

# ОБНАРУЖЕНИЕ ОНКОГЕНА E7 ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА 16-ГО ТИПА В ОПЕРАЦИОННОМ МАТЕРИАЛЕ ОТ РОССИЙСКИХ БОЛЬНЫХ РАКОМ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Г.М. Волгарева\*, В.Д. Ермилова\*, А.В. Хачатурян, В.В. Татарский, Л.С. Павлова

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

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

**Введение.** Высокие показатели заболеваемости раком предстательной железы (РПЖ) и смертности от него, а также быстрые темпы роста этих показателей свидетельствуют о важности изучения природы РПЖ и поиска способов его профилактики. Вопрос о возможной ассоциации РПЖ с онкогенными вирусами папилломы человека (ВПЧ) остается открытым.

**Цель работы** — изучить хирургически удаленные у больных РПЖ ткани предстательной железы на предмет присутствия в этих тканях онкогена E7 ВПЧ 16-го типа (ВПЧ16), основного типа ВПЧ, ответственного за возникновение рака шейки матки.

**Материалы и методы.** Протестированы методом полимеразной цепной реакции удаленные при радикальной простатэктомии ткани предстательной железы 17 больных РПЖ. Для лучшей сохранности ДНК использованы криоконсервированные (не подвергавшиеся обработке формалином и парафином) образцы опухолей. Свойственный РПЖ мультифокальный характер роста учли, применив метод микродиссекций для накопления однородных клеток (рака, дисплазии, нормального эпителия железы).

**Результаты.** ДНК онкогена E7 ВПЧ16 была обнаружена в материалах от 7 больных РПЖ из 17 обследованных, в том числе во всех 5 случаях, когда ДНК была выделена из гомогенных областей РПЖ.

**Заключение.** Полученные результаты позволяют предполагать, что ВПЧ16 нередко присутствует в предстательных железах российских больных РПЖ.

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

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-59-62

## DETECTION OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 16 ONCOGENE E7 IN SURGICAL MATERIALS FROM RUSSIAN PROSTATE CANCER PATIENTS

G.M. Volgareva, V.D. Ermilova, A.V. Khachaturyan, V.V. Tatarskiy, L.S. Pavlova

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

**Introduction.** High indices of prostate cancer (PC) incidence and mortality as well as high speed of growth of these figures testify to urgency of research into PC origin as well as means of its prophylaxis. The problem of possible PC association with oncogenic human papillomaviruses (HPV) is still being disputable.

**Objective:** to test whether surgical materials from PC patients in Russia harbour E7 oncogene of HPV type 16 (HPV16), the main HPV type responsible for cervical cancer.

**Materials and methods.** Prostate tissues excised in the course of radical prostatectomy from 17 PC patients were tested by polymerase chain reaction. For better DNA preservation cryopreserved tumor specimens not treated with either formalin or paraffin were used. The PC typical multifocal type of growth was taken into account by microdissecting of cryostate cuts to accumulate homogeneous cells (cancerous, dysplastic or normal).

**Results.** HPV16 E7 was registered in prostate tissues of 7 patients out of 17 examined including all those 5 cases for which DNA had been isolated from homogeneous sites of cancer cells.

**Conclusion.** The result obtained enables one to admit that HPV16 may be harbored in prostates of Russian PC patients not infrequently.

**Key words:** prostate, cancer, human papillomaviruses, prophylaxis

\* Эти авторы внесли равный вклад в выполнение работы.

### Введение

Рак предстательной железы (РПЖ) в мире занимает 2-е место среди злокачественных опухолей у мужчин [1]. Полного понимания причин возникновения РПЖ пока нет. Высокие показатели заболеваемости и смертности, а также быстрые темпы роста этих показателей свидетельствуют о важности изучения природы РПЖ и поиска способов его профилактики.

Одним из этиологических факторов РПЖ могут быть онкогенные вирусы папилломы человека (ВПЧ). Несмотря на то что вопрос о возможности ассоциации РПЖ с ВПЧ обсуждается длительное время, он по-прежнему остается открытым. Актуальность решения этого вопроса очевидна: в случае подтверждения участия ВПЧ в генезе РПЖ открывается перспектива предупреждения этого заболевания путем прививок мальчиков вакцинами, созданными для профилактики рака шейки матки (РШМ).

