

# Детекция с помощью полимеразной цепной реакции генетического материала вируса папилломы человека 16-го типа в операционном материале от больных раком предстательной железы

Г.М. Волгарева\*, В.Д. Ермилова\*, А.В. Хачатурян, В.В. Татарский, В.Б. Матвеев, Л.С. Павлова  
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр 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 этой патологии, а также их высокие темпы роста свидетельствуют о важности изучения природы РПЖ. Вопрос о возможной ассоциации РПЖ с онкогенными вирусами папилломы человека (ВПЧ) остается открытым.

**Цель работы** – изучение хирургически удаленной ткани предстательной железы у больных РПЖ на предмет присутствия в ней онкогена E7 ВПЧ 16-го типа, основного типа ВПЧ, ответственного за возникновение рака шейки матки.

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

**Результаты.** ДНК онкогена E7 ВПЧ 16-го типа 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.** Полученный результат позволяет предполагать, что ВПЧ 16-го типа нередко присутствует в предстательной железе российских больных РПЖ.

**Ключевые слова:** предстательная железа, рак, профилактика, онкогенный вирус папилломы человека

DOI: 10.17650/1726-9776-2017-13-4-51-54

## Polymerase chain reaction assay for the detection of human papillomavirus type 16 genetic material in the intraoperative material from patients with prostate cancer

G.M. Volgareva\*, V.D. Ermilova\*, A.V. Khachatryan, V.V. Tatarskiy, V.B. Matveev, L.S. Pavlova

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

**Background.** The high rates of prostate cancer (PC) morbidity and mortality, as well as their high growth rates suggest that investigations of the nature of PC are of importance. The possible association of PC with high-risk human papillomaviruses (HPV) remains open.

**Objective:** to examine surgically removed prostate tissue from patients with PC for HPV 16 type E7 oncogene, the main type of HPV being responsible for cervical cancer.

**Materials and methods.** Polymerase chain reaction was used to test the prostate tissues removed from 17 patients with PC during radical prostatectomy. Cryopreserved (formalin- and paraffin- untreated) tumor samples were employed for better preservation of DNA. The multifocal growth pattern typical of PC was taken into account using microdissection to accumulate homogeneous prostate cancer, dysplastic, and intact epithelial cells.

**Results.** HPV 16 type E7 oncogene DNA was detected in the samples from 7 patients with PC out of the 17 examinees, including all 5 cases where DNA had been isolated from the homogeneous regions of PC.

**Conclusion.** The finding may suggest that HPV 16 is frequently present in the prostate glands of Russian patients with PC.

**Key words:** prostate, cancer, prevention, high-risk human papillomavirus

### Введение

Рак предстательной железы (РПЖ) занимает 2-е место в мире среди злокачественных опухолей

у мужчин [1]. Понимания причин возникновения РПЖ пока не существует. Высокие показатели заболеваемости и смертности, а также их высокие темпы

\*Эти авторы внесли равный вклад в выполнение работы.

роста свидетельствуют о важности изучения природы развития РПЖ и поиска способов его профилактики.

Одним из этиологических факторов возникновения 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 данного заболевания путем вакцинации мальчиков, созданной для профилактики рака шейки матки (РШМ).

Для РШМ показано, что злокачественное превращение эпителиальной клетки осуществляется под воздействием белковых продуктов 2 генов онкогенных ВПЧ: *E6* и *E7*. Основным среди онкогенных ВПЧ, или ВПЧ типов высокого онкогенного риска, ответственным за возникновение более чем 50 % случаев РШМ, является ВПЧ 16-го типа (ВПЧ-16) [2, 3].

**Цель работы** – изучение операционных материалов от пациентов с РПЖ на предмет присутствия онкогена *E7* ВПЧ-16 методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

#### Материалы и методы

В исследование вошли 17 пациентов с РПЖ. Все больные проходили лечение в урологическом отделении РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Для лучшей сохранности нуклеиновых кислот работу провели на криоконсервированных (не подвергавшихся обработке формалином и парафином) тканях предстательной железы (ПЖ), удаленной при радикальной простатэктомии. С учетом характерного для РПЖ мультицентрического роста опухоли патологически измененные области удаленной ПЖ морфолог (В.Д. Ерилова) на первом 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, значения уровня простатического специфического антигена в сыворотке крови, сумма баллов по шкале Глисона (по результатам предварительной биопсии опухоли), а также стадия опухоли по системе TNM представлены в таблице.

