

## Иммуногистохимические аспекты рака мочевого пузыря на фоне вирусной инфекции

И.В. Косова<sup>1, 2</sup>, О.Б. Лоран<sup>1</sup>, Л.А. Синякова<sup>1</sup>, Л.В. Гундорова<sup>3</sup>, В.А. Косов<sup>4</sup>, И.Е. Погодина<sup>5</sup>, Д.Н. Колбасов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Кафедра урологии и хирургической андрологии ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России; Россия, 125993 Москва, ул. Баррикадная, 2/1, стр. 1;

<sup>2</sup>урологическое отделение ГБУЗ «Городская клиническая больница имени В.П. Демикова Департамента здравоохранения города Москвы»; Россия, 109263 Москва, ул. Шкулева, 4;

<sup>3</sup>патологоанатомическое отделение ГБУЗ «Городская клиническая больница имени В.П. Демикова Департамента здравоохранения города Москвы»; Россия, 109263 Москва, ул. Шкулева, 4;

<sup>4</sup>ГУ «Коми республиканский онкологический диспансер»; Россия, Республика Коми, 167904 Сыктывкар, пос. Красноздонский, Нювчимское шоссе, 46;

<sup>5</sup>БУЗ ВО «Вологодская областная клиническая больница №2»; Россия, 162602 Череповец, ул. Данилова, 15

**Контакты:** Инга Владимировна Косова kosovainga@mail.ru

**Введение.** Вирусная инфекция является основополагающим фактором развития вирусиндуцированных опухолей различной локализации.

**Цель исследования** — изучить особенности маркеров апоптоза, пролиферативной активности, ангиогенеза, ростовых факторов у больных раком мочевого пузыря с наличием вирусной ДНК в опухолевой ткани.

**Материалы и методы.** Проведены обследование и лечение 100 больных, страдающих раком мочевого пузыря (72 мужчин и 28 женщин), в возрасте 38–90 лет (средний возраст  $65 \pm 10$  лет). Выполнена полимеразная цепная реакция ткани опухоли — диагностика наличия вируса простого герпеса 1-го и 2-го типов, вируса папилломы человека (ВПЧ) высокого онкогенного риска, цитомегаловируса (ЦМВ), вируса Эпштейна—Бarr (ВЭБ). Иммуногистохимическое исследование выполнено 32 больным, определяли следующие показатели: маркеры пролиферативной активности Ki-67, p63, маркеры супрессора опухолевого роста Vcl-2, p53, маркер ангиогенеза CD31, маркер адгезии CD44, рецептор эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor, EGFR).

**Результаты.** Наличие вирусных ДНК в ткани опухоли выявлено у 34 больных, из них 50 % опухолей являлись низкодифференцированными. У 27 больных обнаружено наличие ДНК ВЭБ в опухоли, у 6 — ЦМВ, у 5 — ВПЧ высокого онкогенного риска (16, 39, 45, 52, 59-го типов), у 1 — вируса простого герпеса 1-го и 2-го типов. У 4 из 34 пациентов выявлено ДНК нескольких вирусов (в 1 случае — ВПЧ 59-го типа + ВЭБ, в 2 — ВЭБ + ЦМВ, в 1 — ЦМВ + ВЭБ + ВПЧ 31-го, 52-го типов). У пациентов с наличием вирусных ДНК в опухолевой ткани обнаружены высокие коррелятивные связи наличия ДНК ВЭБ с экспрессией CD31, Ki-67 и наличия ДНК ВПЧ высокого онкогенного риска с экспрессией Vcl-2. Высокие уровни анти-ВЭБ капсидных антител коррелировали с экспрессией EGFR, Ki-67, нуклеарных — с CD44. Выявлены особенности экспрессии исследуемых маркеров в зависимости от стадии процесса, степени анаплазии, рецидивного характера поражения. Отмечены морфологические особенности изменения лимфоцитарно-плазмочитарного звена.

**Заключение.** Выявлены коррелятивные связи наличия вирусных ДНК в опухолевой ткани мочевого пузыря с маркерами пролиферативной активности, ангиогенеза и факторов апоптоза. Предположительно вирусная инфекция усиливает пролиферативную активность и супрессию факторов апоптоза, что способствует неблагоприятному течению опухолевого процесса. Требуется продолжение исследования.

**Ключевые слова:** рак мочевого пузыря, вирусная инфекция, вирус Эпштейна—Бarr, цитомегаловирус, вирус папилломы человека высокого онкогенного риска, вирус простого герпеса 1-го и 2-го типов

**Для цитирования:** Косова И.В., Лоран О.Б., Синякова Л.А. и др. Иммуногистохимические аспекты рака мочевого пузыря на фоне вирусной инфекции. Онкоурология 2018;14(2):142–54.

DOI: 10.17650/1726-9776-2018-14-2-142-154

### Immunohistochemical characteristics of bladder cancer in patients with virus-positive tumors

I. V. Kosova<sup>1, 2</sup>, O. B. Loran<sup>1</sup>, L. A. Sinyakova<sup>1</sup>, L. V. Gundorova<sup>3</sup>, V. A. Kosov<sup>4</sup>, I. E. Pogodina<sup>5</sup>, D. N. Kolbasov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Urology and Surgical Andrology, Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Ministry of Health of Russia; Build. 1, 2/1 Barrikadnaya St., Moscow 125993, Russia;

<sup>2</sup>Department of Urology, V.P. Demikhov City Clinical Hospital, Moscow Healthcare Department; 4 Shkuleva St., Moscow 109263, Russia;

<sup>3</sup>Department of Pathology, V.P. Demikhov City Clinical Hospital, Moscow Healthcare Department; 4 Shkuleva St., Moscow 109263, Russia;

<sup>4</sup>Komi Republican Oncology Dispensary; 46 Nyuvchimsкое Shosse, Krasnozadonskiy Settlement, Syktyvkar, Republic of Komi 167904, Russia; <sup>5</sup>Vologda Regional Clinical Hospital No. 2; 15 Danilova St., Cherepovets 162602, Russia

**Background.** Viral infection is a major factor in virus-associated carcinogenesis.

**Objective:** to evaluate the expression of growth factors and markers of apoptosis, proliferative activity, and angiogenesis in patients with viral DNA-positive bladder cancer.

**Materials and methods.** The study included 100 bladder cancer patients (72 males and 28 females) aged between 38 and 90 years (mean age  $65 \pm 10$ ). Tumor tissue samples were tested by polymerase chain reaction to detect DNA of herpes simplex virus types 1 and 2 (HSV-1 and HSV-2 respectively), high-risk human papillomavirus (HPV), cytomegalovirus (CMV), and Epstein—Barr virus (EBV). Immunohistochemical analysis was performed in 32 patients and included the following markers: proliferation marker Ki-67, p63, apoptosis regulator Bcl-2, p53, angiogenesis marker CD31, adhesion protein CD44, and epidermal growth factor receptor (EGFR).

**Results.** Viral DNA in tumor tissue was detected in 34 patients; of them, 50 % had poorly-differentiated tumors. Twenty-seven patients were found to have EBV DNA in their tumor tissue; 6 patients had CMV DNA; 5 patients had high-risk HPV DNA (types 16, 39, 45, 52, and 59); 1 patient had HSV1 and HSV2 DNA. Four out of 34 participants had mixed infections (1 case of HPV 59 + EBV; 2 cases of EBV + CMV; 1 case of CMV + EBV + HPV 31 and 52). We observed a strong correlation between the presence of EBV DNA and levels of CD31 and Ki-67 expression as well as between high-risk HPV DNA and Bcl-2 expression. High levels of antibodies against EBV capsid antigen were associated with EGFR and Ki-67 expression, whereas the level of antibodies against EBV nuclear antigen correlated with CD44 expression. We evaluated specific characteristics of expression of the markers analyzed depending on the tumor stage, grade of anaplasia, and recurrence. We also assessed morphological characteristics of changes in lymphocytic and plasma cell infiltrates.

