

## Роль вирусной инфекции в этиопатогенезе рака молочной железы

Л.А. Ашрафян, В.К. Боженко, А.В. Слонов, О.А. Овчинникова, Л.З. Хунова

Отделение гинекологии ФГУ РНЦРР Минздрава России, Москва

Контакты: Лилия Заудиновна Хунова khunova@mail.ru

Вирусная природа многих онкологических заболеваний женской половой сферы в настоящее время не вызывает сомнения, однако роль вирусной инфекции в патогенезе рака молочной железы (РМЖ) остается недостаточно изученной. В статье рассматриваются аспекты значимости ряда вирусов в этиопатогенезе онкогинекологических заболеваний. Представлены результаты обследования 60 пациенток с РМЖ I–IV стадий и 30 больных с фиброзно-кистозной мастопатией, у которых сопоставляли наличие геномов ДНК-содержащих вирусов в опухолевой ткани и данные исследования мазков из генитального тракта, полученные методом полимеразной цепной реакции. Показано, что вирусы папилломы человека и цитомегаловирусы не играют существенной роли в развитии РМЖ, также не получено достоверных данных в отношении вируса Эпштейна–Барр.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, вирус папилломы человека, вирус Эпштейна–Барр, вирус Mouse Mammary Tumor

### Role of viral infection in the etiopathogenesis of breast cancer

L.A. Ashrafyan, V.K. Bozhenko, A.V. Slonov, O.A. Ovchinnikova, L.Z. Khunova

Department of Gynecology, Russian X-Ray Radiology Research Center, Ministry of Health and Social Development, Moscow

The viral nature of many female genital cancers is now beyond question; however, the role of viral infection in the pathogenesis of breast cancer (BC) has not been adequately investigated. The paper defines the importance of a number of viruses in the etiopathogenesis of oncogynecological diseases. It presents the results of examining 60 patients with Stages I–IV BC and 30 patients with fibrocystic mastopathy, in whom the presence of DNA-containing virus genomes in tumor tissue was compared, and the data of polymerase chain reaction study of genital tract smears. It is shown that human papillomaviruses and cytomegaloviruses do not play a fundamental role in the development of BC; there is no valid evidence for Epstein–Barr virus.

**Key words:** breast cancer, human papillomavirus, Epstein–Barr virus, mouse mammary tumor virus

#### Введение

Рак молочной железы (РМЖ) – наиболее распространенный вид опухолей, встречающихся среди женского населения Европы, Америки и некоторых стран Азии [1–4]. В течение последних 20 лет в мире, а также в России наметилась устойчивая тенденция к росту заболеваемости этим видом рака, особенно в городах и мегаполисах [1, 2, 4, 5]. Начиная с 1985 г. РМЖ занимает 1-е место среди онкологических заболеваний у женщин (частота встречаемости – 31,2%) [1, 3, 6].

Известно, что развитие опухоли связано с нарушением роста и дифференцировки клеток и злокачественным их перерождением. Во многих случаях такие нарушения обусловлены мутациями или резким повышением активности клеточных онкогенов – нормальных генов, которые участвуют в регуляции клеточного цикла, передаче сигналов и других процессах жизнедеятельности клеток. В 10% случаев заболевание передается из поколения в поколение и обусловлено наличием врожденных мутаций в ге-

нах предрасположенности *BRCA1* или *BRCA2* (Breast Cancer) [1, 4, 7–9].

Возникновение рака может быть связано не только с нарушением работы онкогенов и других генов, но и с развитием вирусных инфекций.

За последние 10 лет появились веские доказательства того, что в организме человека циркулируют ретровирусы, родственные вирусу опухолей молочных желез мышей, или ММТВ (Mouse Mammary Tumor Virus). Их активация представляет сложную цепочку биохимических процессов, похожую на активацию некоторых ретровирусов, вызывающих лейкозы у человека и животных [10].