Вырезку патологически измененных участков ПЖ морфолог проводил не позднее 1–2 ч после операции, затем фрагмент ткани с макроскопически видимой патологией, предназначенный для детекции ВПЧ, помещали в морозильную камеру (при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ ). Микродиссекцию криостатных срезов и выделение ДНК выполняли с помощью протеиназы К в соответствии с процедурой, описанной G. Zhongmin и соавт. [4]. Из фрагмента ткани ПЖ, отобранного морфологом, с использованием криостата готовили 2 серийных среза толщиной 5 мкм. Один из них окрашивали гема-

токсином и эозином и применяли в дальнейшем для микроскопического распознавания участков дисплазий, РПЖ и нормального эпителия. Соответствующие обозначения наносили непосредственно на покровные стекла этих препаратов. Другой препарат не окрашивали, его использовали для проведения микродиссекции, которую выполняли под лупой, при этом каждый раз меняли скальпель во избежание контаминации. В подавляющем большинстве случаев провели микродиссекцию одного участка с препарата, исключение составил больной № 1, для которого представилось возможным выделить ДНК из 2 областей, соответствующих слабой и тяжелой простатическим интраэпителиальным неоплазиям, – Pin I и Pin III соответственно. Собранные клетки инкубировали в буферном растворе (0,01 М Трис-НСI; pH 8,0; 0,001 М EDTA; 0,5 % Tween 20), содержащем 500 мкг/мл протеиназы К, при температуре  $55^{\circ}\text{C}$  в течение ночи, после чего фермент инактивировали, нагревая смесь 10 мин при температуре  $95^{\circ}\text{C}$ .

Успешность выделения ДНК контролировали с помощью ПЦР с праймерами к гену домашнего хозяйства *GAPDH*. Использовали прямой (5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3') и обратный (5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3') праймеры. 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 ВПЧ-16 проводили с помощью ПЦР с типоспецифическими праймерами к онкогену *E7* вируса: прямым (5'-CGGACAGAGCCCATTACAAT-3') и обратным (5'-GAACAGATGGGGCACAACAAT-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 в качестве положительного контроля служил вариант, содержащий ДНК, выделенную из клинического образца ВПЧ-16-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 буфере ТАЕ в присутствии бромистого этидия. Продукты амплификации *GAPDH* разделяли в 1,5 % агарозном геле, продукты амплификации *E7* ВПЧ-16 – в 2,0 % агарозном геле. Бромистый этидий вносили в раствор агарозы при температуре  $50^{\circ}\text{C}$  до конечной концентрации 0,5 мкг/мл. Для определения размеров продуктов использовали ДНК-маркер с шагом 100 п.о.

При выполнении микродиссекций применяли протеиназу К «Хеликон» (Россия). Праймеры были

Характеристика больных раком предстательной железы; результаты детекции онкогена E7 вируса папилломы человека 16-го типа в тканях удаленных предстательных желез  
 Characteristics of patients with prostate cancer; results of detection of human papillomavirus type 16 E7 oncogene in removed prostate tissues