**Conclusion.** We found a correlation between the presence of viral DNA in bladder cancer tissue and markers of proliferative activity, angiogenesis, and apoptosis. Viral infection is likely to increase proliferative activity and suppression of apoptosis, which may cause tumor progression. Further studies are needed to assess this correlation.

**Key words:** bladder cancer, viral infection, Epstein—Barr virus, cytomegalovirus, human papillomavirus high-risk types, viral infection herpes simplex virus type 1 and 2

**For citation:** Kosova I.V., Loran O.B., Sinyakova L.A. Immunohistochemical characteristics of bladder cancer in patients with virus-positive tumors. *Onkourologiya = Cancer Urology* 2018;14(2):142—54.

## Введение

В структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями в мире на рак мочевого пузыря (РМП) приходится 3,2 %, в России — 4 % на долю мужского и 1 % женского населения [1].

Ежегодно в мире диагностируют около 30–40 тыс. новых случаев заболевания. В развитых странах РМП встречается в 6 раз чаще, чем в развивающихся. Летальный исход, связанный с основным заболеванием, отмечается у 20–25 % пациентов [2]. В большинстве (70–80 %) случаев переходно-клеточный РМП (уротелиальную карциному) диагностируют на неинвазивных стадиях, при этом 30–85 % опухолей рецидивируют после проведенного лечения [3, 4]. В связи с этим основной проблемой является адекватная оценка риска развития рецидива и прогрессии у конкретного пациента.

Инфекционные заболевания и хроническое воспаление — важные факторы риска канцерогенеза и развития опухолей человека [5–7]. Международное агентство по изучению рака (International Agency for Research on Cancer, IARC) установило, что примерно 18 % всех опухолей в мире ассоциированы с инфекционными заболеваниями, вызываемыми бактериями, вирусами и паразитами [8]. Было установлено, что хронический воспалительный процесс предопределяет развитие около 25 % опухолей человека [9].

Канцерогенез — многоступенчатый процесс накопления мутаций и других генетических изменений, приводящих к нарушениям ключевых клеточных

функций, таких как регуляция пролиферации и дифференцировки, естественная гибель клеток (апоптоз), морфогенетические реакции клетки, а также, вероятно, к неэффективному функционированию факторов специфического и неспецифического противоопухолевого иммунитета [10].

**Цель исследования** — изучить особенности маркеров апоптоза, пролиферативной активности, ангиогенеза, ростовых факторов у больных РМП с наличием вирусной ДНК в опухолевой ткани.

## Материалы и методы

В пилотном исследовании проведены обследование и лечение 100 больных, страдающих РМП (72 мужчины и 28 женщин), в возрасте 38–90 лет (средний возраст  $65 \pm 10$  лет). Выполнена полимеразная цепная реакция (ПЦР) ткани опухоли — диагностика наличия вируса простого герпеса 1-го и 2-го типов, вируса папилломы человека (ВПЧ) высокого онкогенного риска, цитомегаловируса (ЦМВ), вируса Эпштейна—Барр (ВЭБ). Вирусные ДНК определяли методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени. Исследование проводили полуавтоматическим способом с использованием ПЦР-детекторов CFX-96, Bio-Rad (США) и реактивов Вектор-Бест (Россия); верхний предел определения (с разведением) — 100 копий в пробе. Следует отметить, что из всех проанализированных в работе вирусов только ВПЧ высокого онкогенного риска и ВЭБ являются онкогенными.

Для иммуногистохимического исследования использовали биопсийный и операционный материал от 32 пациентов с верифицированной опухолью мочевого пузыря. Из них в опухолевой ткани 21 больного выявлено наличие вирусных ДНК (ЦМВ, ВЭБ, вируса простого герпеса 1-го и 2-го типов, ВПЧ высокого онкогенного риска), в 11 случаях вирусные ДНК не обнаружены. Кроме того, у пациентов иммуноферментным методом определяли уровни противовирусных антител к герпесу 1-го и 2-го типов, ЦМВ, ВЭБ. Операционный материал фиксировали в 1 % растворе нейтрального формалина и заливали в парафин. Срезы толщиной 5 мкм, окрашенные гематоксилином и эозином, были подвергнуты обзорному морфологическому анализу, при котором стадию рака определяли в соответствии с классификацией TNM, а степень дифференцировки опухолевых клеток оценивали по рекомендациям Всемирной организации здравоохранения (1973). Микроскопическое изучение препаратов проводили с применением бинокулярного микроскопа с фотоприставкой Axio Zeis (Германия) при 400-кратном увеличении. Иммуногистохимическое исследование выполняли на серийных парафиновых срезах толщиной 5 мкм с использованием стрептавидин-биотинового метода. В качестве детекционной системы применяли 6 маркеров. Определяли следующие показатели: маркер пролиферативной активности Ki-67 (sp6), маркер супрессора опухолевого роста Bcl-2 (D07), p53 (124), маркер ангиогенеза CD31 (sp164), маркер адгезии CD44 (spm521), рецептор эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor, EGFR) (sp84) (Spring Bioscience, США).

Интенсивность реакций с антигенами, локализованными на мембранах клеток и внутриклеточных мембранах (Bcl-2, CD31, CD44 и EGFR), оценивали полуколичественным способом по балльной шкале от 0 до 3 с учетом выраженности реакции и ее локализации: 0 — отсутствие реакции, 1 — слабая реакция, 2 — умеренная реакция, 3 — сильная реакция. Результаты реакции с антигенами, имеющими ядерную локализацию (Ki-67, p63), анализировали по системе подсчета Histochemical score, включающей в себя интенсивность иммуногистохимической окраски по 3-балльной шкале и долю (в процентах) окрашенных клеток и представляющей сумму произведений процентов, отражающих долю клеток с различной интенсивностью окраски на балл, соответствующий интенсивности реакции. Интенсивность окраски: 0 — нет окрашивания, 1 — слабое окрашивание, 2 — умеренное окрашивание, 3 — сильное окрашивание.

Проведена оценка воспалительной инфильтрации в опухолевой ткани и подлежащей строме. Полуколичественно от 0 до 3 баллов (отсутствие, слабая, умеренная и выраженная степень) анализировали состояние лимфоцитарно-плазмочитарного инфильтрата: 1) в опухоли;

2) рассеянного в подлежащей строме; 3) периваскулярной инфильтрации; 4) очаговой гиперплазии лимфоидной ткани в виде лимфоидных фолликулов.

### Результаты

Характеристика группы представлена в табл. 1.

Ki-67 — белок, синтез которого начинается в фазе  $G_1$  клеточного цикла и ускоряется в фазах S и  $G_2$ , достигая пика во время митотического деления, после чего он деградирует. Индекс Ki-67 коррелирует с развитием рецидива и прогрессированием заболевания, особенно уротелиального рака [11–13].

По нашим данным, при анализе показателей экспрессии Ki-67 нормальный уротелий не показал экспрессии данного маркера. По мере озлокачествления наблюдается увеличение количества и степени экспрессии опухолевых клеток. Если у больных без вирусных ДНК в опухолевой ткани отмечается четкая зависимость экспрессии Ki-67 от стадии процесса, степени анаплазии (рис. 1) и риска рецидива опухолевого процесса, что коррелирует с данными литературы [11–14], то у пациентов с наличием вирусных ДНК в опухолевой ткани такой зависимости не прослеживается (рис. 2–5).

Если сравнить медиану показателя Ki-67 у пациентов с наличием вирусных ДНК ВЭБ в опухолевой ткани и их отсутствием, то в первом случае в целом пролиферативная активность выше (48,92 % против 30,16 %;  $p = 0,0466$ ) (рис. 6).

Нами выявлены коррелятивные связи (рис. 7) наличия ВЭБ в опухолевой ткани с маркером пролиферации Ki-67 ( $R = 0,354$ ;  $p = 0,047$ ;  $n = 32$ ). Если же рассматривать коррелятивные связи внутри группы с наличием ДНК различных вирусов в опухолевой ткани, то они становятся статистически достоверно высокими ( $R = 0,611$ ;  $p = 0,003$ ;  $n = 21$ ).

