

Распределение генов HLA II у больных раком носоглотки, ассоциированным с вирусом Эпштейна–Барр, и другими опухолями ротовой полости в России

Н.Б. Сениота¹, М.Н. Болдырева², Е.В. Гончарова¹, Д.М. Максимович¹, Л.Н. Щербак¹,
Т.Е. Душенькина¹, В.Э. Гурцевич¹

¹НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» ФМБА России»; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24, корп. 2

Контакты: Наталья Борисовна Сениота nat.senyuta@yandex.ru

Введение. Назофарингеальная карцинома (рак носоглотки, РНГ), как известно, строго ассоциирована с вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ). Однако ВЭБ является убиквитарной инфекцией, тогда как РНГ развивается довольно редко и характеризуется географически и этнически неоднородным распространением, что позволяет предположить важную роль других кофакторов в патогенезе РНГ, таких как окружающая среда и генетическая предрасположенность. Среди известных генетических факторов, ассоциированных с РНГ, главный комплекс гистосовместимости (лейкоцитарный антиген человека, human leukocyte antigen (HLA)) занимает важное положение, так как играет ключевую роль в презентации вирусных антигенов иммунной системы. В России изучение ассоциации аллелей HLA с риском развития РНГ, связанного с ВЭБ, не проводилось, а в литературе существуют противоречивые сведения о роли разных HLA-генов как в возникновении и развитии РНГ, так и в инициации и особенностях иммунного ответа к белкам ВЭБ.

Цель исследования – изучение распределения вариантов DQA1-, DQB1-, DRB1-генов HLA класса II у больных РНГ и пациентов с другими опухолями полости рта (ДОПР), ассоциированными и не ассоциированными с ВЭБ, в группах с высоким и низким уровнем гуморального иммунного ответа к основному белкам ВЭБ по сравнению с контрольной группой здоровых лиц.

Материалы и методы. Всего в исследование вошли 62 больных недифференцированным РНГ и 44 пациента с ДОПР, а также 300 здоровых лиц. Сыворотка крови всех больных была протестирована на наличие антител иммуноглобулинов классов G и A к капсидному и раннему антигенам ВЭБ методом непрямой иммунофлюоресценции. Все образцы генотипированы на HLA-DQA1, -DQB1 и -DRB1 с помощью мультипраймерной амплификации сиквенса-специфическими праймерами методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Результаты. Показано увеличение частоты HLA-DRB1*08 у пациентов с РНГ по сравнению с контролем (5,6 % против 1,8 %; отношение шансов (ОШ) 3,2; 95 % доверительный интервал (ДИ) 1,1–9,1; $p = 0,02$). Возможно, ген HLA-DRB1*08 ассоциирован с повышенной чувствительностью к РНГ. В то же время у пациентов с РНГ была выявлена более низкая, чем в контроле, частота HLA-DQB1*0301 (16,1 % против 25,3 %; $p < 0,05$). Вариант HLA-DQB1*0502–4, наоборот, реже встречался у пациентов с ДОПР, чем в контроле (1,1 % против 6,8 %; $p < 0,05$). Аналогичные наблюдения касаются HLA-DRB1*16, частота которого у пациентов с ДОПР была ниже, чем в контроле (1,1 % против 6,7 %; ОШ 0,16; 95 % ДИ 0,01–1,08; $p < 0,05$), т. е. ген HLA-DQB1*0301 ассоциирован с резистентностью к РНГ, а варианты HLA-DQB1*0502–4 и HLA-DRB1*16 – с резистентностью к ДОПР.

Интересен факт обнаружения различий в частоте HLA-DRB1*13 у пациентов с РНГ и ДОПР (17,7 % против 6,8 %; ОШ 2,9; 95 % ДИ 1,1–8,6; $p < 0,05$). Эти различия могут быть связаны с доказанным участием ВЭБ в развитии РНГ. Других различий по частотам генов HLA класса II между группами пациентов с РНГ и ДОПР не выявлено.

Впервые в России проведено изучение связи аллелей DQA1, DQB1 и DRB1 гена HLA с развитием назофарингеальной карциномы (РНГ) и ДОПР, ассоциированных и не ассоциированных с ВЭБ.

Заключение. Наши исследования в совокупности с уже известными данными позволяют заключить, что имеется определенная связь генов HLA класса II с развитием РНГ, однако для установления строгой ассоциации аллелей HLA класса II с РНГ и другими опухолями области головы и шеи полученных сведений недостаточно из-за сложности и вариабельности генетического контроля иммунных реакций, контролирующих опухолевый процесс.

Ключевые слова: рак носоглотки, вирус Эпштейна–Барр, лейкоцитарный антиген человека II класса, ассоциация с опухолевыми заболеваниями носоглотки

Для цитирования: Сениота Н.Б., Болдырева М.Н., Гончарова Е.В. и др. Распределение генов HLA II у больных раком носоглотки, ассоциированным с вирусом Эпштейна–Барр, и другими опухолями ротовой полости в России. Успехи молекулярной онкологии 2018;5(1):43–52.

HLA II genes distribution in Epstein–Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma and other tumors of the oral cavity patients in Russia

N. B. Senyuta¹, M. N. Boldyreva², E. V. Goncharova¹, D. M. Maximovich¹, L. N. Shcherbak¹,
T. E. Dushenkina¹, V. E. Gurtsevitch¹

¹Research Institute of Carcinogenesis, N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²State Research Center “Institute of Immunology”, Federal Medical-Biological Agency of Russia;
Build. 2, 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Background. It has been proved that for the nasopharyngeal carcinoma (NPC) the etiological agent is the Epstein–Barr virus (EBV). Being an ubiquitous infection, EBV, under certain conditions, is able to display its oncogenic potential. Among a wide range of tumors associated with EBV, the NPC occupies a special place because it is characterized by a geographically and ethnically heterogeneous distribution, suggesting that in the pathogenesis of NPC, in addition to EBV, an important role is played by other factors, such as genetic predisposition to this neoplasm. Among known genetic factors influencing the frequency of NPC development, the human leukocyte antigen (HLA) complex occupies an important place, as it plays a central role in the presentation of viral antigens to the immune system. In Russia, the association of HLA alleles with the risk of EBV associated forms of NPC development and with development of other oral cavity tumors (OOC), not associated with the virus, has not been studied. In the literature there are contradictory information about HLA genes, which determine the predisposition to the emergence of these tumors, and their role in the initiation and formation an immune response to EBV proteins.