№ пациента Patients	Возраст, лет Age, years	Стадия по TNM TNM stage	Уровень простатического антигена в сыворотке крови, нг/мл Serum prostate-specific antigen level, ng/ml	Сумма баллов по шкале Глисона в предоперационном биоптате Total Gleason scores in preoperative material	Гистологическое заключение об операционном материале Histological evidence on intraoperative material	Гистологическое заключение о криостат- ном препарате, из которого выделили ДНК Histological evidence on the cryostat section taken for DNA isolation	Результат детекции онкогена E7 вируса папилломы человека 16-го типа Result of detection of human papillomavirus 16 type E7 oncogene
1	52	T2N0M0	5,9	7	Мелкоацинарный рак Small acinar carcinoma	Pin I Pin III	+
2	60	T2N0M0	8,1	7	Умеренно-дифференциро- ванная аденокарцинома Moderate-grade adenocarcinoma	Pin III	-
3	56	T2N0M0	9,3	6	Мелкоацинарный рак Small acinar carcinoma	Pin III	-
4	64	T2N0M0	5,2	7	Мелкоацинарный рак Small acinar carcinoma	Pin III	-
5	52	T2N0M0	42,0	6	Мелкоацинарный рак Small acinar carcinoma	Pin III	-
6	63	T2N0M0	4,7	6	Мелкоацинарный рак Small acinar carcinoma	Рак Carcinoma	+
7	63	T2N0M0	6,0	6	Мелкоацинарный рак Small acinar carcinoma	Pin III	-
8	66	T2N0M0	12,6	6	Мелкоацинарный рак Small acinar carcinoma	Рак Carcinoma	+
9	63	T3N0M0	4,9	6	Мелкоацинарный рак Small acinar carcinoma	Pin III	-
10	68	T2N0M0	42,0	7	Мелкоацинарный рак Small acinar carcinoma	Рак Carcinoma	+
11	69	T2N0M0	32,8	7	Мелкоацинарный рак Small acinar carcinoma	Рак Carcinoma	+
12	67	T2N0M0	8,4	6	Мелкоацинарный рак Small acinar carcinoma	Нормальная ткань Intact tissue	-
13	58	T2NxM0	22,8	8	Мелкоацинарный рак Small acinar carcinoma	Аденоз Adenosis	+
14	55	T3N0M0	34,0	7	Элементов опухоли не обнаружено; лечебный патоморфоз рака No tumor elements; therapeutic pathomorphosis of carcinoma	Нормальная ткань Intact tissue	-
15	68	T2N0M0	5,5	7	Мелкоацинарный рак Small acinar carcinoma	Доброкачественная гиперплазия Benign hyperplasia	-
16	63	T2N0M0	8,4	8	Мелкоацинарный рак Small acinar carcinoma	Доброкачественная гиперплазия Benign hyperplasia	-
17	65	T2N0M0	4,6	7	Мелкоацинарный рак Small acinar carcinoma	Рак Carcinoma	+

синтезированы в компании «Литех» (Россия). При постановке ПЦР использовали смесь нуклеотидов и DreamTaq™ буфер (Fermentas, Литва), а также Taq ДНК-полимеразу и готовую смесь для ПЦР ScreenMix (оба реагента – производства «Евроген», Россия). Для выявления продуктов амплификации в электрофорезе использовали агарозу, ТАЕ-буфер и этидиум бромид «Панэко» (Россия), а также маркер длин фрагментов ДНК (100+ bp DNA Ladder) «Евроген» (Россия). ПЦР проводили на приборе Терцик (ДНК-технологии, Россия), результаты электрофореза ПЦР-продуктов анализировали и фотографировали на аппарате Image Quant Las 4000 (GE Healthcare, Великобритания).

### Результаты

При гистологическом исследовании операционного материала (см. таблицу) наличие раковой опухоли в ПЖ было подтверждено для 16 из 17 больных. Во всех этих случаях, кроме одного, был выявлен мелкоацинарный рак, у 1 пациента (№ 2) – умеренно-дифференцированная аденокарцинома. В ткани ПЖ больного № 14 элементов опухоли не обнаружено; 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 графе 7 таблицы. 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) были отмечены Pin, причем в материале от больного № 1 присутствовали и слабая (Pin I), и тяжелая (Pin 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 наличие ДНК E7 ВПЧ-16 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 Pin, присутствовавших на препарате от больного № 1.

В связи с результатом, полученным 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 авторы обнаружили, что 42 % из обследованных были положительными по ВПЧ типов высокого онкогенного риска [5].

### Заключение

Длительное время предметом исследований и дискуссий остаются вопросы о возможной роли онкогенных ВПЧ при таких распространенных формах рака, как рак легкого [6] и молочной железы [7]. Впервые на группе российских больных РПЖ нами получены результаты, которые свидетельствуют о возможном вовлечении ВПЧ-16 в генез этой распространенной формы злокачественных новообразований. Представленные данные важны для выяснения этиологии и разработки мер профилактики РПЖ.

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

**Conflict of interests.** Authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

**Financing.** The study was performed without external funding.

## 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):625–30. DOI: 10.1371/journal.pone.0066630. PMID: 23799125.
6. Ragin C., Obikoya-Malomo M., Kim S. et al. HPV-associated lung cancer: 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):1–11. DOI: 10.1186/bcr940. PMID: 15642157.

**Статья поступила:** 31.01.2017. **Принята в печать:** 24.08.2017.

**Article received:** 31.01.2017. **Accepted for publication:** 24.08.2017.