Мы обнаружили высокие обратные корреляции стадии процесса с экспрессией Ki-67 (в баллах) у пациентов с наличием вирусных ДНК в опухолевой ткани ( $R = -0,805$ ;  $p = 0,016$ ), при этом у пациентов с ВЭБ корреляционная зависимость увеличивается ( $R = -0,926$ ;  $p = 0,074$ ). Такая же тенденция наблюдается при наличии положительных лимфатических узлов ( $R = -0,781$ ;  $p = 0,038$ ). Что касается множественности поражения, то пролиферативная активность (Ki-67 в баллах) выше при одиночных опухолях ( $R = -0,33$ ;  $p = 0,425$ ), тогда как у пациентов с наличием только ВЭБ корреляционная зависимость сильнее ( $R = -0,926$ ;  $p = 0,074$ ). Такие же корреляционные связи получены и при первичном/рецидивном поражении мочевого пузыря (Ki-67 в баллах) (в группе пациентов с наличием вирусных ДНК  $R = -0,33$ ;  $p = 0,425$ ; с наличием только ВЭБ  $R = -0,926$ ;  $p = 0,074$ ). Мы не выявили значимых корреляций степени анаплазии с экспрессией Ki-67. Таким образом, на наш взгляд,

у данной категории больных нарушение пролиферативной активности на фоне вирусной инфекции происходит в начальной стадии опухолевого процесса, а затем снижается по мере прогрессирования

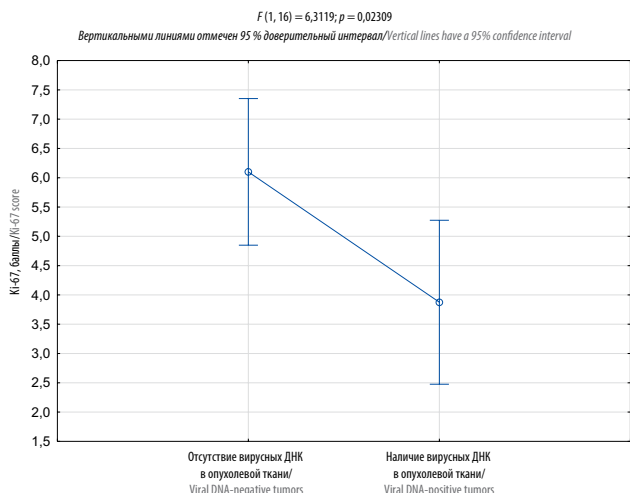
заболевания. Именно поэтому средние показатели экспрессии этого маркера (см. рис. 2) ниже, чем у пациентов с отсутствием ДНК вирусов в опухолевой ткани. Однако медиана маркера в целом выше у пациентов

Таблица 1. Характеристика исследуемой группы пациентов

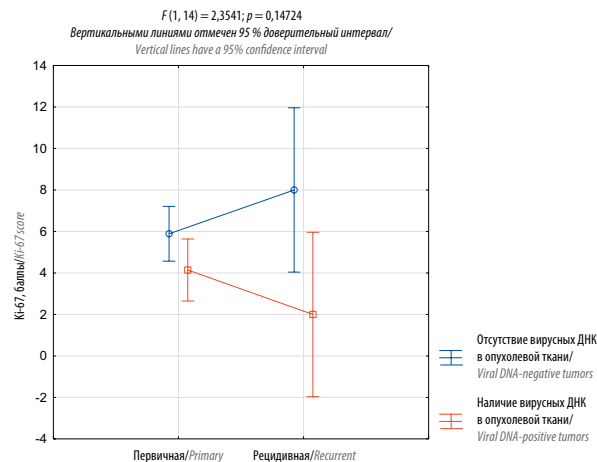
Table 1. Patient characteristics

Показатель Parameter	Пациенты с наличием вирусных ДНК в опухолевой ткани (n = 21) Patients with viral DNA-positive tumors (n = 21)	Пациенты с отсутствием вирусных ДНК в опухолевой ткани (n = 11) Patients with viral DNA-negative tumors (n = 11)
Возраст, лет Age, years	66,0 ± 2,1	65,0 ± 1,8
Пол, n: Gender, n:		
женский female	8	3
мужской male	13	8
Стадия процесса, n: Tumor stage, n:		
T1	12	6
T2–4	9	5
Степень анаплазии, n: Grade of anaplasia, n:		
G <sub>1</sub>	7	5
G <sub>2</sub>	4	1
G <sub>3</sub>	10	5
Наличие лимфоузлов, n: Lymph node status, n:		
N0	16	8
N+	4	3
Характер поражения, n: Tumor, n:		
первичный primary	14	10
рецидивный recurrent	7	1
Опухоль, n: Lesion, n:		
единичная solitary	13	3
множественное поражение multiple lesions	8	8
Выявленные вирусные ДНК в опухолевой ткани, n Viral DNA detected in tumor tissue, n	ВЭБ — 14 EBV — 14 ВЭБ + ВПЧ высокого онкогенного риска — 3 EBV + high-risk HPV — 3 ВПЧ высокого онкогенного риска — 2 High-risk HPV — 2 ЦМВ — 2 CMV — 2	—

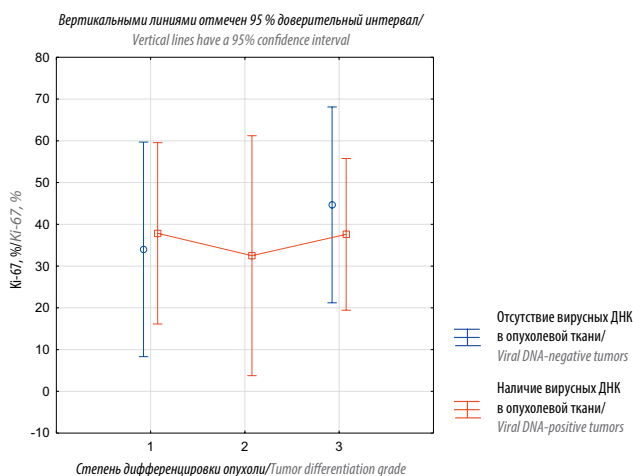
**Примечание.** Здесь и в табл. 2: ВЭБ — вирус Эпштейна—Барр; ВПЧ — вирус папилломы человека; ЦМВ — цитомегаловирус.  
**Note.** Here and in Table 2: EBV — Epstein—Barr virus; HPV — human papillomavirus; CMV — cytomegalovirus.



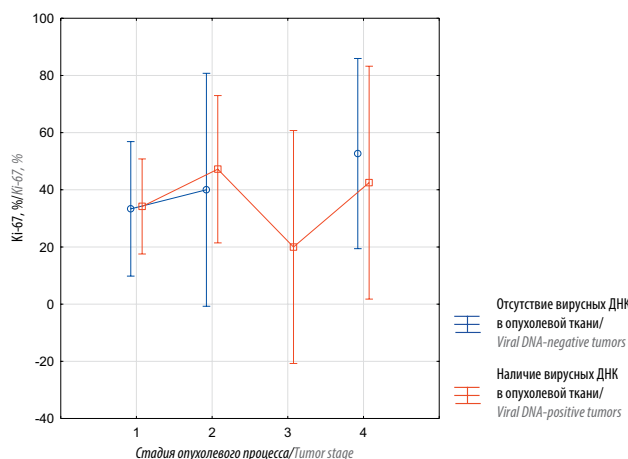
**Рис. 1.** Уровень экспрессии Ki-67 у пациентов с наличием и отсутствием вирусных ДНК в опухолевой ткани (сравнение средних показателей)  
**Fig. 1.** Ki-67 expression in patients with viral DNA-positive and negative tumors (comparison of means)



**Рис. 2.** Уровень экспрессии Ki-67 у пациентов с наличием и отсутствием вирусных ДНК в опухолевой ткани и рецидивным характером опухолевого процесса  
**Fig. 2.** Ki-67 expression in patients with recurrent viral DNA-positive and negative tumors



**Рис. 3.** Уровень экспрессии Ki-67 у пациентов с наличием и отсутствием вирусных ДНК в опухолевой ткани в зависимости от степени анаплазии  
**Fig. 3.** Ki-67 expression in patients with viral DNA-positive and negative tumors depending on the grade of anaplasia



**Рис. 4.** Уровень экспрессии Ki-67 у пациентов с наличием и отсутствием вирусных ДНК в опухолевой ткани в зависимости от стадии опухолевого процесса  
**Fig. 4.** Ki-67 expression in patients with viral DNA-positive and negative tumors depending on the tumor stage

с наличием вирусной ДНК (см. рис. 6). Сводные данные приведены на рис. 8.

