

# ОБНАРУЖЕНИЕ ОНКОГЕНА E7 ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА 18-ГО ТИПА У БОЛЬНЫХ РАКОМ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Г.М. Волгарева, В.Д. Ермилова

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24

**Контакты:** Галина Михайловна Волгарева galina.volgareva@ronc.ru

**Введение.** Высокие показатели заболеваемости раком предстательной железы (РПЖ) свидетельствуют о важности изучения природы данного заболевания и поиска путей его профилактики. Вопрос об участии онкогенных вирусов папилломы человека (ВПЧ) в генезе РПЖ остается предметом дискуссий. В случае подтверждения факта ассоциации РПЖ с ВПЧ станет возможным предупреждение этого заболевания путем прививок мальчиков вакцинами, разработанными для профилактики рака шейки матки (РШМ).

**Цель работы** — продолжая начатое исследование, изучить хирургически удаленные у больных РПЖ ткани предстательной железы на предмет присутствия в них онкогена E7 ВПЧ18, 2-го по частоте типа ВПЧ, ответственного за возникновение РШМ.

**Материалы и методы.** Работа проведена на предстательных железах 17 больных РПЖ, получивших хирургическое лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Методом полимеразной цепной реакции провели детекцию онкогена E7 ВПЧ18. Для повышения чувствительности метода ДНК выделяли из однородных клеточных популяций, полученных путем микродиссекции криоконсервированных образцов РПЖ.

**Результаты.** Продукты амплификации, соответствующие онкогену E7 ВПЧ18, обнаружены в образцах от 2 больных РПЖ. **Заключение.** Онкоген E7 ВПЧ18 обнаружен в тканях предстательных желез, удаленных у больных РПЖ, в 2 случаях из 17. В совокупности с ранее полученными нами данными (7 ВПЧ16-положительных случаев РПЖ в той же выборке из 17 пациентов) этот результат позволяет предполагать участие онкогенных ВПЧ в генезе РПЖ. Проблема заслуживает дальнейшего изучения.

**Ключевые слова:** предстательная железа, рак, вирусы папилломы человека, профилактика

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-1-37-41

## DETECTION OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 18 ONCOGEN E7 IN PATIENTS WITH PROSTATE CANCER

G.M. Volgareva, V.D. Ermilova

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation;  
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

**Introduction.** High prostate cancer (PC) incidence rates testify to importance of research into genesis of the given disease and means of its prevention. The item of oncogenic human papillomaviruses (HPVs) participation in PC origination is still being the subject of debates. If association of PC with HPV is proven prophylaxis of the given disease becomes possible by means of inoculating boys with the vaccines made for cervical cancer (CC) prevention.

**Objective:** to test whether prostate tissues surgically removed from PC patients harbor oncogen E7 of HPV18 — the second most common HPV type responsible for CC.

**Materials and methods.** The study was carried out on prostate glands of 17 PC patients surgically treated in N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology. Detection of HPV18 oncogen E7 was done by polymerase chain reaction. To elevate polymerase chain reaction sensitivity DNA was isolated from homogeneous cell populations collected by means of microdissections from cryopreserved PC specimens.

**Results.** Amplification products corresponding to HPV18 oncogen E7 were registered in tests from 2 PC patients.

**Conclusion.** HPV18 oncogen E7 was detected in surgically removed prostate tissues of 2 PC patients. In the aggregate with our previous result (7 HPV16-positive PC cases in the same group of 17 patients) the given result enables one to presume participation of oncogenic HPVs in PC genesis. The problem deserves further study.

**Key words:** prostate gland, cancer, human papillomaviruses, prevention

### Введение

Вирусы папилломы человека (ВПЧ) типов высокого онкогенного риска являются этиологическими агентами рака шейки матки (РШМ), а также определенной части карцином иных локализаций — аногенитальной сферы, головы и шеи. В отношении некоторых других распространенных онкологических заболеваний, в частности рака легкого, мочевого пузыря, молочной железы (у женщин), предстательной железы (у мужчин), вопрос об ассоциации их с онкогенными ВПЧ остается дискутабельным («inadequate evidence») [1].