Objective: to study the distribution of the of DQA1-, DQB1-, DRB1-HLA class II gene variants associated with respectively the risk or resistance to the development of NPC and OOC and with a high and low level of antibody response to EBV main proteins. A group of healthy persons served as a control.

Materials and methods. Blood samples from 62 patients with NPC, 44 patients with OOC, and as control, 300 healthy individuals, were used in the study. The blood serum samples of NPC and OOC patients were tested for the presence of immunoglobulin classes G and A antibodies to capsid and early EBV antigens by indirect immunofluorescence. All serum samples of patients and healthy individuals were genotyped on HLA-DQA1, -DQB1 and -DRB1 by the method of multi-primer amplification by sequence-specific primers by real-time polymerase chain reaction.

Results. In NPC patients, an increase in the frequency of HLA-DRB1*08 was found when compared with the frequency of a similar allele in healthy individuals (5.6 % vs 1.8 %; odds ratio (OR) 3.2; 95 % confidence interval (CI) 1.1–9.1; $p = 0.02$), and, on the contrary, a lower HLA-DQB1*0301 frequency was detected (16.1 % vs 25.3 %; $p < 0.05$) than in healthy individuals. The data obtained suggest that the HLA-DRB1*08 gene is associated with an increased sensitivity to NPC.

In OOC patients, HLA-DQB1*0502–4 and HLA-DRB1*16 variants were less common than in healthy individuals (1.1 % vs 6.8 %; $p < 0.05$ and 1.1 % vs 6.7 %; OR 0.16; 95 % CI 0.01–1.08; $p < 0.05$, respectively), suggesting that the HLA-DQB1*0301 gene is associated with resistance to NPC, and HLA-DQB1*0502–4 and HLA-DRB1*16 variants – with resistance to OOC.

It is interesting to note the difference in the frequency of HLA-DRB1*13 between NPC and OOC patients (17.7 % vs 6.8 %; OR 2.9; 95 % CI 1.1–8.6; $p < 0.05$). One can suggest that this difference is related to the proven involvement of EBV in the NPC development. There were no other differences in the frequencies of class II HLA genes between the groups of NPC and OOC patients.

For the first time in Russia the importance of alleles DQA1, DQB1 and DRB1 of the HLA gene for the NPC and OOC development, malignant tumors, respectively associated and non-associated with EBV, was studied. The results of the investigation completed together with known literature data allow us to conclude that the above alleles of the HLA class II gene can serve as a factor predisposing to the development of NPC in Russia.

Conclusion. However, in order to establish a strict association between a specific HLA haplotype and the NPC and OOC incidence, the information obtained is insufficient due to the complexity and variability of the genetic control of immune responses controlling the tumor process. A comprehensive study of this issue using different immune response genes and populations of different ethnic origins will probably help to elucidate the effect of genetic polymorphism on the risk of NPC and OOC development in Russia.

Key words: nasopharyngeal carcinoma, Epstein–Barr virus, human leukocyte antigen class II, association with tumor diseases of the nasopharynx

For citation: Senyuta N. B., Boldyreva M. N., Goncharova E. V. et al. HLA II genes distribution in Epstein–Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma and other tumors of the oral cavity patients in Russia. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5(1):43–52.

Введение

Назофарингеальная карцинома (рак носоглотки, РНГ) – опухоль эпителиального происхождения. Она морфологически подразделяется на ороговевающий и неороговевающий рак, в состав которого как подтип входит недифференцированный РНГ (нРНГ) [1].

Как известно, назофарингеальная карцинома строго ассоциирована с вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ). Эта ассоциация имеет неоспоримые доказательства,

такие как присутствие клональных геномов вируса в предраковых и раковых образованиях носоглотки и экспрессия в опухолевых клетках целого спектра вирусных маркеров, а также образование у больных нРНГ вирусоспецифических антител к основным белкам ВЭБ [2–5]. Установлено, что нРНГ, в отличие от РНГ другого типа, практически в 100 % случаев ВЭБ-положительный и сопровождается высокими титрами гуморальных антител к основным белкам ВЭБ, которые

увеличиваются до высоких уровней задолго до установления диагноза и снижаются до нормальных показателей в случае успешного лечения [6].

ВЭБ является убиквитарным, заражает в основном детей в раннем возрасте с установлением латентной инфекции в В-лимфоцитах, периодически реактивирующейся в эпителиальных клетках гортани. Несмотря на широкое распространение ВЭБ, РНГ развивается довольно редко, что позволяет предположить, что инфицирования ВЭБ недостаточно для развития рака и что другие кофакторы играют важную роль в патогенезе РНГ [7]. Для РНГ характерны неравномерное географическое распространение и семейная предрасположенность, что вызывает широкое обсуждение возможной связи генетической предрасположенности с риском развития РНГ в определенных популяционных группах населения. Согласно данным Международного противоракового агентства существуют зоны с высоким (Восточная и Юго-Восточная Азия), средним (Северная Африка и Арктика) и низким (большинство европейских стран) уровнем заболеваемости РНГ.

Ряд исследований показал, что примерно 10 % больных РНГ имеют семейную предрасположенность [8]. Результаты исследований, проведенных в Гонконге и Китае, продемонстрировали, что у родственников больных РНГ риск возникновения этого заболевания в 9,3 раза выше популяционного, что также подтверждается частым развитием данной патологии в семьях мигрантов из районов с высоким уровнем заболеваемости РНГ [9].