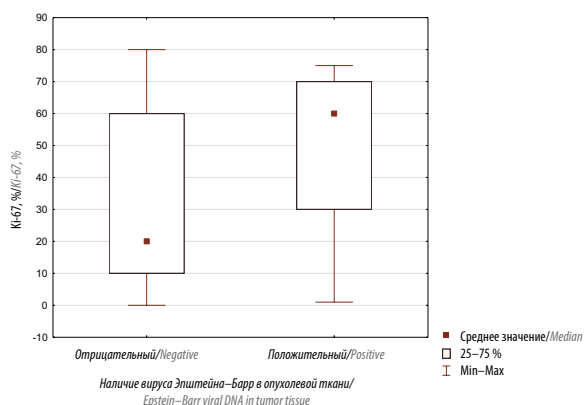
Мы выявили статистически достоверное увеличение показателей лимфоцитарно-плазмочитарного звена у больных с ВЭБ и ЦМВ в опухолевой ткани (табл. 2).

Кроме того, в группе пациентов с наличием вирусных ДНК обнаружены коррелятивные связи наличия лимфоцитов в опухолевой ткани со стадией опухолевого процесса ( $R = 0,343; p = 0,024$ ), наличием лимфатических узлов ( $R = 0,327; p = 0,055$ ), степенью анаплазии ( $R = 0,341; p = 0,031$ ). Отмечены обратные коррелятивные связи первичного характера поражения с периваскулярной инфильтрацией ( $R = -0,345; p = 0,017$ ),

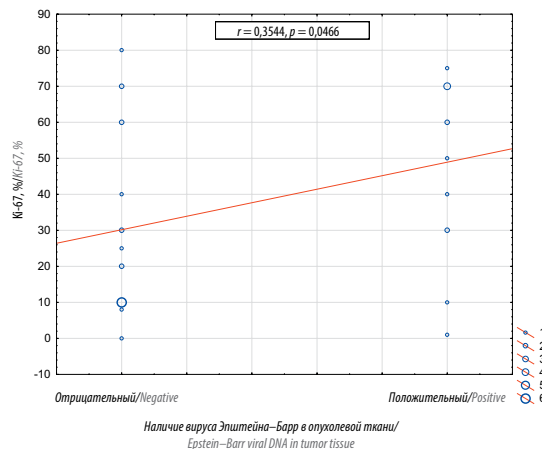
очаговой гиперплазией лимфоцитов (в том числе в виде фолликулов) ( $R = -0,305; p = 0,037$ ). Наличие положительных лимфатических узлов также коррелировало с очаговой гиперплазией лимфоцитов (в том числе в виде фолликулов) ( $R = 0,332; p = 0,051$ ).

Нами также отмечена выраженная инфильтрация лимфоцитов в собственной пластинке слизистой оболочки мочевого пузыря.

Что касается серологических маркеров, в нашем исследовании мы получили статистически достоверные коррелятивные связи уровня анти-ВЭБ IgG-VCA с пролиферативной активностью Ki-67 (в процентах) ( $R = 0,337; p = 0,05$ ), что свидетельствует о влиянии именно латентной вирусной инфекции на пролиферативную



**Рис. 5.** Экспрессия Ki-67 у пациентов с наличием и отсутствием вирусных ДНК вируса Эпштейна–Барр в опухолевой ткани  
**Fig. 5.** Ki-67 expression in patients with Epstein–Barr virus-positive and negative tumors



**Рис. 6.** Коррелятивные связи экспрессии Ki-67 с наличием ДНК вируса Эпштейна–Барр в опухолевой ткани  
**Fig. 6.** Correlation between Ki-67 expression and presence of Epstein–Barr viral DNA in tumor tissue

**Таблица 2.** Сравнение средних показателей лимфоцитарно-плазмочитарного звена и уровня некоторых противовирусных антител у больных раком мочевого пузыря с наличием и отсутствием ЦМВ и ВЭБ в опухолевой ткани

**Table 2.** Comparison of lymphocytic and plasma cell infiltrates and levels of some antiviral antibodies in patients with bladder cancer with and without CMV and EBV in tumor tissue

Показатель лимфоидно-плазмочитарного инфильтрата Characteristics of the lymphocytic and plasma cell infiltrate	Наличие ЦМВ (n = 6) CMV-positive (n = 6)	Отсутствие ЦМВ (n = 94) CMV-negative (n = 94)	<i>p</i>	Наличие ВЭБ (n = 27) EBV-positive (n = 27)	Отсутствие ВЭБ (n = 73) EBV-negative (n = 73)	<i>p</i>
Лимфоциты, рассеянные в строме (в зоне, граничащей с опухолью) Lymphocytes scattered in the stroma (area adjacent to the tumor edge)	2,27	1,79	<b>0,05</b>	2,14	1,72	<b>0,0171</b>
Лимфоциты в опухоли Lymphocytes in the tumor	2,0	1,42	<b>0,0330</b>	1,83	1,34	<b>0,0092</b>
Периваскулярная лимфоидная инфильтрация Perivascular lymphoid infiltration	2,0	1,48	0,1136	1,90	1,38	<b>0,0238</b>
Очаговая гиперплазия лимфоцитов (в том числе в виде фолликулов) Focal lymphoid hyperplasia (including lymphoid follicles)	1,73	0,85	<b>0,0099</b>	0,93	0,96	0,9176

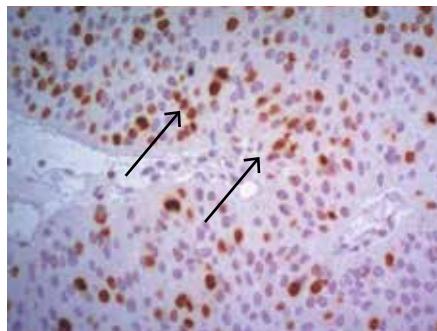
**Примечание.** Полужирным шрифтом выделены статистически достоверные данные,  $p \leq 0,05$ .  
**Note.** In bold type, statistically valid data are identified,  $p \leq 0,05$ .

активность опухоли как у пациентов с наличием вирусной ДНК в опухолевой ткани, так и при ее отсутствии.

Выявлены умеренные коррелятивные связи наличия ДНК ВЭБ с экспрессией CD31 (процентное отношение сосудов к площади всей опухоли) ( $R = 0,325$ ;  $p = 0,066$ ). В группе с наличием вирусных ДНК

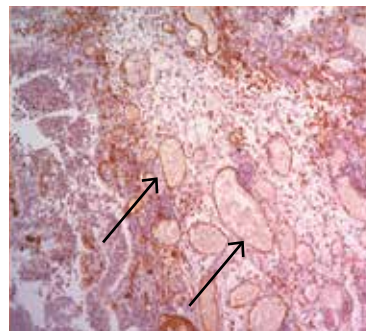
коррелятивные связи статистически достоверно более высокие ( $R = 0,492$ ;  $p = 0,028$ ) (рис. 9).

Обнаружены существенные различия в экспрессии CD31 в опухолях с разной дифференцировкой. Так, у пациентов с низкой степенью дифференцировки показатель CD31 (процентное отношение сосудов



**Рис. 7.** Переходно-клеточная уротелиальная карцинома низкой степени злокачественности (фрагмент опухоли): выраженная экспрессия Ki-67 (до 60 % опухолевых клеток) ( $\times 40$ )

Fig. 7. Low-grade transitional cell (urothelial) carcinoma (tumor fragment): pronounced Ki-67 expression (in up to 60% of tumor cells) ( $\times 40$ )



**Рис. 9.** Переходно-клеточная уротелиальная карцинома низкой степени злокачественности (фрагмент опухоли): выраженная экспрессия CD31 в строме и опухолевой ткани ( $\times 40$ )

Fig. 9. Low-grade transitional cell (urothelial) carcinoma (tumor fragment): pronounced CD31 expression in the stroma and tumor tissue ( $\times 40$ )

к площади всей опухоли) составил  $34,44 \pm 17,48$ , с высокой степенью дифференцировки —  $17,86 \pm 17,99$  ( $p = 0,0456$ ) (см. рис. 8).