Что касается РШМ, то для этой формы рака известно, что злокачественное превращение эпителиальной клетки осуществляется после длительной вирусной инфекции под воздействием белковых продуктов 2 генов онкогенных ВПЧ: *E6* и *E7*. Основным среди онкогенных ВПЧ, иначе именуемых ВПЧ типов высокого онкогенного риска, ответственным за возникновение более чем 50 % случаев РШМ, является ВПЧ 16-го типа (ВПЧ16) [2, 3].

**Цель работы** – изучить хирургически удаленные у больных РПЖ ткани предстательной железы на предмет присутствия в этих тканях онкогена *E7* ВПЧ16, основного типа ВПЧ, ответственного за возникновение РШМ.

### Материалы и методы

Работу провели на предстательных железах, удаленных при радикальной простатэктомии у 17 больных РПЖ, проходивших лечение в урологическом отделении НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Для лучшей сохранности нуклеиновых кислот образцы тканей удаленных желез после вырезки криоконсервировали (не подвергали обработке формалином и парафином). Учитывая характерный для РПЖ мультицентрический рост опухоли, патологически измененные области железы морфолог на 1-м этапе выделял при вырезке макроскопически; в дальнейшем на криостатных срезах был использован метод микродиссекций с параллельным микроскопическим анализом материала, из которого выделяли ДНК. Возраст больных, уровень простатспецифического антигена в сыворотке крови, индекс Глисона (по результатам предварительной биопсии опухоли), а также стадия опухоли по системе TNM представлены в таблице.

Патологически измененные участки железы вырезали не позднее 1–2 ч после операции, затем фрагмент ткани с макроскопически видимой патологией,

предназначенный для детекции ВПЧ, помещали в морозильную камеру ( $-70^{\circ}\text{C}$ ). Микродиссекцию криостатных срезов и выделение ДНК проводили с помощью протеиназы К в соответствии с процедурой, описанной Z. Guo и соавт. [4]. Из фрагмента ткани предстательной железы, отобранного морфологом, с помощью криостата готовили 2 серийных среза толщиной 5 мкм. Один из них окрашивали гематоксилином и эозином и использовали в дальнейшем для микроскопического распознавания участков дисплазий, РПЖ и нормального эпителия. Соответствующие обозначения наносили непосредственно на покровные стекла этих препаратов. Второй препарат не окрашивали, его использовали для проведения микродиссекции, которую выполняли под лупой, каждый раз меняя скальпель во избежание контаминации. В подавляющем большинстве случаев провели микродиссекцию 1 участка с препарата, исключение составил больной № 1, для которого представилось возможным выделить ДНК из 2 областей, соответствующих слабой и тяжелой простатической интраэпителиальной неоплазии (ПИН) – ПИН I и ПИН III соответственно. Собранные клетки инкубировали в буферном растворе (0,01 М трис-НСl pH 8,0; 0,001 М этилендиаминтетраацетат; 0,5 % Tween 20), содержащем 500 мкг/мл протеиназы К, при  $55^{\circ}\text{C}$  в течение ночи, после чего фермент инактивировали, нагревая смесь 10 мин при  $95^{\circ}\text{C}$ .

Успешность выделения ДНК контролировали в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами к гену «домашнего хозяйства» *GAPDH*. Использовали следующие праймеры: прямой (5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3') и обратный (5'-TCCACCACCTGTTGCTGTA-3'). Длина ПЦР-продукта составляла 450 пар оснований (п. о.). Режим реакции был следующим:  $94^{\circ}\text{C}$  – 5 мин,  $94^{\circ}\text{C}$  – 30 с (28 циклов),  $58^{\circ}\text{C}$  – 30 с,  $72^{\circ}\text{C}$  – 60 с, заключительная элонгация при  $72^{\circ}\text{C}$  – 2 мин. Детекцию ВПЧ16 проводили в ПЦР с типоспецифическими праймерами к онкогену *E7* вируса: прямым (5'-CGGACAGAGCCCATTTACAAT-3') и обратным (5'-GAACAGATGGGGGCACACAAT-3'). Длина ПЦР-продукта составляла 144 п. о. Режим реакции был следующим:  $94^{\circ}\text{C}$  – 4 мин,  $94^{\circ}\text{C}$  – 30 с (35 циклов),  $58^{\circ}\text{C}$  – 30 с,  $72^{\circ}\text{C}$  – 90 с, заключительная элонгация при  $72^{\circ}\text{C}$  – 6 мин.