Среди генетических факторов, возможно ассоциированных с РНГ, гены главного комплекса тканевой совместимости человека (лейкоцитарный антиген человека, human leukocyte antigen (HLA)) занимают важное место, так как играют центральную роль в презентации вирусных антигенов клетками иммунной системы [10]. Система генов HLA является самой полиморфной из всех известных систем в геноме человека. Определенные варианты генов HLA ассоциированы с чувствительностью и устойчивостью организма к развитию различных заболеваний, в том числе инфекционных и опухолевых [11].

Впервые об ассоциации аллелей HLA с РНГ было сообщено в 1974 г. [12]. Сейчас важность генов HLA в регуляции чувствительности либо устойчивости к развитию РНГ становится все более очевидной.

Большинство работ, посвященных изучению ассоциации аллелей HLA с чувствительностью к РНГ, проводилось у пациентов из районов южного и северо-западного Китая [13, 14], являющихся эндемичными для РНГ.

В работе X. Li и соавт. [14] сообщается об ассоциации этнической принадлежности популяции, ее географического ареала с развитием РНГ. Распределение аллелей HLA среди населения в географической зоне с высоким уровнем заболеваемости РНГ значительно отличается, а иногда противоположно тому, что наблюдается среди населения с низкой заболеваемостью РНГ.

По современным представлениям, система HLA в зависимости от генетического варианта может влиять на развитие ряда злокачественных новообразований (лимфомы Ходжкина, саркомы Капоши, лимфомы Беркитта, РНГ и т. д.) [15]. С этой точки зрения варианты генов HLA могут быть связаны не только с повышением (либо понижением) чувствительности к развитию опухоли, но также и с модуляцией иммунного ответа различными канцерогенными факторами, в данном случае ВЭБ.

Известно, что наиболее важную роль в регуляции иммунного ответа на разные специфические антигены, в том числе вирусные, выполняют молекулы HLA класса II [11]. Ряд исследователей подтвердили взаимосвязь между комплексом HLA, генетической чувствительностью к РНГ и иммунным ответом к ВЭБ [16]. Предполагается, что локусы *HLA-DRB1* и *HLA-DQB1* могут влиять на гуморальный ответ к инфекции ВЭБ [17].

С учетом вышесказанного генетическая предрасположенность к развитию РНГ представляется весьма вероятной. Поскольку Россия относится к странам с низким уровнем заболеваемости РНГ, изучение ассоциации аллелей HLA с риском развития данной патологии, ассоциированной с ВЭБ, в России не проводилось. Работы по изучению генетической предрасположенности к РНГ представляются интересными и важными для понимания особенностей инфицированности населения России ВЭБ и развития ВЭБ-ассоциированных и ВЭБ-неассоциированных опухолей носоглотки.

В литературе существуют противоречивые сведения о роли различных генов HLA как в возникновении РНГ, так и в инициации и особенностях иммунного ответа к белкам ВЭБ.

Цель исследования — изучение распределения вариантов *DQA1*-, *DQB1*-, *DRB1*-генов HLA класса II у больных РНГ и другими опухолями полости рта (ДОПР), ассоциированными и не ассоциированными с ВЭБ, в группах с высоким и низким уровнем гуморального иммунного ответа к основным белкам ВЭБ по сравнению с контрольной группой здоровых лиц.

Материалы и методы

Образцы крови от 62 больных нРНГ и 44 пациентов с ДОПР собраны в отделении опухолей головы и шеи НИИ клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина». Образцы хранились при температуре -20°C . В группу пациентов с ДОПР вошли больные РНГ другой морфологической формы, раком слизистой оболочки полости рта, языка, подъязычной миндалины и с некоторыми другими новообразованиями полости рта. Диагнозы опухолевых патологий устанавливали на основании клинической картины, гистологических и серологических исследований. Пациенты с РНГ и ДОПР были включены в исследование с их согласия, в результате случайной выборки.

Проведение исследования одобрено Комитетом по этике ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина».

Сыворотка крови всех больных была протестирована на наличие антител иммуноглобулинов классов G и A (IgG и IgA) к капсидному и раннему антигенам ВЭБ методом непрямой иммунофлюоресценции. Для проведения реакции использовали конъюгированные козьи антитела против IgG и IgA человека. Методика постановки реакции иммунофлюоресценции описана ранее [18]. Диагностику РНГ, ассоциированного с ВЭБ, выполняли с помощью решающего правила для дифференциальной диагностики РНГ по титрам гуморальных антител к ВЭБ-ассоциированным антигенам [19].

Геномную ДНК из образцов периферической крови выделяли методом высаливания по стандартной процедуре [20]. Генотипирование проводили с помощью мультипраймерной амплификации сиквенс-специфическими праймерами методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Для типирования генов HLA класса II (*DQA1*, *DQB1*, *DRB1*) использовали наборы HLA-ДНК-Тех (ДНК-Технология, Москва). Набор для HLA-типирования позволял определить 14 вариантов гена *DRB1*, 12 вариантов (аллелей и групп аллелей) гена *DQB1* и 8 вариантов гена *DQA1*. Полимеразную цепную реакцию с автоматической регистрацией результата в режиме реального времени выполняли на приборе ДТ-96 (ДНК-Технология, Москва) по программам, рекомен-

дованным производителями набора. Характер распределения генов HLA у пациентов с РНГ и ДОПР сравнивали с иммуногенетическими параметрами здоровых лиц. Группу сравнения составили 300 доноров, проживающих в г. Москве.

Статистический анализ. Частоты вариантов генов HLA рассчитывали с помощью компьютерной программы Арлекин, версия 2.1 (<http://anthro.unige.ch/arlequin>). При статистической обработке данных достоверность определяли по двустороннему точному критерию Фишера. Для выявления значимости вариантов генов HLA в развитии заболеваний использовали отношение шансов (ОШ) и доверительный интервал (ДИ).