Что касается механизмов ВПЧ-индуцированного канцерогенеза, то «золотым стандартом» в исследованиях, посвященных этой проблеме, остаются клинические образцы РШМ, а также клетки длительно пересеваемых *in vitro* линий, полученных из этих опухолей; установлено, что для злокачественного превращения эпителиальной клетки под действием онкогенных ВПЧ необходима длительная вирусная инфекция, а также экспрессия вирусных онкогенов *E6* и *E7*, инактивирующих важнейшие белки клетки-хозяина, в том числе супрессоры опухолевого роста *p53* и *Rb*, с которыми взаимодействуют соответственно белки *E6* и *E7* [2, 3]. Среди ВПЧ типов высокого онкогенного риска основными являются ВПЧ16 — причина более чем половины всех случаев РШМ в мире, а также ВПЧ18 — этиологический агент приблизительно каждого 5-го случая РШМ [3].

Заболеемость раком предстательной железы (РПЖ) занимает 2-е место среди злокачественных опухолей у мужчин, хотя между разными странами мира частота РПЖ различается в 30 раз, а смертность от него — в 18 раз [4]. В тех странах, где большинство жителей отказались от курения, РПЖ стал обгонять по частоте рак легкого [5]. В России риск для мужчин заболеть РПЖ в период с 2010 по 2015 г. увеличился на 36,8 %; данный показатель оказался наивысшим среди всех аналогичных показателей прироста числа вновь выявленных заболеваний мужчин злокачественными новообразованиями за этот период [6]. Исчерпывающего понимания причин возникновения РПЖ на сегодня нет; проблема возможной ассоциации этой формы рака с онкогенными ВПЧ оказалась весьма сложной [7]. Актуальность изучения роли ВПЧ в генезе РПЖ высока: помимо теоретического аспекта (прояснения природы распространенной формы рака), в практическом плане в случае подтверждения существования такой ассоциации откроется перспектива профилактики РПЖ путем прививок мальчиков вакцинами, созданными для предупреждения РШМ. Ранее мы сообщили об обнаружении онкогена *E7* ВПЧ16 в 7 из 17 проанализированных образцов тканей предстательной железы, удаленных у больных РПЖ [8].

**Цель настоящей работы** — продолжая начатое исследование, изучить хирургически удаленные у больных РПЖ ткани предстательной железы на предмет присутствия в них онкогена *E7* ВПЧ18, 2-го по частоте типа ВПЧ, ответственного за возникновение РШМ.

Как и в случае с обнаружением *E7* ВПЧ16, для достижения этой цели предстояло учесть характерный для РПЖ мультицентрический рост опухоли. Априори это ставило под сомнение эффективность использования в полимеразной цепной реакции (ПЦР) ДНК, выделенной из предстательной железы больного РПЖ без предварительного вычленения из органа зон раковых клеток. Поэтому предпочтение было отдано методу микродиссекций препаратов РПЖ с последующим выделением ДНК из полученных однородных клеточных суспензий. Для большей сохранности ДНК, что представлялось важным на случай присутствия в исследуемых тканях геномов ВПЧ в малом количестве копий, использовали криоконсервированные, не подвергавшиеся обработке формалином и парафином, ткани предстательных желез.

### Материалы и методы

В работе были использованы лизаты тканей предстательных желез, удаленных при радикальной простатэктомии у 17 больных РПЖ, проходивших лечение в урологическом отделении ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Получение этих лизатов мы описали ранее [8]. Основные этапы процедуры были таковы. Патологически измененные области железы морфолог выделял при вырезке макроскопически. Не позднее 2 ч с момента хирургической операции фрагмент ткани с макроскопически выявленной патологией помещали в морозильную камеру (–70 °С). Далее готовили криостатные срезы, на которых проводили микродиссекции с параллельным микроскопическим анализом материала (для чего готовили специальный окрашенный препарат); из однородных клеточных суспензий, полученных в ходе микродиссекций, с помощью протеиназы К («Хеликон», Россия) выделяли ДНК.