Мы не выявили корреляционных связей экспрессии CD31 со стадией процесса, тогда как общее число сосудов коррелировало с наличием положительных лимфатических узлов ( $R = 0,562$ ;  $p = 0,019$ ) и степенью анаплазии ( $R = 0,467$ ;  $p = 0,038$ ). Наблюдалась обратная корреляция при единичном характере поражения ( $R = -0,377$ ;  $p = 0,101$ ).

EGFR (HER1) играет важную роль в пролиферации эпителиальных клеток. Белок EGFR имеет тирозин-киназную активность, которая необходима

для передачи сигнала при его активации. Активация механизмов с участием EGFR приводит к усилению пролиферативной активности опухолевых клеток, неоангиогенезу, замедлению апоптоза, более раннему появлению метастазов [15]. Частота мутаций EGFR зависит от клинических характеристик пациентов (курение, пол, этническое происхождение). Мы выявили статистически достоверные сильные связи уровня анти-ВЭБ IgG-VCA с экспрессией EGFR как у пациентов исследуемой группы ( $R = 0,489$ ;  $p = 0,004$ ), так и у пациентов с наличием вирусных ДНК в опухолевой ткани ( $R = 0,47$ ;  $p = 0,032$ ); у больных, у которых в опухолевой ткани был выявлен ВЭБ, уровень корреляции составляет  $R = 0,57$ ;  $p = 0,049$ . У пациентов с наличием только ВЭБ в опухолевой ткани обнаружены достоверные сильные связи экспрессии EGFR со степенью анаплазии ( $R = 0,723$ ;  $p = 0,012$ ). Кроме того, отмечены достоверные сильные связи уровня EGFR с экспрессией Ki-67 (в баллах) ( $R = 0,748$ ;  $p = 0,05$ ), p53 ( $R = 0,499$ ;  $p = 0,025$ ) и CD44 ( $R = -0,66$ ;  $p = 0,107$ ) (см. рис. 8).

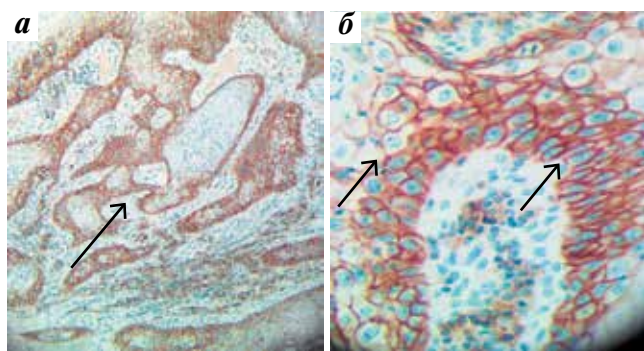
Способность опухолевых клеток утрачивать адгезивные свойства отражается на вероятности метастазирования, в связи с чем была исследована экспрессия CD44 (рис. 10). Мы также выявили достоверные сильные связи уровня нуклеарных антител к ВЭБ, анти-ВЭБ IgG-EBNA с экспрессией CD44 ( $R = 0,54$ ;  $p = 0,025$ ), равно как и в группе с наличием вирусных ДНК в опухолевой ткани ( $R = 0,707$ ;  $p = 0,050$ ). При сравнении средних показателей уровень экспрессии CD44 был выше у пациентов с наличием вирусных ДНК в опухолевой ткани ( $5,63 \pm 1,19$  против  $4,75 \pm 1,98$ ;  $p = 0,3023$ ). Мы выявили обратные коррелятивные связи экспрессии CD44 со степенью анаплазии ( $R = -0,557$ ;  $p = 0,152$ ) и близкие к достоверности коррелятивные связи с единичным характером поражения ( $R = -0,429$ ;  $p = 0,076$ ).

В последнее время большое внимание уделяется влиянию микроокружения на развитие опухоли. Мы

T	N	G
<ul style="list-style-type: none"> <li>Ki-67 <math>R = -0,805</math>; <math>p = 0,016</math>; ВЭБ(+) <math>R = -0,926</math>; <math>p = 0,074</math></li> <li>Bcl-2 <math>R = -0,589</math>; <math>p = 0,044</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ki-67 <math>R = -0,781</math>; <math>p = 0,038</math></li> <li>CD31 <math>R = 0,562</math>; <math>p = 0,019</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>CD31 <math>R = 0,467</math>; <math>p = 0,038</math></li> <li>EGFR <math>R = 0,723</math>; <math>p = 0,012</math></li> <li>CD44 <math>R = -0,557</math>; <math>p = 0,152</math></li> <li>Bcl-2 <math>R = 0,430</math>; <math>p = 0,163</math></li> </ul>
Первичный/рецидивный Primary/recurrent	Единичная/множественная Single/multiple	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Ki-67 <math>R = -0,33</math>; <math>p = 0,425</math>; ВЭБ(+) <math>R = -0,926</math>; <math>p = 0,074</math></li> <li>Bcl-2 <math>R = -0,327</math>; <math>p = 0,30</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ki-67 <math>R = -0,33</math>; <math>p = 0,425</math>; ВЭБ(+) <math>R = -0,926</math>; <math>p = 0,074</math></li> <li>CD31 <math>R = -0,377</math>; <math>p = 0,101</math></li> <li>CD44 <math>R = -0,429</math>; <math>p = 0,076</math></li> <li>Bcl-2 <math>R = -0,516</math>; <math>p = 0,086</math></li> </ul>	

**Рис. 8.** Уровень экспрессии маркеров апоптоза, пролиферации, ростовых факторов, маркеров ангиогенеза в зависимости от стадии опухолевого поражения, степени анаплазии, множественного и рецидивного характера поражения у пациентов с наличием вирусных ДНК в опухолевой ткани. EGFR (epidermal growth factor receptor) – рецептор эпидермального фактора роста; ВЭБ – вирус Эпштейна–Барр

Fig. 8. Expression of growth factors and markers of apoptosis, proliferation, and angiogenesis depending on the tumor stage, grade of anaplasia, presence of multiple lesions, and tumor recurrence in patients with viral DNA-positive tumors. EGFR – epidermal growth factor receptor; EBV – Epstein–Barr virus



**Рис. 10.** Инвазивная уротелиальная карцинома умеренной степени злокачественности (фрагмент опухоли): высокая степень экспрессии CD44 (выраженное мембранное окрашивание опухолевых) ( $\times 10$  (а);  $\times 40$  (б))  
**Fig. 10.** Intermediate-grade invasive urothelial carcinoma (tumor fragment): high CD44 expression (pronounced membrane staining in tumor cells) ( $\times 10$  (a);  $\times 40$  (b))

проанализировали морфологические изменения лимфоцитарно-плазмоцитарного инфильтрата и показатели пролиферативной активности, ангиогенеза, ростовых факторов и маркеров метастазирования (табл. 3). Статистически достоверные данные мы получили только в отношении экспрессии маркера пролиферации

Ki-67 и ангиогенеза CD31. Несмотря на умеренные и достоверные сильные связи показателей в группе пациентов с наличием вирусных ДНК, мы не получили статистической достоверности результатов. По нашему мнению, это связано с гиперэкспрессией маркеров пролиферации на начальном этапе онкогенеза, тогда как лимфоидная инфильтрация нарастает по мере увеличения стадии и анаплазии опухоли. И наоборот, сосудистый фактор увеличивается по мере роста лимфоидной инфильтрации.