Результаты

На 1-м этапе проведено исследование гуморального ответа к белкам ВЭБ у больных нРНГ и пациентов с ДОПР. Титры вирусоспецифических антител у больных нРНГ существенно отличались от таковых у пациентов с ДОПР. Среднегеометрические значения титров антител IgG к капсидному и раннему антигенам ВЭБ у больных нРНГ были в десятки раз выше, чем у пациентов с ДОПР (1:690 и 1:83 для капсидного антигена и 1:238 и 1:4 для раннего антигена соответственно). Антитела IgA к капсидному и раннему антигену ВЭБ, наличие которых особенно характерно для нРНГ, у пациентов с ДОПР полностью отсутствовали (табл. 1).

Таблица 1. Антитела к ВЭБ в плазме крови больных раком носоглотки и пациентов с другими опухолями полости рта

Table 1. Antibodies against EBV in plasma of patients with nasopharyngeal cancer and patients with other tumors of the oral cavity

Параметр Parameter	Иммуноглобулин класса G Immunoglobulin G		Иммуноглобулин класса A Immunoglobulin A	
	Капсидный антиген ВЭБ EBV viral capsid antigen	Ранний антиген ВЭБ EBV early antigen	Капсидный антиген ВЭБ EBV viral capsid antigen	Ранний антиген ВЭБ EBV early antigen
Гуморальный ответ к ВЭБ у больных раком носоглотки (n = 62) <i>Humoral response to EBV in patients with nasopharyngeal cancer (n = 62)</i>				
Число сероположительных больных, % Number of seropositive patients, %	100	100	100	100
Среднегеометрическое значение титров антител Geometric mean of antibody titres	909,7*	310,2	260,8	190,8
Гуморальный ответ к ВЭБ у больных с другими опухолями полости рта (n = 44) <i>Humoral response to EBV in patients with other tumors of the oral cavity (n = 44)</i>				
Число сероположительных больных, % Number of seropositive patients, %	86,3	18,1	6,8	0
Среднегеометрическое значение титров антител Geometric mean of antibody titres	83,4	4,6	2,0	0

*Для определения титров антител иммуноглобулинов классов G и A к капсидному и раннему антигенам ВЭБ использовали десятикратные разведения плазмы крови.

Примечание. ВЭБ – вирус Эпштейна–Барр.

*Determination of antibody titres of immunoglobulins G and A against EBV viral capsid and early antigens was performed on tenfold dilutions of plasma.
Note. EBV – Epstein–Barr virus.

Полученные данные о наличии выраженной иммунной реакции на ВЭБ у пациентов с нРНГ подтверждают вирусную природу данного заболевания, однако при этом не исключается генетическая предрасположенность как к развитию опухолей в области ротоглотки, так и к формированию гуморального ответа на экспрессию вирусных белков ВЭБ.

Следующий этап исследований был направлен на изучение частоты распределения вариантов генов *HLA-DQA1*, *-DQB1* и *-DRB1* в группах пациентов с РНГ и ДОПР по сравнению с контрольной группой. Результаты представлены в табл. 2–4.

В локусе *DQA1* различий в частоте встречаемости вариантов гена *DQA1* как между группами больных, так

Таблица 2. Распределение вариантов гена *HLA-DQA1* в группах пациентов с раком носоглотки и другими опухолями полости рта и в контрольной группе
Table 2. Distribution of the *HLA-DQA1* gene variants in the groups of patients with nasopharyngeal cancer and other tumors of the oral cavity and in the control group

Аллель <i>DQA1</i> <i>DQA1</i> allele	Пациенты с раком носоглотки (<i>n</i> = 62) Patients with nasopharyngeal cancer (<i>n</i> = 62)		Пациенты с другими опухолями полости рта (<i>n</i> = 44) Patients with other tumors of the oral cavity (<i>n</i> = 44)		Контрольная группа (<i>n</i> = 300) Control group (<i>n</i> = 300)	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
0101	13	10,5	14	15,9	78	13,0
0102	33	26,6	14	15,9	114	19,0
0103	12	9,7	5	5,7	64	10,7
0201	19	15,3	16	18,2	87	14,5
0301	15	12,1	13	14,8	72	12,0
0401	4	3,2	1	1,1	9	1,5
0501	28	22,6	24	27,3	174	29,0
0601	0	0	1	1,1	2	0,3

Таблица 3. Распределение вариантов гена *HLA-DQB1* в группах пациентов с раком носоглотки и другими опухолями полости рта и в контрольной группе
Table 3. Distribution of the *HLA-DQB1* gene variants in the groups of patients with nasopharyngeal cancer and other tumors of the oral cavity and in the control group

Аллель <i>DQB1</i> <i>DQB1</i> allele	Пациенты с раком носоглотки (<i>n</i> = 62) Patients with nasopharyngeal cancer (<i>n</i> = 62)		Пациенты с другими опухолями полости рта (<i>n</i> = 44) Patients with other tumors of the oral cavity (<i>n</i> = 44)		Контрольная группа (<i>n</i> = 300) Control group (<i>n</i> = 300)	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
0201	21	16,9	19	21,6	117	19,5
0301	20	16,1 (<i>p</i> < 0,05)	21	23,9	152	25,3
0302	10	8,1	8	9,1	42	7
0303	7	5,6	4	4,6	20	3,3
0304	2	1,6	1	1,1	1	0,2
0305	0	0	1	1,1	0	0
0401/2	5	4,0	1	1,1	10	1,7
0501	11	8,9	11	12,5	65	10,8
0502–4	10	8,1 (<i>p</i> < 0,05)	1	1,1 (<i>p</i> < 0,05)	41	6,8
0503	2	1,6	3	3,4	13	2,2
0601	6	4,8	3	3,4	19	3,2
0602–8	30	24,2	15	17,1	120	20,0

Таблица 4. Распределение вариантов гена *HLA-DRB1* в группах пациентов с раком носоглотки и другими опухолями полости рта и в контрольной группе