При постановке ПЦР положительным контролем служил вариант, содержащий ДНК, выделенную из клинического образца ВПЧ16-положительного РШМ; отрицательным контролем служила реакционная смесь для ПЦР, не содержащая ДНК. Результаты учитывали только в случае получения адекватных данных в положительном и отрицательном контролях.

Разделение ДНК проводили в горизонтальном агарозном геле в трис-ацетатном буфере в присутствии бромистого этидия. Продукты амплификации *GAPDH*

Данные о больных РПЖ и результаты детекции онкогена E7 ВПЧ16 в тканях удаленных у них предстательных желез

№	Возраст, лет	Стадия TNM	Уровень простат-специфического антигена в сыворотке крови	Индекс Глисона в материале предоперационной биопсии	Гистологическое заключение об операционном материале	Гистологическое заключение о криостатном препарате, с которого выделяли ДНК	Результат детекции онкогена E7 ВПЧ16
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	+

разделяли в 1,5 % агарозном геле, продукты амплификации E7 ВПЧ16 в 2 % агарозном геле. Бромистый этидий вносили в раствор агарозы при 50 °С до конечной концентрации 0,5 мкг/мл. Для определения размеров продуктов использовали ДНК-маркер с шагом 100 п. о.

При проведении микродиссекций использовали протеиназу К «Хеликон» (Россия). Праймеры были синтезированы в компании «Литех» (Россия). При постановке ПЦР использовали смесь нуклеотидов и DreamTaq™ буфер Fermentas (Латвия), а также Taq ДНК-полимеразу и готовую смесь для ПЦР Screen-Mix (оба реагента производства «Евроген», Россия). Для выявления продуктов амплификации в электрофореze использовали агарозу, трис-ацетатный буфер и бромид этидия «ПанЭко» (Россия), а также маркер длин фрагментов ДНК (100+ bp DNA Ladder) «Евроген» (Россия). ПЦР проводили на приборе «Терцик» («ДНК-технологии», Россия), результаты электро-

фореze ПЦР-продуктов анализировали и фотографировали на аппарате Image Quant Las 4000 (GE Healthcare, США).

### Результаты и обсуждение

При гистологическом исследовании операционного материала наличие раковой опухоли в предстательной железе было подтверждено для 16 из 17 больных (см. таблицу). Во всех этих случаях, кроме одного, был выявлен мелкоацинарный рак, а у 1 пациента (№ 2) — умеренно-дифференцированная аденокарцинома. В ткани предстательной железы больного № 14 элементов опухоли обнаружено не было; здесь имелись обширные поля фиброза, скудные лимфоидные инфильтраты, единичные атрофичные протоки, — картина соответствовала полному лечебному патоморфозу рака.

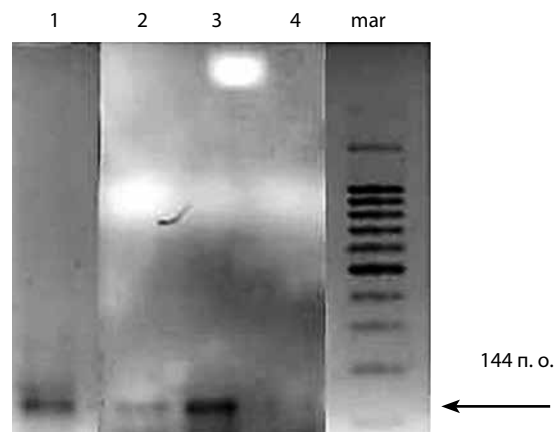
Результаты гистологического анализа препаратов, служивших ориентиром для последующих

микродиссекций, представлены в таблице. Гомогенные участки раковой ткани присутствовали на криостатных срезах в 5 случаях (пациенты №№ 6, 8, 10, 11 и 17). На 7 препаратах (от больных №№ 1–5, 7 и 9) была отмечена ПИН, причем в материале от больного № 1 присутствовали и слабая (ПИН I), и тяжелая (ПИН III) неоплазии. В остальных случаях микродиссекции провели на участках нормальной ткани (больные №№ 12 и 14), доброкачественной гиперплазии (больные №№ 15 и 16) и аденоза (больной № 13).

