

Выявление ДНК вируса папилломы человека в поверхностной уротелиальной карциноме мочевого пузыря

Ю.Ю. Андреева, Л.Э. Завалишина, А.А. Морозов, И.Г. Русаков, Г.А. Франк

МНИОИ им. П.А. Герцена Росздрава

HUMAN PAPILLOMA VIRUS DNA REVELATION IN THE SUPERFICIAL UROTHELIAL BLADDER CARCINOMA

U. U. Andreeva, L. E. Zavalishina, A. A. Morozov, I. G. Rusakov, G. A. Frank
Moscow oncology research institute named after P. A. Gercen, 125284, Moscow

An immunohistochemical research with antibodies to the mutant p53 protein and a revelation of the human papilloma virus DNA 16 and 18 types via in situ hybridization at the histological sections of the urothelial carcinoma are realized. The material of 44 patients with the superficial bladder cancer (Ta and T1 stages) and with a presence of the indirect signs of the viral infection was studied. 16 patients were included in the group of high risk recurrence, 13 patients were included in the group of the mean risk, 15 patients were included in the group of the low risk. HPV DNA was revealed in 12 of 44 cases only in patients of the mean and high risk groups (5 and 7 cases, respectively); all the positive results in the high risk group were with the HPV 16 type probe. Evaluation of the p53 protein showed a significant increase of its expression in the mean and high risk groups. p53 protein expression mean value was 23,67% in the low risk group, 36,53% in the mean risk group, 53,43% in the high risk group. Presence of HPV DNA was associated with the high p53 expression in the vast majority of cases.

В настоящее время этиологическая роль высокоонкогенных типов вируса папилломы человека (ВПЧ) при плоскоклеточном раке шейки матки и верхних дыхательных путей считается доказанной. Вместе с тем сейчас появились публикации, обсуждающие роль ВПЧ в возникновении и рака мочевого пузыря (РМП). ВПЧ является онкогенным ДНК-содержащим вирусом. В большинстве случаев в инфицированных клетках выявляется вирусная ДНК, продукция вирусных частиц отсутствует. Функциональный вирусный геном стимулирует пролиферацию эпителиальных клеток организма-хозяина, что может приводить к появлению папиллом.

ВПЧ представляет собой одну из наиболее гетерогенных групп вирусов. В настоящее время идентифицировано более 90 типов этого вируса, причем не менее 35 из них демонстрируют выраженный тропизм к клеткам слизистой оболочки урогенитальной области как мужчин, так и женщин. Известно, что до 30% здоровых мужчин имеют в клетках половых органов последовательности ВПЧ, являясь, таким образом, естественным резервуаром этого вируса [1, 2].

В зараженных клетках вирусный геном может существовать в двух формах — эписомальной (внехромосомной) и интегрированной. Эписомальная форма характерна для собственно инфицированных клеток

и доброкачественных опухолей. Переход от предраковых состояний к раку сопровождается интеграцией вирусной ДНК в клеточный геном, а та, в свою очередь, делецией фрагмента вирусного генома и структурными перестройками, приводящими к изменению генетической программы вирусной и клеточной ДНК.

Вообще геном вирусов группы ВПЧ представлен кольцевой ДНК и функционально разделен на два участка: ранний (Е) и поздний (L). В раннем участке, составляющем 60% вирусного генома, имеется 7 генов (E1—E7), контролирующих репликацию вирусной ДНК и трансформацию клеток. Интеграция вирусного генома сопровождается потерей L-участка и части E-участка, но при этом всегда сохраняются гены E6 и E7. Основным онкогеном является ген E6, его продукт инактивирует противоопухолевый ген Trp53. [3, 4]. Характерной особенностью гена E7 является его способность как к пролиферации клеток, так и к апоптозу. При этом апоптоз под действием E7 может проявляться по p53-зависимому и p53-независимому путям. Несмотря на то что продукты генов E6 и E7 по отдельности обладают определенным онкогенным потенциалом, совместная работа этих продуктов значительно усиливает онкогенное действие [5]. Функции E6 и E7 также тесно связаны и на уровне нарушения регуляции клеточного цикла и размножения клеток.

В ряде исследований показана инфицированность ВПЧ больных уротелиальным РМП [6, 7], однако изучение возможной роли папилломавирусной инфекции при РМП дает противоречивые результаты. Исследования, проводимые при плоскоклеточном раке и кондиломе мочевого пузыря, выявляют лишь единичные ВПЧ-позитивные случаи, и авторы говорят об ограниченной роли вирусной инфекции в развитии РМП [8].