Table 4. Distribution of the *HLA-DRB1* gene variants in the groups of patients with nasopharyngeal cancer and other tumors of the oral cavity and in the control group

Аллель <i>DRB1</i> <i>DRB1</i> allele	Пациенты с раком носоглотки (<i>n</i> = 62) Patients with nasopharyngeal cancer (<i>n</i> = 62)		Пациенты с другими опухолями полости рта (<i>n</i> = 44) Patients with other tumors of the oral cavity (<i>n</i> = 44)		Контрольная группа (<i>n</i> = 300) Control group (<i>n</i> = 300)	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
01	12	9,7	11	12,5	57	9,5
03	9	7,3	8	9,1	45	7,5
04	15	12,1	12	13,6	69	11,5
07	17	13,7	17	19,3	86	14,3
08	7	5,6 (<i>p</i> < 0,05)	1	1,1	11	1,8
09	0	0	0	0	4	0,6
10	0	0	0	0	8	1,3
11	14	11,3	13	14,8	85	14,2
12	2	1,6	3	3,4	19	3,2
13	22	17,7 (<i>p</i> < 0,05)	6	6,8	83	13,8
14	2	1,6	3	3,4	14	2,3
15	17	13,8	13	14,8	79	13,2
16	7	5,6	1	1,1 (<i>p</i> < 0,05)	40	6,7

и между пациентами и контрольной группой не обнаружено (см. табл. 2).

В локусе *DQB1* в группе больных РНГ выявлена более низкая, чем в контрольной группе, пропорция варианта *DQB1*0301* (16,1 % против 25,3 %; ОШ 0,57; 95 % ДИ 0,33–0,97; *p* = 0,03). У пациентов с ДОПР частота варианта *DQB1*0502–4* была ниже, чем в контрольной группе (1,1 % против 6,8 %; ОШ 0,16; 95 % ДИ 0,01–1,08; *p* < 0,05) и в группе больных РНГ (1,1 % против 8,1 %; ОШ 0,13; 95 % ДИ 0,01–1,02; *p* < 0,05) (см. табл. 3).

В локусе *DRB1* частота *HLA-DRB1*08* в группе больных РНГ была выше, чем в контрольной группе (5,6 % против 1,8 %; ОШ 3,2; 95 % ДИ 1,1–9,1; *p* < 0,05). В группе больных РНГ чаще, чем в группе пациентов с ДОПР, встречался вариант *HLA-DRB1*13* (17,7 % против 6,8 %; ОШ 2,9; 95 % ДИ 1,1–8,6; *p* < 0,05). В то же время значимых различий обеих групп пациентов по *HLA-DRB1*13* с контрольной группой не обнаружено. У пациентов с ДОПР частота *HLA-DRB1*16* была ниже, чем в контрольной группе (1,1 % против 6,7 %; ОШ 0,16; 95 % ДИ 0,01–1,08; *p* < 0,05). Различия с группой больных РНГ не были значимыми из-за малочисленности выборки (см. табл. 4).

Обсуждение

На сегодняшний день опубликовано немного работ, посвященных поиску ассоциации генов HLA

класса II с РНГ, и их результаты достаточно противоречивы.

В литературе имеются единичные работы, посвященные исследованию распределения частот этого гена у пациентов с РНГ. Опубликована работа, в которой авторы отмечают снижение частоты аллелей *DQA1*0103* и *DQA1*0201* у пациентов с РНГ греческого происхождения [21]. У представителей народности хань из Китая с диагностированным РНГ было выявлено снижение частоты аллеля *DQA1*0201* и увеличение частоты аллеля *DQA1*0101* [22]. В нашем исследовании различий в частотах гена *HLA* между пациентами с РНГ, ДОПР и контрольной группой не найдено.

При исследовании популяции хань из Китая не удалось обнаружить изменений в распределении гена *DQB1* у пациентов с РНГ по сравнению с контрольной группой [13, 22]. Также не найдено подобных различий и в греческой популяции [21]. Единственная работа, в которой упоминается связь чувствительности к РНГ и гена *DQB1*, — это исследование, выполненное в Тунисе, в котором с чувствительностью к РНГ был ассоциирован *DQB1*02*, а с устойчивостью к этому заболеванию — *DQB1*05* [23].

В нашем исследовании у пациентов с РНГ выявлена более низкая, чем в контрольной группе, частота *HLA-DQB1*0301* (16,1 % против 25,3 %; *p* < 0,05), а у пациентов с ДОПР она не отличалась от таковой

в контрольной группе. Вариант *HLA-DQB1*0502-4*, наоборот, реже встречался у пациентов с ДОПР, чем в контрольной группе (1,1 % против 6,8 %; $p < 0,05$) и у больных РНГ (1,1 % против 8,1 %; ОШ 0,13; 95 % ДИ 0,01–1,02; $p < 0,05$), а его частота у пациентов с РНГ не отличалась от контрольной группы. Аналогичные наблюдения касаются *HLA-DRB1*16*, частота которого у пациентов с ДОПР была ниже, чем в контрольной группе (1,1 % против 6,7 %; ОШ 0,16; 95 % ДИ 0,01–1,08; $p < 0,05$), а у больных РНГ не отличалась от этого показателя в контрольной группе. Сходство, вероятно, связано с тем, что указанные варианты генов *DRB1* и *DQB1* очень часто встречаются в виде гаплотипа *DRB1*16-DQB1*0502-4*. Трудно найти объяснение тому, что такое сочетание генов HLA реже встречается у пациентов с ДОПР. Возможно, это свидетельствует о различных вариантах иммунного ответа на разные типы опухолей, однако данное предположение требует дальнейшего подтверждения.