Экспрессия Vcl-2 в опухолях низкого потенциала малигнизации выявлена в базальном слое клеток, в типично злокачественных опухолях достоверной разницы не обнаружено. Средние показатели у пациентов с наличием и отсутствием ВЭБ в опухолевой ткани составили  $4,50 \pm 1,60$  и  $4,07 \pm 1,03$  ( $p = 0,4381$ ), с наличием и отсутствием ВПЧ высокого онкогенного риска —  $5,50 \pm 2,12$  и  $4,10 \pm 1,14$  ( $p = 0,129$ ) соответственно. Высокая корреляция отмечена у больных с наличием ДНК ВПЧ высокого онкогенного риска с экспрессией Vcl-2 ( $R = 0,524$ ;  $p = 0,045$ ). Экспрессия Vcl-2 у пациентов с наличием вирусных ДНК в опухолевой ткани коррелировала со стадией процесса

**Таблица 3.** Коррелятивные связи изменений лимфоцитарно-плазмоцитарного инфильтрата с показателями пролиферативной активности и ангиогенеза у пациентов, которым выполнено иммуногистохимическое исследование

**Table 3.** Correlation between changes in lymphocytic and plasma cell infiltrates and parameters of proliferative activity and angiogenesis in patients that underwent immunohistochemical testing

Показатель лимфоидно-плазмоцитарного инфильтрата Characteristics of the lymphocytic and plasma cell infiltrate	Все пациенты ( $n = 32$ ) All patients ( $n = 32$ )	Пациенты с наличием вирусных ДНК в опухолевой ткани ( $n = 21$ ) Patients with viral DNA-positive tumors ( $n = 21$ )
Лимфоциты, рассеянные в строме (в зоне, граничащей с опухолью) Lymphocytes scattered in the stroma (area adjacent to the tumor edge)	<b>CD31 (процентное соотношение сосудов к площади всей опухоли)</b> CD31 (percent ratio of vessel area to total tumor area)	
	$R = 0,355$ ; $p = \mathbf{0,005}$	$R = 0,320$ ; $p = 0,169$
	<b>Экспрессия Ki-67 (в процентах)</b> Ki-67 expression (percent)	
	$R = 0,355$ ; $p = \mathbf{0,046}$	$R = 0,312$ ; $p = 0,169$
Лимфоциты в опухоли Lymphocytes in the tumor	<b>Экспрессия Ki-67 (в процентах)</b> Ki-67 expression (percent)	
	$R = 0,453$ ; $p = \mathbf{0,009}$	$R = 0,431$ ; $p = \mathbf{0,05}$
Периваскулярная лимфоидная инфильтрация Perivascular lymphoid infiltration	<b>CD31 (процентное соотношение сосудов к площади всей опухоли)</b> CD31 (percent ratio of vessel area to total tumor area)	
	$R = 0,389$ ; $p = \mathbf{0,03}$	$R = 0,451$ ; $p = \mathbf{0,046}$
	<b>Ki-67 (в процентах)</b> Ki-67 expression (percent)	
	$R = 0,339$ ; $p = 0,058$	—

**Примечание.** Полужирным шрифтом выделены статистически достоверные данные,  $p \leq 0,05$ .

*Note.* In bold type, statistically valid data are identified,  $p \leq 0,05$ .



( $R = -0,589$ ;  $p = 0,044$ ), единичной опухолью ( $R = -0,516$ ;  $p = 0,086$ ) и степенью анаплазии ( $R = 0,430$ ;  $p = 0,163$ ), обратно коррелировала с первичным характером поражения ( $R = -0,327$ ;  $p = 0,3$ ). Не все данные статистически достоверны, что связано с небольшим числом больных. Следует отметить высокие коррелятивные связи с маркером пролиферации Ki-67 ( $R = 0,53$ ;  $p = 0,221$ ) (см. рис. 8).

Видно, что наличие обратных коррелятивных связей факторов апоптоза, пролиферации со стадией процесса свидетельствует о том, что гиперэкспрессия этих факторов на фоне способности уклоняться от иммунного ответа приводит, по-видимому, как к прогрессированию опухолевого процесса до клинически выявляемых форм, так и к способности к рецидивированию опухоли у этой категории больных, тогда как ростовые факторы, факторы ангиогенеза и метастазирования ассоциированы со степенью анаплазии и лимфогенным метастазированием. Кроме того, обратные коррелятивные связи экспрессии CD44 со степенью анаплазии свидетельствуют о том, что у пациентов с наличием вирусных ДНК в опухолевой ткани способность к метастазированию имеется даже при высокодифференцированных опухолях.

#### Обсуждение

Около 15 % всех опухолевых заболеваний являются вирусассоциированными. К ним традиционно относятся заболевания шейки матки, печени, дыхательных путей, опухоли головы и шеи, назофарингеальная карцинома, рак желудка, лимфомы и т.д. Роль вирусной инфекции в генезе РМП считается недоказанной. Мы провели анализ показателей маркеров пролиферации, ангиогенеза, ростовых факторов и факторов адгезии у пациентов, страдающих РМП, с наличием вирусных ДНК в опухолевой ткани. В большинстве случаев имело место инфицирование опухоли ВЭБ.

M. L. Gulley подчеркивает, что ВЭБ является не просто сторонним наблюдателем развития аденокарциномы желудка, но тесно связан с патогенезом развития и поддержания опухолевого процесса [16]. Q. Liang и соавт. выявили около 5 сигнальных путей, на которые влияют только ВЭБ-ассоциированные геномные и эпигеномные альтерации со снижением периода выживания у пациентов с ВЭБ-положительным раком желудка ( $p = 0,006$ ) [17]. K. L. Chuang и соавт. обнаружили наличие ДНК ВЭБ в более чем 50 % случаев уротелиальной карциномы в стадии Ta—T1, при этом высокая степень анаплазии опухоли коррелировала с количеством геномов ВЭБ в опухоли [18]. Мы также не исключаем, что степень анаплазии и инвазии у этой категории больных зависит от количества геномов ВЭБ в опухоли.

Нами выявлено увеличение пролиферативной активности Ki-67 в зависимости от стадии, степени

анаплазии и рецидивного характера опухоли у пациентов с отсутствием вирусных ДНК в опухолевой ткани, что согласуется с данными литературы. Так, J. Breyer и соавт. указывают на высокие корреляционные связи экспрессии Ki-67 со степенью анаплазии опухоли мочевого пузыря ( $R = 0,52$ ;  $p < 0,0001$ ), стадией процесса ( $R = 0,49$ ;  $p < 0,0001$ ) у пациентов с мышечно-неинвазивным РМП (стадии Ta и T1) [19]. M. W. Vetterlein и соавт. установили связь индекса Ki-67  $> 40$  у больных мышечно-неинвазивным РМП после выполнения трансуретральной резекции стенки мочевого пузыря со снижением сроков безрецидивной выживаемости [20]. Результаты исследования M. B. Ковылиной и соавт. продемонстрировали, что у больных с рецидивом мышечно-неинвазивного РМП отмечается повышенная экспрессия антигена Ki-67 по сравнению с пациентами без рецидива заболевания (чувствительность теста 70,7 %) [14].

У пациентов с наличием вирусных ДНК в опухолевой ткани пролиферативная активность была выше на начальных стадиях заболевания, при этом у больных с наличием ВЭБ в опухолевой ткани эти корреляции были статистически достоверно выше. Аналогичные результаты получили T. Yoshizaki и соавт. при изучении пролиферативной активности ВЭБ-ассоциированной назофарингеальной карциномы. Авторы указывают на усиление пролиферативной активности и снижение апоптоза за счет активации белка-онкогена LMP-1 на начальных стадиях онкогенеза [21].