ММТВ-родственный провирус человека, или hMTV (human Mammary Tumor Virus), был обнаружен в геноме лимфоцитов и опухолевых клеток (в нормальных тканях человека не выявлен). Циркуляция ММТВ в организме мышей и человека осуществляется при участии лимфоцитов периферической крови. На этом этапе число копий провируса в геноме достаточно ограничено. Во время ак-

тивного деления эпителиальных клеток молочной железы, растущей под действием гормонов, встроенный в клеточный геном провирус получает возможность быстрого умножения копий в тысячи раз. По-видимому, провирус может встраиваться в клетки молочной железы, обладающие свойствами стволовых клеток, которые впоследствии дают начало множественным очагам опухолевого роста. Имеются данные о возможном прямом или опосредованном участии hMTV в развитии РМЖ.

В настоящее время в мире отмечается тенденция к росту числа сексуально-трансмиссивных заболеваний (не только в странах с высоким уровнем экономического развития, но и в развивающихся), что связано в основном с изменением образа жизни людей и, вследствие этого, с изменением особенностей сексуального поведения, ранним началом половой жизни, частой сменой половых партнеров, курением.

Эпидемиологическая ситуация с инфекциями, передаваемыми половым путем, сегодня принимает в Российской Федерации угрожающий характер. Заболеваемость населения инфекциями, передаваемыми половым путем, составляет около 0,8%. За последние годы зарегистрировано около 2 млн пациентов, из них женщин в 2 раза больше, чем мужчин. В последнее десятилетие наблюдается увеличение числа заболеваний, передаваемых половым путем, вирусной этиологии. Наряду с вирусом простого герпеса (ВПГ), цитомегаловирусом (ЦМВ), вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ), особое место занимает папилломавирусная инфекция (ПВИ).

В многочисленных эпидемиологических исследованиях установлено наличие причинной связи между ПВИ и раком шейки матки, а также цервикальными интраэпителиальными неоплазиями. Этиологическая роль вируса папилломы человека (ВПЧ) предполагает, что ПВИ является необходимой составляющей для развития опухолевого процесса.

Доля инфицированных лиц в популяциях достаточно высока и составляет в среднем 20–60%; в большинстве случаев возбудитель передается через микротравмы кожи, контактно, при половых сношениях и перинатально.

Папилломавирусы – единственная группа вирусов, в отношении которых доказанным является тот факт, что они индуцируют образование доброкачественных и злокачественных опухолей у человека в естественных условиях, а также играют роль в развитии рака гениталий. Инфицирование приводит к возникновению кожных и подошвенных бородавок, болезни Боуэна, веррукозного рака и кондилом (плоских и остроконечных), а также гигантских кондилом Бушке–Левенштейна. Каждый тип вируса ассоциирован с определенной патологией человека.

Таким образом, в настоящее время исследователи располагают достаточно убедительными данными о роли вируса ВПЧ в индукции предопухолевых и опухолевых процессов вульвы, шейки, а по некоторым сообщениям – и тела матки [11, 12]. Считается, что в 4–10% случаев ПВИ шейки матки приводят к развитию рака.

На сегодняшний день в инфекционной патологии все большее значение приобретают герпесвирусы (от греч. herpes – ползучий). Внимание, которое в течение последних 25 лет вирусологи и клиницисты проявляют к герпесвирусным заболеваниям человека, связано с их значительной эпидемиологической ролью и социальной значимостью в современном мире. Неуклонный рост числа герпетических заболеваний у взрослых и детей обуславливает необходимость всестороннего изучения герпетической инфекции и разработки эффективных методов профилактики и лечения разнообразных ее форм. Среди вирусных инфекций герпес занимает одно из ведущих мест в силу повсеместного распространения вирусов, многообразия клинических проявлений, как правило, хронического течения, а также различных путей передачи вирусов.

В настоящее время результаты немногочисленных эпидемиологических и экспериментальных научных работ свидетельствуют о том, что вирусы герпеса могут обладать определенным онкогенным потенциалом. Герпесвирусы ассоциированы с малигнизацией и способны (по крайней мере ВЭБ, ВПГ и ЦМВ) трансформировать клетки *in vitro*. Все герпесвирусы сходны по морфологическим признакам, размерам, типу нуклеиновой кислоты (2-цепочечная ДНК), икосаэдрическому капсиду, сборка которого происходит в ядре инфицированной клетки, оболочке, типу репродукции, способности вызывать хроническую и латентную инфекцию у человека [11, 13].