Наибольшее количество данных о связи генов HLA класса II с РНГ получено относительно гена *DRB1*, самого полиморфного среди генов HLA класса II. Поскольку РНГ эндемичен для Китая, большинство работ выполнено учеными из этой страны. Так, исследования ассоциаций HLA и РНГ на основе метаанализов были выполнены 2 группами китайских ученых последовательно в 2016 и 2017 гг. Для работы обе группы использовали практически одни и те же источники информации: PubMed, Web of Science, China National Knowledge Internet (CNKI), Wanfang, за исключением двух. Одна группа применяла дополнительно Embase, другая – Weipu. В работе Н. Yang и соавт., опубликованной в 2016 г., при анализе результатов 8 исследований (778 пациентов с РНГ и 1148 здоровых лиц) было сделано общее заключение о наличии связи вариантов *HLA-DRB1*01*, **03*, **09* и **10* с чувствительностью к РНГ [24]. В той же работе отмечено, что связь вариантов *HLA-DRB1*08*, **11* и **16* с риском развития РНГ значительно различается в зависимости от этнической принадлежности. В более позднем исследовании, выполненном К. Yao и соавт., на основании анализа 12 работ (1152 пациента с РНГ и 1600 здоровых лиц) сделано заключение о том, что варианты *HLA-DRB1*03*, **08*, **09* и **10* ассоциированы с чувствительностью к РНГ, а варианты *HLA-DRB1*11* и **12* могут быть важными протективными факторами для развития этого заболевания, особенно для популяций азиатского происхождения [25]. После стратификации результатов исследований с учетом популяционной принадлежности пациентов, по данным Н. Yang и соавт. [24], для азиатских популяций чувствительность к РНГ связана с вариантами *HLA-DRB1*03*, **08* и **10*, по данным К. Yao и соавт. [25] – с *HLA-DRB1*03*, **08*, а также с вариантом *HLA-DRB1*09*, который в работе Н. Yang и соавт. [24] был протективным. В исследовании К. Yao и соавт. [25] для популяций азиатского происхождения протективными были *HLA-DRB1*11* и **12*, что полностью

совпадает с данными, полученными Н. Yang и соавт. [24]. Х. Geng и соавт. [26] установили, что аллель *HLA-DRB1*0701* у китайских уйгуров ассоциируется с трехкратным увеличением риска развития РНГ, а у китайской народности хань аллель *HLA-DRB1*0101* ассоциирован с устойчивостью к РНГ, т. е. в популяциях, имеющих одно и то же азиатское происхождение, встречается разнообразие как чувствительных, так и устойчивых вариантов среди генов HLA класса II.

Для жителей Туниса, имеющих североафриканско-средиземноморское происхождение, по результатам одного метаанализа, в качестве чувствительного к РНГ упоминается только аллель *HLA-DRB1*03*, протективными были аллели *HLA-DRB1*01* и **11* [24]; по данным другого метаанализа, чувствительными к РНГ являлись *HLA-DRB1*01* и **03* [25], протективным – только *HLA-DRB1*11*. По результатам исследования [23], чувствительность к РНГ ассоциирована с *HLA-DRB1*03*, **13*, а устойчивость – с *DRB1*01*. Таким образом, даже в работах, базирующихся на одних и тех же источниках информации, присутствуют расхождения, вплоть до изменения направления ассоциации на противоположное.

Данных об ассоциации РНГ с генами HLA класса II у европейцев практически нет, вероятно, из-за редкой встречаемости этого заболевания. По результатам одного метаанализа, у европейцев с чувствительностью к РНГ ассоциированы аллели *HLA-DRB1*01* и **03*, а протективным является *HLA-DRB1*16* [24]. Авторы более позднего метаанализа сообщают об отсутствии у европейцев значимых ассоциаций генов HLA класса II с чувствительностью или устойчивостью к РНГ [25]. У пациентов греческого происхождения с РНГ установлено увеличение частоты встречаемости *DRB1*07* [21]. У американцев европейского происхождения с повышенной чувствительностью к развитию РНГ был ассоциирован аллель *DRB1*0405*, с устойчивостью к РНГ – *DRB1*1501*, однако авторы работы предупредили о том, что к этим данным нужно относиться с осторожностью из-за множественности сравнений [27].

В нашей работе у пациентов с РНГ продемонстрировано увеличение частоты *HLA-DRB1*08* по сравнению с контрольной группой (5,6 % против 1,8 %; ОШ 3,2; 95 % ДИ 1,1–9,1; $p < 0,05$). Вариант гена *HLA-DRB1*08* также упоминается в литературе как определяющий чувствительность к РНГ в азиатских популяциях [24]. Аналогичных данных по России до настоящего исследования опубликовано не было.

Следует отметить, что вариант *HLA-DRB1*08* ассоциирован с рядом аутоиммунных заболеваний в разных популяционных группах: у китайцев – с первичным билиарным циррозом [28], у иранцев – с аутоиммунным гепатитом [29], у португальцев – с системной красной волчанкой [30], у мексиканцев – с аутоиммунным диабетом [31]. Как уже было сказано, чаще в качестве ассоциированного с РНГ в разных популяциях упоминается вариант гена *HLA-DRB1*03* [24, 25], который также связан с различными аутоиммунными

заболеваниями [32, 33]. Неожиданные находки маркеров аутоиммунных заболеваний у онкологических пациентов наводят на мысль об исходе хронического, в том числе, возможно, и аутоиммунного, воспаления в рак в результате «истощения» иммунной системы. Связь аутоиммунных заболеваний с возникновением злокачественных опухолей в настоящее время активно изучается [34], но это направление только начинает развиваться.