Таблица 1. Выявление ДНК ВПЧ типов 16 и 18 у больных поверхностным РМП

Риск	ВПЧ 16	ВПЧ 18
Низкий (n=15)	—	—
Средний (n=13)	1	4
Высокий (n=16)	7	—

Согласно данным Европейской ассоциации урологов, прогноз поверхностного РМП зависит от ряда факторов: размеров опухоли, степени дифференцировки, множественности очагов поражения, формы роста (папиллярная или погружная), наличия фоновых изменений в виде карциномы *in situ* и др. [9]. Особый интерес представляет роль вирусной инфекции в развитии рецидива РМП. Нередко при гистологическом исследовании биопсийного и операционного материала выявляются косвенные признаки вирусной инфекции как в опухоли, так и в окружающем нормальном уротелии. Для выявления ВПЧ мы использовали метод гибридизации *in situ* на гистологических срезах, позволяющий установить не только наличие вирусной ДНК, но и ее локализацию [10]. В данной работе изучались уротелиальные карциномы стадии Та и Т1. Был исследован материал 44 пациентов, отобранных из общей группы больных с поверхностным уротелиальным раком в связи с наличием койлоцитоза как косвенного признака вирусной инфекции. В группу высокого риска рецидивирования включены 16 больных, в группу среднего риска — 13, низкого риска — 15. Во всех случаях проводилось также иммуногистохимическое исследование с антителами к мутантному гену *Trp53*. Положительную реакцию оценивали полуколичественным методом и выражали в процентах.

ДНК ВПЧ типов 16 и 18 выявлена у 12 из 44 больных (табл. 1).

Как видно из табл. 1, ни в одном наблюдении в группе низкого риска не выявлена вирусная ДНК. Обращает на себя внимание, что из пяти случаев выявления ВПЧ в группе среднего риска в четырех наблюдениях отмечена положительная реакция с зондом типа 18 вируса. Все 7 позитивных результатов в группе высокого риска были с зондом типа 16.

При исследовании белка p53 было отмечено достоверное повышение его экспрессии в группах среднего и высокого риска (табл. 2).

Среднее значение экспрессии p53 в группе низкого риска составило 23,67%, среднего — 36,53%,

Таблица 2. Уровень экспрессии белка p53 (%)

Низкий риск (n=15)	Средний риск (n=13)	Высокий риск (n=16)
25	20	60*
15	15	70*
10	10	95*
5	50*	20
25	25	55
80	60*	40
15	70	75*
10	10	50
30	55*	10
35	5	85*
5	45	30
10	60	65*
5	50*	60
70		25*
15		50
		65

* Наблюдения, в которых выявлена ДНК ВПЧ типов 16/18.

высокого — 53,43%. Следует отметить, что обнаружение ДНК ВПЧ в подавляющем большинстве случаев сочеталось с высокой экспрессией белка p53, причем сигнал зондов ВПЧ обнаруживался как в клетках опухоли, так и в окружающем уротелии.

Таким образом, имеется большая вероятность повышения риска рецидива поверхностного уротелиального рака при наличии вирусной ДНК, особенно в случаях с коэкспрессией p53.

Авторы благодарят фирму «Хоффманн-Ля Рош Лтд.» за помощь в выполнении данного исследования.

Литература

1. Cecchini S., Cipparone I., Confortini M. Urethral cytology of cytobrush specimens. *Acta Cytol* 1998;32:314—7.
2. Lopez-Beltran A., Escudero A.L. Human papillomavirus and bladder cancer. *Biomed Pharmacother* 1997;57:252—7.
3. Park T.W., Fujiwara H., Wright T.C. Molecular biology of cervical cancer and its precursors. *Cancer* 1995;76:1902—13.
4. Saveliya E., Belair CD., Newton M.A. et al. 20q gain associates with immortalization: 20q13.2 amplification correlates with genome instability in human uroepithelial cells. *Oncogene* 1997;14:551—60.
5. Киселев Ф.Л. Вирус-ассоциированные опухоли человека: рак шейки матки и вирусы папиллом. *Биохимия* 2000;65(1):79—91.
6. Мяндина Г.И., Пягай П.Э., Иткес А.В. и др. Детекция генома вируса папилломы человека типа 16 в клетках опухолей периферической крови пациентов, страдающих раком мочевого пузыря. *Вестн РУДН. Серия Медицина*; 2003;5(24):29—32.
7. Frank G., Zavalishina L., Andreeva Yu. Immunohistochemical study of urothelial carcinoma in patients with different tumor progression risk. *Mod Pathol* 2006;19(Suppl 3):115.
8. Guo C.C., Fine S.W., Epstein J.I. Noninvasive squamous lesions in the urinary bladder: a clinicopathologic analysis of 29 cases. *Am J Surg Pathol* 2006;30(7):883—91.
9. European Association of Urology. Pocket guidelines. 2006 ed. p. 5—20.
10. Завалишина Л.Э., Андреева Ю.Ю., Маныкин А.А., Франк Г.А. Выявление вируса папилломы человека при опухолях эпителиальной природы. Пособие для врачей. М., МНИОИ им. П.А. Герцена; 2004.