Результаты исследований последних лет подтверждают участие некоторых герпесвирусов в развитии таких злокачественных новообразований, как карциномы цервикального канала шейки матки, саркомы Капоши, нейробластомы и др. [11, 14].

В то же время роль вирусной инфекции в патогенезе РМЖ остается недостаточно изученной.

Нами проведена работа по обнаружению геномов ДНК-содержащих вирусов в ткани молочной железы у больных РМЖ и пациенток контрольной группы. В связи с тем, что в опухолевой ткани уровень противовирусной защиты значительно снижен, было решено сравнить наши данные с результатами, полученными при осуществлении ПЦР-диагностики (ПЦР – полимеразная цепная реакция) мазков, взятых из генитального тракта этих же пациенток.

### Материалы и методы

В основу работы легли результаты наблюдений за 60 больными РМЖ I–IV стадий и 30 пациентками с фиброзно-кистозной мастопатией, находящимися на лечении в ФГУ РНЦРР в период с 2006 по 2009 г.

Средний возраст больных РМЖ составил  $56 \pm 0,5$  года, в контрольной группе этот показатель был равен  $42,8 \pm 0,7$  года.

Распределение по стадиям пациенток со злокачественными новообразованиями молочной железы было следующим: I стадия РМЖ диагностирована у 15 (25%), II – у 34 (56,7%), III – у 2 (3,3%), IV – у 9 (15%) больных.

В план лечения входили различные варианты хирургических вмешательств: секторальная резекция молочной железы; радикальная резекция молочной железы с регионарной лимфаденэктомией (ЛАЭ); радикальная резекция молочной железы с регионарной ЛАЭ и одномоментной пластикой торакодорзальным лоскутом и фрагментом большой грудной мышцы; мастэктомия по Маддену; подкожная мастэктомия (одно- или двусторонняя) с одномоментным аломаммопротезированием.

Гистологическое и иммуногистохимическое исследования биопсийного и операционного материалов проводили в отделении патоморфологии ФГУ РНЦРР. Молекулярно-генетическое исследование осуществляли с использованием метода ПЦР. Материалом для исследования являлась ткань опухоли молочной железы.

Основные этапы исследования включали подготовку материала и выделение из него ДНК, амплификацию и детекцию продуктов ПЦР.

Подготовка материала заключалась в следующем:

- 1) перед получением срезов поверхность микронома обрабатывали ксилолом, а затем этанолом, что позволило избежать контаминации анализируемых образцов ткани;
- 2) готовили срезы толщиной 10–20 мм, которые с соблюдением стерильности переносили в пробирку типа Эппендорф на 1,5 мл;
- 3) экстрагировали парафин из среза посредством добавления в пробирку 1 мл ксилола и перемешивания его на встряхивателе при комнатной температуре;
- 4) через 2 мин осаждали ткань центрифугированием при скорости 12 тыс. об/мин в течение 5 мин;
- 5) осторожно (не касаясь ткани) удаляли супернатант;
- 6) добавляли в пробирку 1 мл 100% этанола и встряхивали (ткань при этом приобретала беловатый цвет);
- 7) пробирку центрифугировали при скорости 12 тыс. об/мин в течение 5 мин и сливали супернатант;
- 8) этапы 6 и 7 повторяли еще раз;

9) ткань высушивали в открытых пробирках в термостате при температуре  $55^\circ\text{C}$ ;

10) высушенную ткань хранили при комнатной температуре в закрытых пробирках типа Эппендорф.

Следует отметить, что возможность осуществления успешной амплификации зависит от типа использованного фиксатора, продолжительности фиксации и сроков хранения образцов. Оптимальное время фиксации перед дальнейшей обработкой тканей составляет 1–24 ч. Под действием формальдегида в ДНК могут образовываться шиффовы основания, препятствующие проведению эффективной амплификации. При увеличении времени фиксации могут происходить также и другие необратимые процессы.

При заливке тканей в парафин наблюдается стабилизация ДНК, однако постепенно происходит медленная деградация молекул ДНК. В старых (использующихся на протяжении  $> 10$  лет) парафиновых блоках эффективность осуществления амплификации значительно снижается.