Интересным является факт обнаружения в нашей работе различий в частоте *HLA-DRB1*13* между пациентами с РНГ и ДОПР (17,7 % против 6,8 %; ОШ 2,9; 95 % ДИ 1,1–8,6; $p < 0,05$). Эти различия могут быть связаны с доказанным участием ВЭБ в развитии РНГ, поскольку имеются данные о связи *HLA-DRB1*13* с чувствительностью к папилломавирус-ассоциированному раку шейки матки, влагалища, полового члена, вульвы и ротоглотки [35]. Других различий по частотам генов HLA класса II между группами пациентов с РНГ и ДОПР не обнаружено, несмотря на то, что больные нРНГ имели высокие титры антител к белкам ВЭБ, тогда как у пациентов с ДОПР наблюдался низкий уровень гуморального ответа, что соответствует общему гуморальному фону к ВЭБ среди здорового населе-

ния России [18]. Одинаковый уровень антител IgA к капсидному антигену ВЭБ у жителей Китая, относящихся к разным этническим группам (уйгуры и хань) и имевших разные HLA-маркеры чувствительности и устойчивости к РНГ, позволяет сделать заключение о том, что характер распределения генов *HLA-DRB1* в этих 2 этнических группах не связан с инфицированием ВЭБ [26]. Авторы, исследовавшие греческую популяцию, также пришли к выводу о том, что предрасположенность к РНГ независима от присутствия ВЭБ [21].

Заключение

Таким образом, наши исследования в совокупности с уже известными данными, полученными ранее, позволяют сделать заключение о том, что имеется определенная связь генов HLA класса II с развитием РНГ, однако полученных сведений недостаточно из-за сложности и вариабельности генетического контроля иммунных реакций, контролирующих опухолевый процесс. Необходимо более широкое изучение вопроса влияния генетического полиморфизма на риск развития РНГ, причем среди различных генов иммунного ответа и популяций разного этнического происхождения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Barnes L., Evenson J.W., Reichart P. et al. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon: IARC Press, 2005.
- zur Hausen H., Schulte-Holthausen H., Klein G. et al. EBV DNA in biopsies of Burkitt tumors and anaplastic carcinoma of the nasopharynx. Nature 1970;228(5276):1056–8. PMID: 4320657.
- Ho H.C., Ng M.H., Kwan Y.C., Chau J.C. Epstein–Barr-virus-specific IgA and IgG serum antibodies in nasopharyngeal carcinoma. Br J Cancer 1976;34(6):655–60.
- Pearson G.R. Epstein–Barr virus and nasopharyngeal carcinoma. J Cell Biochem Suppl 1993;17F:150–4. PMID: 8412186.
- Tsang C.M., Tsao S.W. The role of Epstein–Barr virus infection in pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma. Virol Sin 2015;30(2):107–21. DOI: 10.1007/s12250-015-3592-5. PMID: 25910483.
- 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. PMID: 75457.
- Chang E.T., Adami H.O. The enigmatic epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2006;15(10):1765–77. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-06-0353. PMID: 17035381.
- Huang T., Liu Q., Huang H., Cao S. Study on genetic epidemiology of nasopharyngeal carcinoma in Guangdong, China. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi 2002;19(2):134–7. PMID: 11941590.
- Grulich A.E., McCredie M., Coates M. Cancer incidence in Asian migrants to New South Wales, Australia. Br J Cancer 1995;71(2):400–8. PMID: 7841061.
- Nikolich-Zugich J., Fremont D.H., Miley M.J., Messaoudi I. The role of MHC polymorphism in anti-microbial resistance. Microbes Infect 2004;6(5):501–12. DOI: 10.1016/j.micinf.2004.01.006. PMID: 15109966.
- Хайтов Р.М., Алексеев Л.П. Физиологическая роль главного комплекса гистосовместимости человека. Иммунология 2001;(3):4–11. [Khaitov R.M., Alekseev L.P. Physiological role of the human major histocompatibility complex. Immunologiya = Immunology 2001;(3):4–11. (In Russ.)].
- Simons M.J., Day N.E., Wee G.B. et al. Nasopharyngeal carcinoma immunogenetic studies of Southeast Asian ethnic groups with high and low risk for the tumor. Cancer Res 1974;34(5):1192–5. PMID: 4842362.
- Wang R., Hu Y., Yindom L.M. et al. Association analysis between *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1*, and *DQB1* with nasopharyngeal carcinoma among a Han population in Northwestern China. Hum Immunol 2014;75(3):197–202. DOI: 10.1016/j.humimm.2013.12.015. PMID: 24389314.
- Li X., Fasano R., Wang E. et al. HLA associations with nasopharyngeal carcinoma. Curr Mol Med 2009;9(6):751–65. PMID: 19689302.
- Bateman A.C., Howell W.M. Human leukocyte antigens and cancer: is it in our genes? J Pathol (SICI)1096-9896(199907)188:3<231::AID-PATH325>3.0.CO;2-A. PMID: 10419588.
- Lung M.L., Cheung A.K., Ko J.M. et al. The interplay of host genetic factors and Epstein–Barr virus in the development of nasopharyngeal carcinoma. Chin J Cancer 2014;33(11):556–68. DOI: 10.5732/cjc.014.10170. PMID: 25367335.
- Rubicz R., Yolken R., Drigalenko E. et al. A genome-wide integrative genomic study localizes genetic factors influencing antibodies against Epstein–Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA-1). PLoS Genet 2013;9(1):e1003147. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003147. PMID: 23326239.