Возраст больных, значения простатспецифического антигена в сыворотке крови, индекс Глисона, а также стадия опухоли по системе TNM представлены во 2–5-й графах таблицы. Эти данные, а также результаты гистологического исследования клинических материалов (см. таблицу, 6-я и 7-я графы) мы подробнее представили в предыдущем сообщении [8]. Присутствие в клеточных лизатах генетического материала ВПЧ18 проверяли методом ПЦР со следующими праймерами к *E7*: прямым (5'-GCTGAACCA CAACGTCAG AC-3') и обратным (5'-GGTCGTCTG CTGAGCTTTCT-3'). Праймеры были синтезированы в компании «Литех» (Россия). Длина продукта

Данные о больных РПЖ и результаты детекции онкогена E7 ВПЧ18 в тканях удаленных у них предстательных желез

№	Возраст, лет	Стадия TNM	Уровень простат-специфического антигена в сыворотке крови, нг/мл	Индекс Глисона в материале предоперационной биопсии	Гистологическое заключение об операционном материале	Гистологическое заключение о криостатном препарате, из которого выделяли ДНК	Результат детекции онкогена E7 ВПЧ18
1*	52	T2N0M0	5,9	7	Мелкоацинарный рак	ПИН I ПИН III	— —
2	60	T2N0M0	8,1	7	Умеренно-дифференцированная аденокарцинома	ПИН III	+
3	56	T2N0M0	9,3	6	Мелкоацинарный рак	ПИН III	+
4	64	T2N0M0	5,2	7	Мелкоацинарный рак	ПИН III	—
5	52	T2N0M0	42,0	6	Мелкоацинарный рак	ПИН III	—
6*	63	T2N0M0	4,7	6	Мелкоацинарный рак	Рак	—
7	63	T2N0M0	6,0	6	Мелкоацинарный рак	ПИН III	—
8*	66	T2N0M0	12,6	6	Мелкоацинарный рак	Рак	—
9	63	T3N0M0	4,9	6	Мелкоацинарный рак	ПИН III	—
10*	68	T2N0M0	42,0	7	Мелкоацинарный рак	Рак	—
11*	69	T2N0M0	32,8	7	Мелкоацинарный рак	Рак	—
12	67	T2N0M0	8,4	6	Мелкоацинарный рак	Нормальная ткань	—
13*	58	T2NxM0	22,8	8	Мелкоацинарный рак	Аденоз	—
14	55	T3N0M0	34,0	7	Элементов опухоли не обнаружено; лечебный патоморфоз рака	Нормальная ткань	—
15	68	T2N0M0	5,5	7	Мелкоацинарный рак	Доброкачественная гиперплазия	—
16	63	T2N0M0	8,4	8	Мелкоацинарный рак	Доброкачественная гиперплазия	—
17*	65	T2N0M0	4,6	7	Мелкоацинарный рак	Рак	—

**Примечание.** ПИН – простатическая интраэпителиальная неоплазия; \*E7 ВПЧ16–положительные случаи, согласно ранее полученным данным [8].

амплификации составляла 88 п. о. Состав реакционной смеси не отличался от ранее описанного [8]. Режим реакции был следующим: 94 °С – 4 мин, далее 35 циклов из 3 этапов: 94 °С – 30 с, 58 °С – 30 с, 72 °С – 90 с; заключительная элонгация при 72 °С – 6 мин.

При постановке ПЦР положительным контролем служила ДНК из клеток ВПЧ18-положительной линии HeLa РШМ (American Type Culture Collection, США); отрицательным контролем была реакционная смесь для ПЦР, не содержащая ДНК. Результаты учитывали при получении адекватных данных в положительном и отрицательном контролях.

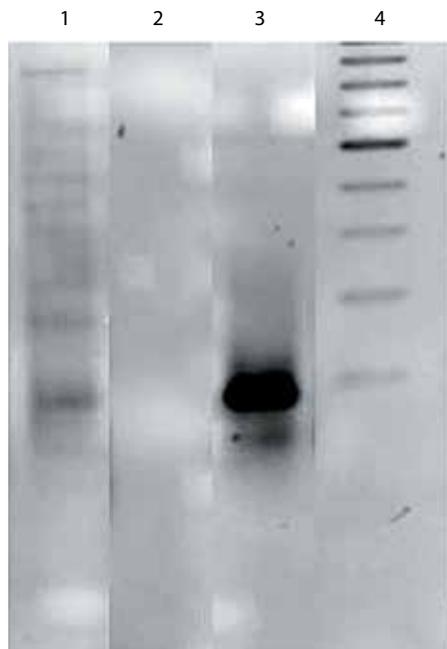
### Результаты и обсуждение

При гистологическом исследовании операционного материала (см. таблицу, 6-я графа) наличие ра-

ковой опухоли в предстательной железе было подтверждено для 16 из 17 больных; при этом на препарате, на котором проводили микродиссекцию, раковые клетки были обнаружены в 5 случаях (см. таблицу, 7-я графа).