Если рассматривать вирусную коинфекцию как фактор риска развития неоплазий, то J. O. Okoye и соавт. указывают на развитие вагинальных неоплазий на фоне низкого содержания CD4 и наличие герпес-вирусной (вируса простого герпеса 2-го типа и ВЭБ) коинфекции. При этом по мере малигнизации экспрессия Ki-67 начинает повышаться. Авторы предлагают использовать этот биомаркер как диагностический и прогностический фактор развития вагинальной интраэпителиальной неоплазии [22]. Другие авторы исследовали опухоль молочной железы и выявили наличие вирусного генома у 43 % женщин, страдающих раком молочной железы, при этом повышение анти-ВЭБ IgG VCA + IgG-EBNA1 было положительным в 87 % случаев. Имели место обратная зависимость гиперэкспрессии Ki-67 в опухоли от наличия вируса в опухолевой ткани и прямая зависимость экспрессии HER2 от наличия вируса в опухоли. Была выявлена зависимость ВЭБ-инфекции от развития инфильтративной протоковой карциномы [23], в то время как гиперэкспрессия Ki-67 и циклина E2 у детей с ВЭБ-ассоциированными лимфолифферативными заболеваниями ассоциирована с неблагоприятным прогнозом течения основного заболевания [24].

В нашем исследовании экспрессия фактора адгезии CD44 была несколько выше у пациентов

с наличием вирусных ДНК в опухолевой ткани, при этом имела место обратная корреляция экспрессии CD44 со степенью анаплазии и единичным характером поражения. По-видимому, метастатический потенциал опухолей у этой категории больных не зависит от множественности поражения и возможен даже при высокодифференцированных опухолях. С.Ф. Yang и соавт. при изучении ВЭБ-положительной назофарингеальной карциномы доказали, что LMP-1 может индуцировать развитие CD44-положительных стволовых клеток у пациентов этой категории. LMP-1 активирует и является триггером для гиперактивации фосфоинозитид-3-киназного пути (PI3K/AKT), что в свою очередь стимулирует экспрессию CD44 и развитие опухолевой формации [25].

Мы получили высокие коррелятивные связи EGFR со степенью анаплазии. Кроме того, мы выявили статистически достоверные коррелятивные связи уровня капсидного антигена к ВЭБ как у пациентов с наличием, так и с отсутствием вирусных ДНК в опухолевой ткани. Обнаружены высокие коррелятивные связи экспрессии EGFR с уровнем p53 и Ki-67, что подтверждает значимость этого маркера в онкогенезе РМП. Одним из предложенных механизмов развития ВЭБ-ассоциированного канцерогенеза является тот факт, что ВЭБ под воздействием факторов внешней среды (курения, приема острой, соленой пищи и т.д.) может индуцировать ядерную аккумуляцию EGFR и IL-6-опосредованную активацию STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3), приводящие в конечном итоге к образованию 8-оксо-2'- дезоксигуанозина (8-оксо-dG), который в свою очередь и повреждает ДНК клеток. Подобные изменения были получены у пациентов с назофарингеальной карциномой [26]. S. Rebouissou и соавт. указывают на целесообразность использования анти-EGFR-препаратов у пациентов с мышечно-инвазивным РМП базального фенотипа [27]. В качестве иммунной терапии РМП в целях активации Т-клеток N. Ma и соавт. использовали специфические антитела, направленные на инактивацию EGFR и HER2. Авторы получили обнадеживающие результаты [26]. Супрессия EGFR (miR-202) уменьшает пролиферативную активность уротелиальных клеток, инвазивность и миграционную способность опухолевых клеток мочевого пузыря [28]. Таким образом, с учетом наших данных у пациентов, особенно с наличием ВЭБ в опухолевой ткани и высокими уровнями анти-ВЭБ IgG-VCA, возможно применение препаратов, ингибирующих EGFR, как патогенетически обусловленную противоопухолевую терапию.

Основным морфологическим отличием, в частности, ВЭБ-ассоциированной назофарингеальной карциномы от ВЭБ-отрицательной является выраженность лимфоидной стромальной инфильтрации [29]. Мы также выявили статистически достоверное повышение составляющих лимфоцитарно-плазмочитарного

инфильтрата у пациентов с наличием вирусных ДНК в опухолевой ткани. Кроме того, Т. Yoshizaki и соавт. уделяют большое внимание микроокружению опухоли, поскольку именно взаимодействие стромального компонента с находящимися в нем вирусными онкогенами и опухолью приводит к появлению инвазивных свойств и прогрессии опухоли [21].

Особое значение в вирусном онкогенезе придается неоангиогенезу. В группе пациентов с наличием вирусных ДНК мы выявили высокие коррелятивные связи наличия экспрессии CD31 с ДНК ВЭБ, степенью анаплазии. Аналогичные данные получили Y.W. Koh и соавт. при изучении ВЭБ-ассоциированной ходжкинской лимфомы. Авторы указывают на высокие коррелятивные связи наличия ВЭБ с факторами ангиогенеза (CD31, фактором роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF)) и сделали вывод о том, что ВЭБ играет важную роль в опухолевом ангиогенезе. Исследователи предлагают использовать противовирусные препараты и ингибиторы ангиогенеза в качестве терапии ВЭБ-положительных лимфом [30]. Эти же авторы указывают на корреляции CD31 с PD-L1 у пациентов с ВЭБ-положительными лимфомами и предлагают инновационный подход к лечению этой категории больных с использованием ингибиторов контрольных точек и ингибиторов VEGF. Они подчеркивают, что повышение экспрессии этих маркеров указывает на неблагоприятный прогноз течения опухолевого процесса [31]. Ранее в наших исследованиях мы также продемонстрировали достаточно высокую экспрессию PD-L1 у больных с наличием вирусных ДНК в опухолевой ткани [32]. Однако требуется продолжение исследования. В целом роль экспрессии данного маркера в течении и прогнозе опухолевых заболеваний различных локализаций активно обсуждается в литературе [33–35], однако все сходятся во мнении, что при ВЭБ-ассоциированных неоплазмах экспрессия PD-L1 повышается [34, 36]. Таким образом, по мере развития опухолевого процесса экспрессия факторов ангиогенеза увеличивается у этой категории больных.

Что касается факторов апоптоза, то наиболее сильные коррелятивные связи мы получили при наличии ДНК ВПЧ высокого онкогенного риска. При этом, как и в случае маркера пролиферации, имели место обратная корреляция со стадией процесса, первичным поражением и единичным характером опухоли, прямая корреляция со степенью анаплазии. По нашему мнению, у этой категории больных процесс онкогенеза начинается с высокой пролиферативной активности и снижения апоптоза.

Немаловажную роль играет способность инфицированных клеток уклоняться от иммунной атаки макроорганизма.

Таким образом, можно предположить, что у пациентов, страдающих РМП, с наличием вирусных ДНК

в опухолевой ткани, хронической герпес- и ВПЧ-вирусной инфекции имеют место повышение пролиферативной активности и снижение апоптоза на этапе «премалигнизации» [21]. По мере прогрессии опухоли происходит активизация факторов ангиогенеза, адгезии и факторов роста. Все процессы протекают на фоне способности инфицированных опухолевых клеток уклоняться от иммунного ответа и вторичной иммуносупрессии, латентного воспаления. Характерной особенностью данной категории больных является выраженная лимфоидная инфильтрация стромального компонента и микроокружения опухоли. На наш взгляд, немаловажную роль играет сочетанная вирусная инфекция, которая, по-видимому, потенцирует действие друг друга.

