отдаленного метастазирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Young L.S., Rickinson A.B. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* 2004;4:757–68.
2. Gu A.D., Zeng M.S., Qian C.N. The criteria to confirm the role of Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma initiation. *Int J Mol Sci* 2012;13(10):13737–47.
3. Chang C.M., Yu K.J., Mbulaiteye S.M. et al. The extent of genetic diversity of Epstein-Barr virus and its geographic and disease patterns: a need for reappraisal. *Virus Res* 2009;143(2):209–21.
4. Yu M.C., Yuan J.M. Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Semin Cancer Biol* 2002;12(6):421–9.
5. Licitra L., Bernier J., Cvitkovic E. et al. Cancer of the nasopharynx. *Crit Rev Oncol Hematol* 2003;45(2):199–213.
6. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ. Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН 2008;19(2 прил. 1). [Davydov M.I., Axel E.M. Statistics of malignant neoplasms in Russia and CIS Countries. *Vestnik RONC im. N.N. Blokhina RAMN = Herald of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center with the RAMS* 2008;19(2 Suppl 1). (In Russ.)].

7. Barnes L., Eveson J.W., Reichart P., Sidransky D. Pathology and genetics of head and neck tumors. Lyon: IARC Press, 2005.
8. Luo S., Zhao L., Wang J. et al. Clinical outcomes for early-stage nasopharyngeal carcinoma with predominantly WHO II histology treated by intensity-modulated radiation therapy with or without chemotherapy in nonendemic region of China. *Head Neck* 2014;36(6):841–7.
9. Brennan B. Nasopharyngeal carcinoma. *Orphanet J Rare Dis* 2006;1:23.
10. Cho W.C. Nasopharyngeal carcinoma: molecular biomarker discovery and progress. *Mol Cancer* 2007;6:1.
11. Hubert A., De-The G. Dietary behavior, way of life, and nasopharyngeal cancer. *Bull Cancer* 1982;69(5):476–82.
12. Li J., Qian C.N., Zeng Y.X. Regulatory T cells and EBV associated malignancies. *Int Immunopharmacol* 2009;9(5):590–2.
13. Li X., Fasano R., Wang E. et al. HLA associations with nasopharyngeal carcinoma. *Curr Mol Med* 2009;9(6):751–65.
14. Yeung W.M., Zong Y.S., Chiu C.T. et al. Epstein-Barr virus carriage by nasopharyngeal carcinoma in situ. *Int J Cancer* 1993;53(5):746–50.
15. Gurtsevitch V., Ruiz R., Stepina V. et al. Epstein-Barr viral serology in nasopharyngeal carcinoma patients in the USSR and Cuba, and its value for differential diagnosis of the disease. *Int J Cancer* 1986;37(3):375–81.
16. Pearson G.R. Epstein-Barr virus and nasopharyngeal carcinoma. *J Cell Biochem Suppl* 1993;17F:150–4.
17. 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(3):356–62.
18. 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(3):885–90.
19. Lichtenstein A.V., Melkonyan H.S., Tomei L.D., Umansky S.R. Circulating nucleic acids and apoptosis. *Ann NY Acad Sci* 2001;945:239–49.
20. Sidransky D. Emerging molecular markers of cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2(3):210–9.
21. Skvortsova T.E., Rykova E.Y., Tamkovich S.N. 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(10):1492–5.
22. Lo Y.M., Chan L.Y., Chan A.T. et al. 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. Hou X., Zhao C., Guo Y. 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.
24. Wang W.Y., Twu C.W., Chen H.H. et al. Plasma EBV DNA clearance rate as a novel prognostic marker for metastatic/recurrent nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2010;16(3):1016–24.
25. Kondratova V.N., Botezatu I.V., Shelepov V.P., Lichtenstein A.V. Tube gel isotachopheresis: a method for quantitative isolation of nucleic acids from diluted solutions. *Anal Biochem* 2011;408(2):304–8.
26. Lawrence J.B., Villnavé 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.
27. 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.
28. Гурцевич В.Э., Степина В.Н., Сенюта Н.Б. и др. Гуморальный иммунный ответ к вирусу Эпштейна–Барр в диагностике рака носоглотки (обзор литературы и 30-летний опыт собственных исследований). Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН 2011;22(2):20–30. [Gurtsevich V.E., Stepina V.N., Senyuta N.B. et al. Humoral immune response to Epstein–Barr virus in diagnostics of nasopharyngeal carcinoma (review of references and 30-year experience of own studies). *Vestnik RONC im. N.N. Blokhina RAMN = Herald of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center with the RAMS* 2011;22(2):20–30. (In Russ.)].
29. Leung S.F., Chan K.C., Ma B.B. et al. Plasma Epstein-Barr viral DNA load at midpoint of radiotherapy course predicts outcome in advanced-stage nasopharyngeal carcinoma. *Ann Oncol* 2014; 25(6):1204–8.