Тестирование в ПЦР позволило обнаружить присутствие ДНК *E7 ВПЧ16* в лизатах, полученных с препаратов от 7 из 17 обследованных больных (см. таблицу). Положительным оказался результат при тестировании всех 5 случаев рака, а также обеих ПИН, присутствовавших на препарате от больного № 1 (см. рисунок).

В связи с результатами, полученными в настоящей работе, уместно упомянуть данные V. Smelov и соавт.: при скрининге выборки здоровых российских мужчин в ПЦР на присутствие в их мочеполовой системе ВПЧ эти авторы обнаружили, что 42 % из обследованных были позитивными по ВПЧ типов высокого онкогенного риска [5].

Длительное время предметом исследований и дискуссий остаются вопросы о возможной роли онкогенных ВПЧ при таких распространенных формах рака, как рак легкого [6] и рак молочной железы [7]. Впервые на группе российских больных РПЖ нами получены результаты, которые свидетельствуют о возможном вовлечении ВПЧ16 в генез и этой очень распространенной формы злокачественных новообразований. В работе впервые использованы криоконсервированные, не подвергавшиеся обработке формалином и парафином образцы опухолей, что способствовало лучшей сохранности ДНК. Для выяснения возможной ассоциации РПЖ с ВПЧ нами впервые был применен метод микродиссекций,



Анализ продуктов амплификации с использованием *E7 ВПЧ16*-специфичных праймеров: электрофореграмма после окрашивания бромидом этидия. Цифры над электрофореграммой соответствуют номерам образцов: 1 – ВПЧ16-положительный РШМ (положительный контроль); 2 – ПИН I больного № 1; 3 – ПИН III больного № 1; 4 – отрицательный контроль

что позволило выделить ДНК из однородных клеточных популяций. Представленные данные важны для выяснения этиологии и разработки мер профилактики РПЖ.

### Заключение

Онкоген *E7 ВПЧ16* обнаружен в тканях удаленных у больных РПЖ предстательных желез в 7 случаях из 17, в том числе во всех 5 случаях, когда ДНК-матрицу для ПЦР выделили из однородных областей, представленных раковыми клетками. Полученные результаты позволяют предполагать, что ВПЧ16, основной тип вируса, ответственный за развитие РШМ, нередко присутствует в предстательных железах российских больных РПЖ. Возможное участие онкогенных ВПЧ в генезе РПЖ заслуживает внимания и дальнейшего изучения.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. 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.
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. Papillomaviruses – to vaccination and beyond. *Biochemistry (Mosc)* 2008;73(5):498–503. PMID: 18605974.
4. Guo Z., Wu F., Asplund A. et al. Analysis of intratumoral heterogeneity of chromosome 3p deletions and genetic evidence of polyclonal origin of cervical squamous carcinoma. *Mod Pathol* 2001;14(2):54–61. DOI: 10.1038/modpathol.3880256. PMID: 11235906.
5. Smelov V., Eklund C., Bzhalava D. et al. Expressed prostate secretions in the study of human papillomavirus epidemiology in the male. *PLOS One* 2013;8(6):e66630. DOI: 10.1371/journal.pone.0066630. PMID: 23799125.
6. Ragin C., Obikoya-Malomo M., Kim S. et al. HPV-associated lung cancers: an international pooled analysis. *Carcinogenesis* 2014;35(6):1267–75. DOI: 10.1093/carcin/bgu038. PMID: 24523449.
7. de Villiers E.M., Sandstrom R.E., zur Hausen H., Buck C.E. Presence of papillomavirus sequences in condylomatous lesions of the mamillae and in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res* 2005;7(1):R1–11. DOI: 10.1186/bcr940. PMID: 15642157.