18. Гурцевич В.Э., Сенюта Н.Б., Ломаева М.В. и др. Серологические маркеры вируса Эпштейна–Барр у больных раком носоглотки в случаях невыявленного первичного очага. Вопросы вирусологии 2016;(61):205–12. [Gurtsevich V.E., Senyuta N.B., Lomaya M.V. et al. 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* 2016;(61):205–12. (In Russ.)].
19. 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):20–30. [Gurtsevich V.E., Stepina V.N., Senyuta N.B. et al. Humoral immune response to Epstein–Barr virus in the diagnosis of nasopharyngeal carcinoma (literature review and 30-year authors own experience). *Vestnik RONC im. N.N. Blokhina RAMN = Journal of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS* 2011;(22):20–30. (In Russ.)].
20. Miller S.A., Dykes D., Polesky H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16(3):1215. PMID: 3344216.
21. Karanikiotis C., Danilidis M., Karyotis N. et al. HLA Class II alleles and the presence of circulating Epstein–Barr virus DNA in Greek patients with nasopharyngeal carcinoma. *Strahlenther Onkol* 2008;184(6):325–31. DOI: 10.1007/s00066-008-1816-4. PMID: 18535809.
22. Zhou J.F., Guo S.S., Yu P. Association study on *HLA-DP* and *-DQ* allelic polymorphisms and nasopharyngeal carcinoma in the Han nationality in Hunan province. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2003;20(3):262–4. PMID: 12778461.
23. Makni H., Daoud J., Ben Salah H. et al. HLA association with nasopharyngeal carcinoma in Southern Tunisia. *Mol Biol Rep* 2010;37(5):2533–9. DOI: 10.1007/s11033-009-9769-y. PMID: 19714482.
24. Yang H., Yu K., Zhang R. et al. The *HLA-DRB1* allele polymorphisms and nasopharyngeal carcinoma. *Tumor Biol* 2016;37(6):7119–28. DOI: 10.1007/s13277-016-5051-9. PMID: 27059731.
25. Yao K., Yang S., Shen J. et al. *HLA-DRB1* allele polymorphism and nasopharyngeal carcinoma risk: a meta-analysis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2017;274(1):297–303. DOI: 10.1007/s00405-016-4264-2. PMID: 27535842.
26. Geng X.T., Hu Y.H., Dong T., Wang R.Z. Associations of human leukocyte antigen-DRB1 alleles with nasopharyngeal carcinoma and its clinical significance in Xinjiang Uyghur autonomous region of China. *Chin Med J (Engl)* 2016;129(11):1347–54. DOI: 10.4103/0366-6999.182833. PMID: 27231174.
27. Burt R.D., Vaughan T.L., McKnight B. et al. Associations between human leukocyte antigen type and nasopharyngeal carcinoma in Caucasians in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996;5(11):879–87. PMID: 8922295.
28. Zhao D.T., Liao H.Y., Zhang X. et al. Human leukocyte antigen alleles and haplotypes and their associations with antinuclear antibodies features in Chinese patients with primary biliary cirrhosis. *Liver Int* 2014;34(2):220–6. DOI: 10.1111/liv.12236. PMID: 23809616.
29. Baharlou R., Faghihi-Kashani A., Faraji F. et al. *HLA-DRB1* alleles of susceptibility and protection in Iranians with autoimmune hepatitis. *Hum Immunol* 2016;77(4):330–5. DOI: 10.1016/j.humimm.2016.01.007. PMID: 26780502.
30. Vasconcelos C., Carvalho C., Leal B. et al. HLA in Portuguese systemic lupus erythematosus patients and their relation to clinical features. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1173:575–80. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2009.04873.x. PMID: 19758202.
31. Rodríguez-Ventura A.L., Yamamoto-Furusho J.K., Coyote N. et al. *HLA-DRB1*08* allele may help to distinguish between type 1 diabetes mellitus and type 2 diabetes mellitus in Mexican children. *Pediatr Diabetes* 2007;8(1):5–10. DOI: 10.1111/j.1399-5448.2006.00221.x. PMID: 17341285.
32. Junge N., Tiedau M., Verboom M. et al. Human leukocyte antigens and pediatric autoimmune liver disease: diagnosis and prognosis. *Eur J Pediatr* 2016;175(4):527–37. DOI: 10.1007/s00431-015-2662-x. PMID: 26567543.
33. Beradhi B.S., Flesch B.K., Hansen M.P. et al. *HLA* class II differentiates between thyroid and polyglandular autoimmunity. *Horm Metab Res* 2016;48(4):232–7. DOI: 10.1055/s-0035-1559622. PMID: 26317691.
34. Giat E., Ehrenfeld M., Shoenfeld Y. Cancer and autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2017;16(20):1049–57. DOI: 10.1016/17.07.022. PMID: 28778707.
35. Madeleine M.M., Finch J.L., Lynch C.F. et al. HPV-related cancers after solid organ transplantation in the United States. *Am J Transplant* 2013;13(12):3202–9. DOI: 10.1111/ajt.12472. PMID: 24119294.

Вклад авторов

Н.Б. Сенюта: анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи;
 М.Н. Болдырева: обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных;
 Е.В. Гончарова: получение данных для анализа;
 Д.М. Максимович: статистическая обработка полученных данных;
 Л.Н. Щербак, Т.Е. Душенькина: получение данных для анализа;
 В.Э. Гурцевич: разработка дизайна исследования.

Authors' contributions

N.B. Senyuta: analysis of the obtained data, reviewing of publications of the article's theme, article writing;
 M.N. Boldyreva: reviewing of publications of the article's theme, analysis of the obtained data;
 E.V. Goncharova: obtaining data for analysis;
 D.M. Maximovich: statistical processing of the obtained data;
 L.N. Shcherbak, T.E. Dushenkina: obtaining data for analysis;
 V.E. Gurtsevich: developing the research design.

ORCID авторов

Н.Б. Сенюта: <https://orcid.org/0000-0001-8915-8274>
 М.Н. Болдырева: <https://orcid.org/0000-0003-2641-3471>

Е. В. Гончарова: <https://orcid.org/0000-0001-6274-1849>
Д. М. Максимович: <https://orcid.org/0000-0001-7560-5088>
Л. Н. Щербак: <https://orcid.org/0000-0002-7048-4691>
В. Э. Гурцевич: <https://orcid.org/0000-00031840-4364>

ORCID of authors

N. V. Senyuta: <https://orcid.org/0000-0001-8915-8274>
M. N. Boldyreva: <https://orcid.org/0000-0003-2641-3471>
E. V. Goncharova: <https://orcid.org/0000-0001-6274-1849>
D. M. Maximovich: <https://orcid.org/0000-0001-7560-5088>
L. N. Shcherbak: <https://orcid.org/0000-0002-7048-4691>
V. E. Gurtsevitch: <https://orcid.org/0000-00031840-4364>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.
Financing. The study was performed without external funding.

Информированное согласие. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.
Informed consent. All patients gave written informed consent to participate in the study.