Для выделения ДНК из биопроб с помощью ускоренной пробоподготовки пробирку со стерильным физиологическим раствором (0,5–1 мл), содержащим клинический материал, центрифугировали на аппарате Eppendorf 5415D (Германия) в течение 2 мин при скорости 10 000 об/мин, супернатант удаляли. К осадку добавляли от 50 до 200 мкл рабочего раствора ЭкстраГена (суспензия смеси ионообменников с протеолитическими ферментами), в зависимости от размера полученного осадка, и суспендировали осадок на вортексе Heidolph (Германия). Пробирку инкубировали при температуре  $56^\circ\text{C}$  в течение 30 мин, а затем на протяжении 10 мин при температуре  $0^\circ\text{C}$  в микротермостате Термо 24-15 (Россия), после чего центрифугировали в течение 10–15 с при скорости 10 000 об/мин для сбора конденсата. Для постановки реакции амплификации брали 10 мкл прозрачного супернатанта, содержащего исследуемый образец ДНК.

Для выделения ДНК с помощью универсальной пробоподготовки к 100 мкл анализируемой пробы, содержащей клинический материал в пробирке объемом 1,5 мл (типа Эппендорф), добавляли 400 мкл лизирующего реагента (раствор гуанидинтиоционата, предназначенный для лизиса клеток, солиubilизации клеточного дебриса и денатурации клеточных нуклеаз).

Пробирку с пробой встряхивали и инкубировали в течение 5 мин при температуре  $65^\circ\text{C}$ . Затем в пробирку добавляли 20 мкл суспензии сорбента Nucleos и перемешивали ее содержимое в течение 5 мин на ротаторе (или вручную). После центрифугирования пробы (в течение 10 с со скоростью 5000 об/мин) супернатант отбрасывали, а осадок сорбента трижды промывали солевым буфером, содержащим 70% эта-

нол. Пробирку помещали в микротермостат и подсушивали пробы на протяжении 5 мин при температуре 65 °С, оставляя пробирку открытой. В пробирку с осадком добавляли 100 мкл ЭкстраГена, суспендировали содержимое на вортексе до получения гомогенного состояния, после чего инкубировали в течение 5 мин при температуре 65 °С. После этого еще раз суспендировали содержимое пробирки на вортексе и затем центрифугировали в течение 1 мин при скорости 10 000 об/мин. Супернатант использовали для установления реакции амплификации.

**Амплификация.** В пробирку типа Эппендорф объемом 0,5 мл, содержащую лиофилизованную сухую реакционную смесь, готовую для осуществления амплификации выделенной ДНК (МастерМикс), добавляли 10 мкл ПЦР-растворителя, 10 мкл анализируемого образца и 20 мкл минерального масла. Амплификацию проводили в программируемом термостате Ampla-4 (Россия) в соответствии со следующим температурным режимом:

- 95 °С – денатурация;
- 60 °С – отжиг праймеров;
- 74 °С – комплиментарное достраивание

цепи ДНК. Всего было проведено 43 цикла.

**Детекция результатов.** С помощью источника тока с фиксированным напряжением 130 В полученные продукты амплификации разгоняли с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле, содержащем бромистый этидий, в течение 20 мин при напряжении ≤15 В/см. Анализ результатов проводили с использованием трансиллюминатора ТСР-20-М (Франция) с длиной волны 312 нм. При появлении светящейся полосы желтого цвета строго на уровне положительного контроля отмечали положительную реакцию исследуемого образца на наличие вирусов.

### Результаты и обсуждение

Основные критерии оценки были сформированы по результатам молекулярно-генетического исследования ткани опухоли молочной железы (табл. 1) и мазков из генитального тракта (табл. 2).

В нашем исследовании ВПЧ не выявлен ни в одном из образцов ДНК опухоли молочной железы основной и контрольной групп исследуемых пациенток. Однако при изучении мазков, взятых из генитального тракта, ВПЧ был обнаружен у 27 (45%) больных РМЖ и 17 (56,7%) пациенток контрольной группы. Таким образом, можно предположить, что данная инфекция не играет существенной роли в этиопатогенезе РМЖ.