С помощью ПЦР присутствие ДНК E7 ВПЧ18 было обнаружено в лизатах клеток тяжелых дисплазий предстательной железы (ПИН III) от 2 из 17 обследованных больных (см. таблицу, 8-я графа; рисунок). Ранее мы сообщали о выявлении онкогена E7 ВПЧ16 в клеточных лизатах, полученных из предстательных желез 7 обследованных больных РПЖ [8]. Эти случаи в настоящей работе отмечены знаком «\*» в 1-й графе таблицы.

В 5 из 17 изученных нами случаев РПЖ размер препарата, с которого проводили микродиссекции,



Электрофореграмма ПЦР-продуктов. Целевой продукт амплификации, соответствующий *E7* ВПЧ18 (88 п. н.), – в 1-м и 3-м треках. Трек 1 – больной № 2, ПИН III; трек 2 – отрицательный контроль (реакционная смесь без ДНК); трек 3 – ДНК HeLa (положительный контроль); трек 4 – маркер длин продуктов амплификации, шаг – 100 п. н.

оказался достаточным для того, чтобы отобрать клетки «условной нормы». Это были препараты от больных № 1, 2, 6, 8 и 10. Помимо отмеченного морфологом патологически измененного участка, с которого были выделены клетки ПИН I и ПИН III (больной № 1), ПИН III (больной № 2) или карциномы (больные № 6, 8 и 10), представилось также возможным отобрать клетки с участка препарата без микроскопически видимой патологии. Получив из этих зон клеточные лизаты, мы протестировали их в ПЦР с праймерами к *E7* ВПЧ16 (в соответствии с ранее описанной процедурой [8]) и ВПЧ18; во всех случаях результаты тестов оказались отрицательными. При этом в патологически измененных клетках у тех же больных результаты теста на *E7* ВПЧ16 или *E7* ВПЧ18 оказались положительными (см. таблицу).

В целом онкоген *E7* ВПЧ16 и ВПЧ18, 2 основных типов ВПЧ, являющихся этиологическими агентами РШМ, мы обнаружили в клетках дисплазий и карцином хирургически удаленных предстательных желез 9 из 17 больных РПЖ. У 5 из 9 ВПЧ-положительных больных, у которых представилось возможным протестировать условно нормальные клетки предстательной железы, результаты тестов оказались отрицательными.

Вопрос о вовлеченности онкогенных ВПЧ в генез РПЖ остается дискуссионным. Различаются как публикуемые разными авторами результаты детекции

генетического материала ВПЧ в клинических образцах РПЖ, так и интерпретация этих результатов [9–11]. Все известные нам работы, в которых предпринимались подобные попытки, были выполнены на фиксированных формалином, заключенных в парафин тканях, из которых после депарафинирования выделялась тотальная ДНК, т. е. накопление раковых клеток, которое достигается при микродиссекции, не проводилось. Отдельного упоминания заслуживает недавняя публикация группы австралийских исследователей, сопоставивших частоты ВПЧ-положительных дисплазий предстательной железы с частотами ВПЧ-положительных случаев РПЖ, развившегося у тех же мужчин через промежуток времени от 1 года до 10 лет после выявления у них дисплазии [11]. Оказалось, что онкоген *E7* ВПЧ типов высокого риска в ПЦР обнаруживался в дисплазиях достоверно чаще, чем в карциномах; этот результат авторы подтвердили в иммуногистохимическом тесте с антителами к белку *E7* широкого спектра онкогенных ВПЧ: экспрессия онкобелка *E7* составила 82 % в дисплазиях и 29 % в карциномах. На основании этих наблюдений авторы пришли к заключению, что активность онкогенов ВПЧ типов высокого риска является ранним событием в генезе большей части случаев РПЖ и что онкогенные ВПЧ имеют отношение к этиологии данной формы рака.

Таким образом, на группе российских больных РПЖ нами получены результаты, которые свидетельствуют о возможном вовлечении 2 основных типов онкогенных ВПЧ, ответственных за развитие РШМ, в генез РПЖ. В работе впервые использованы криоконсервированные, не подвергавшиеся обработке формалином и парафином, образцы опухолей, что способствовало лучшей сохранности ДНК.

### Заключение

Онкоген *E7* ВПЧ18 обнаружен в тканях удаленных у больных РПЖ предстательных желез в 2 случаях из 17. В совокупности с ранее полученными нами данными (7 *E7* ВПЧ16-положительных случаев РПЖ в той же выборке из 17 больных) этот результат позволяет предполагать, что ВПЧ16 и ВПЧ18, основные типы ВПЧ, ответственные за развитие РШМ, нередко присутствуют в предстательных железах российских больных РПЖ. Впервые при исследовании возможности ассоциации РПЖ с ВПЧ нами применен метод микродиссекций криостатных срезов предстательной железы, что позволило обеспечить большую сохранность ДНК и выделять ее из однородных клеточных популяций. Представленные данные важны для выяснения этиологии и разработки мер профилактики РПЖ. Проблема возможной ассоциации РПЖ с ВПЧ типов высокого онкогенного риска заслуживает дальнейшего изучения.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 90. Human Papillomaviruses. Lyon, 2007. 689 p.
2. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002;2(5):342–50. DOI: 10.1038/nrc798. PMID: 12044010.
3. zur Hausen H. To vaccination and beyond. *Biochemistry (Moscow)* 2008;73(5):498–503. PMID: 18605974.
4. Torre L.A., Siegel R.L., Ward E.M., Jemal A. Global cancer incidence and mortality rates and trends – an update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2016;25(1):16–27. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-15-0578. PMID: 26667886.
5. Имянитов Е.Н. Эпидемиология и биология рака простаты. *Практическая онкология* 2008;(2):57–64. [Imyanitov E.N. Prostate cancer epidemiology and biology. *Prakticheskaya onkologiya = Practical Oncology* 2008;(2):57–64. (In Russ.)].
6. Давыдов М.М., Аксель Е.М. Стандартизованные показатели онкоэпидемиологической ситуации 2015 г. Россия. *Евразийский онкологический журнал* 2017;5(2):298–317. [Davydov M.M., Aksel E.M. Normalized indices of oncoepidemiologic situation in 2015 in Russia. *Evraziysky onkologicheskyy zhurnal = Eurasian Oncologic Journal* 2017;5(2):298–317. (In Russ.)].
7. Волгарева Г.М. Ассоциирован ли рак предстательной железы с вирусами папилломы человека? *Российский биотерапевтический журнал* 2017;16(2):6–12. [Vlgareva G.M. Is there an association between prostate cancer and human papillomaviruses? *Rossiysky bioterapevtichesky zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2017;16(2):6–12. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-2-6-12.
8. Волгарева Г.М., Ермилова В.Д., Хачатурян А.В. и др. Обнаружение онкогена *E7* вируса папилломы человека 16-го типа в операционном материале от российских больных раком предстательной железы. *Российский биотерапевтический журнал* 2017;16(3):59–62. [Vlgareva G.M., Ermilova V.D., Khachatryan A.V. et al. Detection of Human papillomavirus type 16 oncogen *E7* in surgical materials from Russian prostate cancer patients. *Rossiysky bioterapevtichesky zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2017;16(3):59–62. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-59-62.
9. Aghakhani A., Hamkar R., Parvin M. et al. The role of human papillomavirus infection in prostate carcinoma. *Scand J Infect Dis* 2011;43(1):64–9. DOI: 10.3109/00365548.2010.502904. PMID: 20662618.
10. Smelov V., van Moorselaar J., Startsev V. et al. No high-risk human papillomavirus infection in prostate cancer tissues. *Scand J Infect Dis* 2011;43(5):399–400. DOI: 10.3109/00365548.2011.552071. PMID: 21250904.
11. Glenn W.K., Ngan C.C., Amos T.G. et al. High risk human papilloma viruses (HPVs) are present in benign prostate tissues before development of HPV associated prostate cancer. *Infect Agent Cancer* 2017;12:46. DOI: 10.1186/s13027-017-0157-2. PMID: 28811834.

**ORCID авторов/ORCID of authors**

Г.М. Волгарева/G.M. Vlgareva: <https://orcid.org/0000-0002-6817-2103>

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

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