**Таблица 1.** Результаты молекулярно-генетического исследования ткани опухоли молочной железы

Вирус	Число больных	
	Основная группа (n = 60)	Группа контроля (n = 30)
ВПЧ	0	0
ВЭБ	15	0
ЦМВ	0	0
Всего...	60	30

**Таблица 2.** Результаты молекулярно-генетического исследования мазков из генитального тракта

Вирус	Число больных	
	Основная группа (n = 60)	Группа контроля (n = 30)
ВПЧ	27	17
ВЭБ	19	5
ЦМВ	11	4

При изучении ДНК опухоли молочной железы ВЭБ диагностирован у 15 (25%) пациенток основной группы и у 2 (6,7%) – в группе контроля. В генитальном тракте наличие данного вируса установлено у 19 (31,7%) и 5 (16,7%) пациенток соответственно. Следовательно, наличие ВЭБ в тканях молочной железы при РМЖ (25% случаев) не может достоверно свидетельствовать о его существенной роли в этиопатогенезе РМЖ, так как данный вирус встречался и в группе больных с доброкачественными новообразованиями молочной железы (6,7% наблюдений).

ЦМВ в образцах ДНК опухоли молочной железы пациенток основной и контрольной групп обнаружен не был. В генитальном тракте вирус выявлен у 11 (18,3%) больных РМЖ и 4 (13,3%) пациенток с доброкачественными новообразованиями молочной железы.

### Выводы

Результаты проведенных нами исследований дают основание предположить, что ЦМВ не имеет этиопатогенетического значения в развитии РМЖ, поскольку не выявляется в тканях молочной железы пациенток основной и контрольной групп при наличии данной инфекции в генитальном тракте.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Рожкова Н.И. Современные системы и методы обследования молочной железы. *Клин маммол* 2005;(1):66–97.
2. Трапезников Н.Н., Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ. М.: РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 2001.
3. Klijn J.G.M. et al. *Breast Cancer Res Treat* 1998;50(3). Special issue p. 227 (abstr 4). 21st Annual San Antonio Breast Cancer Symposium, 12–15 Dec. 1998.
4. Nevanlinna H. CHEK2 gene. *BCLC Familial Cancer* 2003;2:186.
5. Моисеенко В.М. “Естественная история” роста рака молочной железы. *Практ онкол* 2002;3(1):6–14.
6. Любченко Л.Н. Генодиагностика наследственной предрасположенности к раку молочной железы и разработка системы индивидуального прогнозирования развития, течения и профилактики заболевания. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2002.
7. Карпухин А.В., Поспехова Н.И., Любченко Л.Н. и др. Частоты олигонуклеотидных полиморфизмов и мутаций в гене BRCA1 при наследственно обусловленном раке молочной железы и/или яичников. *ДАН* 2002;383(5).
8. Seal S., Barfoot R., Jayatilake H. et al. Evaluation of Fanconi Anemia in familial breast cancer. *BCLC Familial cancer* 2003;2:212–3.
9. Szabo C., Neuhausen S., Devilee P. et al. BRCA1 founder mutations: population genetics and genome evolution. *BCLC Familial Cancer* 2003;2:177–8.
10. Bar-Sinai A., Bassa N., Fiscette M. et al. Mouse mammary tumor virus env-derived peptide associates with nucleolar targets in lymphoma, mammary carcinoma, and human breast cancer. *Cancer Res* 2005;65(16):7223–30.
11. Ашрафян Л.А., Киселев В.И. Опухоли репродуктивных органов (этиология и патогенез). М., 2007; с. 103–27.
12. Ашрафян Л.А., Киселев В.И., Муйжнек Е.Л. Патогенетическая профилактика рака репродуктивных органов. М., 2009; с. 123–30.
13. Боженко В.К. Молекулярные маркеры рака молочной железы. *Клин маммол* 2005;1:51–7.
14. Van Muylen R.S.P.A., ter Hamsel Bram W.A., Smedts F.M.M. Detection and typing of human papillomavirus in cervical carcinomas in Russian Women. *Cancer* 1999;85(9):2011–6.