### Заключение

В нашем исследовании выявлены коррелятивные связи наличия вирусных ДНК в опухолевой ткани мочевого пузыря с маркерами пролиферативной активности, ангиогенеза и факторов апоптоза. Предположительно, вирусная инфекция (возможно и сочетанная) способствует усилению пролиферативной активности и супрессии факторов апоптоза на этапе «премалигнизации» опухолевого процесса с последующей активацией факторов ангиогенеза, ростовых факторов. Требуется продолжение исследования, так как, несмотря на степень корреляции, не все данные статистически достоверны из-за небольшой выборки больных.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Eble J.N., Sauter G., Epstein J.I., Sesterhenn I.A. Tumors of the Urinary system and Male Genital Organs. Lyon press, 2004.
- Brauers A., Jakse G. Epidemiology and biology of human urinary bladder cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000;126(10):575–83. PMID: 11043394.
- Theodorescu D. Molecular pathogenesis of urothelial bladder cancer. *Histol Histopathol* 2003;18(1):259–74. DOI: 10.14670/HH-18.259. PMID: 12507305.
- Babjuk M., Osterlinck W., Sylvester R. et al. EAU Guidelines on Ta, T1 (non-muscle-invasive) Bladder Cancer. In: EAU Guidelines. Edition presented at the EAU Annual Congress Milan, 2008.
- Coussens L.M., Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002;420(6917):860–7. DOI: 10.1038/nature01322. PMID: 12490959.
- Kawanishi S., Hiraku Y. Oxidative and nitrative DNA damage as biomarker for carcinogenesis with special reference to inflammation. *Antioxid Redox Signal* 2006;8(5–6):1047–58. DOI: 10.1089/ars.2006.8.1047. PMID: 16771694.
- Murata M., Thanan R., Ma N., Kawanishi S. Role of nitrative and oxidative DNA damage in inflammation-related carcinogenesis. *J Biomed Biotechnol* 2012;2012:623019. DOI: 10.1155/2012/623019. PMID: 22363173.
- IARC. Chronic infections. In: *World Cancer Report*. Eds.: B.W. Stewart, P. Kleihues. Lyon, France: IARC Press, 2008. Pp. 128–135.
- Hussain S.P., Harris C.C. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *Int J Cancer* 2007;121(11):2373–80. DOI: 10.1002/ijc. 23173. PMID: 17893866.
- Андреева Ю.Ю. Морфологические и молекулярно-биологические факторы прогноза рака мочевого пузыря. Дис. ... д-ра мед. наук. М., 2008 [Andreeva Yu.Yu. Morphological and molecular-biological prognostic factors of bladder cancer. Thesis ... of doctor of medical sciences. Moscow, 2008. (In Russ.)].
- Wang L., Feng C., Ding G. et al. Ki-67 and TP53 expressions predict recurrence of non-muscle-invasive bladder cancer. *Tumour Biol* 2014;35(4):2989–95. DOI: 10.1007/s13277-013-1384-9. PMID: 24241960.
- Krause F.S., Feil G., Bichler K.H. Immunohistochemical examinations (Ki-67, p53, nm23) and DNA cytophotometry in bladder cancer. *Anticancer Res* 2000;20(6D):5023–8. PMID: 11326661.
- Ding W., Gou Y., Sun C. et al. Ki-67 is an independent indicator in non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC); combination of EORTC risk scores and Ki-67 expression could improve the risk stratification of NMIBC. *Urol Oncol* 2014;32(1):42.e13–9. DOI: 10.1016/j.urolonc.2013.05.004. PMID: 24360660.
- Ковылина М.В., Прилепская Е.А., Тупикина Н.В., Рева И.А. Прогностическая роль экспрессии Ki-67 в определении риска развития рецидива мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря. *Онкоурология* 2017;13(1):67–73. DOI: 10.17650/1726-9776-2017-13-1-67-73. [Kovylyina M.V., Prilepskaya E.A., Tupikina N.V., Reva I.A. Prognostic role of Ki-67 expression in determination of risk of non-muscle invasive bladder cancer recurrence. *Onkourologiya = Cancer Urology* 2017;13(1):67–73. (In Russ.)].
- Woodburn J.R. The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Pharmacol Ther* 1999;82(2–3):241–50. PMID: 10454201.
- Gulley M.L. Genomic assays for Epstein—Barr virus-positive gastric adenocarcinoma. *Exp Mol Med* 2015;47:e134. DOI: 10.1038/emm.2014.93. PMID: 25613731.
- Liang Q., Yao X., Tang S. et al. Integrative identification of Epstein—Barr virus-associated mutations and epigenetic alterations in gastric cancer. *Gastroenterology* 2014;147(6):1350–62. DOI: 10.1053/j.gastro.2014.08.036. PMID: 25173755.
- Chuang K.L., Pang S.T., Liao S.K. et al. Epstein—Barr virus DNA load in tumour tissues correlates with poor differentiation status in non-muscle invasive urothelial carcinomas. *BJU Int* 2011;107(1):150–4. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2010.09474.x. PMID: 20735392.
- Breyer J., Wirtz R.M., Otto W. et al. Predictive value of molecular subtyping in NMIBC by RT-qPCR of ERBB2, ESR1, PGR and MKI67 from formalin fixed TUR biopsies. *Oncotarget* 2017;8(40):67684–95. DOI: 10.18632/oncotarget.18804. PMID: 28978063.
- Vetterlein M.W., Roschinski J., Gild P. et al. Impact of the Ki-67 labeling index and p53 expression status on disease-free survival in pT1 urothelial carcinoma of the bladder. *Transl Androl Urol* 2017;6(6):1018–26. DOI: 10.21037/tau.2017.11.10. PMID: 29354488.
- Yoshizaki T., Kondo S., Endo K. et al. Modulation of the tumor microenvironment by Epstein—Barr virus latent membrane protein 1 in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Sci* 2018;109(2):272–8. DOI: 10.1111/cas.13473. PMID: 29247573.
- Okoye J.O., Erinle C., Ngokere A.A., Jimoh A. Low CD4 cells and viral co-infection increase the risk of VaIN: use of SCCA1 and Ki-67 as diagno-prognostic biomarkers. *Pathophysiology* 2018;25(1):51–6. DOI: 10.1016/j.pathophys.2017.09.004. PMID: 29269193.

23. Yahia R., Zaoui C., Derbale W. et al. Epstein—Barr virus and invasive mammary carcinomas: EBNA, EBERs and molecular profile in a population of West Algeria. *Ann Biol Clin (Paris)* 2018;76 (1):75–80. DOI: 10.1684/abc. 2017.1312. PMID: 29336321.
24. Ng S.B., Ohshima K., Selvarajan V. et al. Prognostic implication of morphology, cyclinE2 and proliferation in EBV-associated T/NK lymphoproliferative disease in non-immunocompromised hosts. *Orphanet J Rare Dis* 2014;9:165. DOI: 10.1186/s13023-014-0165-x. PMID: 25475054.
25. Yang C.F., Yang G.D., Huang T.J. et al. EB-virus latent membrane protein 1 potentiates the stemness of nasopharyngeal carcinoma via preferential activation of PI3K/AKT pathway by a positive feedback loop. *Oncogene* 2016;35 (26):3419–31. DOI: 10.1038/onc. 2015.402. PMID: 26568302.
26. Ma N., Kawanishi M., Hiraku Y. et al. Reactive nitrogen species-dependent DNA damage in EBV-associated nasopharyngeal carcinoma: the relation to STAT3 activation and EGFR expression. *Int J Cancer* 2008;122(11):2517–25. DOI: 10.1002/ijc. 23415. PMID: 18307254.
27. Rebouissou S., Bernard-Pierrot I., de Reynies A. et al. EGFR as a potential therapeutic target for a subset of muscle-invasive bladder cancers presenting a basal-like phenotype. *Sci Transl Med* 2014;6 (244):244ra91. DOI: 10.1126/scitranslmed.3008970. PMID: 25009231.
28. Zhang L., Xu J., Yang G. et al. miR-202 inhibits cell proliferation, migration, and invasion by targeting EGFR in human bladder cancer. *Oncol Res* 2018. DOI: 10.3727/096504018X15149787144385. PMID: 29298735.
29. Petersson F. Nasopharyngeal carcinoma: a review. *Semin Diagn Pathol* 2015;32 (1):54–73. DOI: 10.1053/j. semdp. 2015.02.021. PMID: 25769204.
30. Koh Y.W., Han J.H., Yoon D.H. et al. Epstein—Barr virus positivity is associated with angiogenesis in, and poorer survival of, patients receiving standard treatment for classical Hodgkin’s lymphoma. *Hematol Oncol* 2017;36(1):182–8. DOI: 10.1002/hon.2468. PMID: 28744882.
31. Koh Y.W., Han J.H., Yoon D.H. et al. PD—L1 expression correlates with VEGF and microvessel density in patients with uniformly treated classical Hodgkin lymphoma. *Ann Hematol* 2017;96(11):1883–90. DOI: 10.1007/s00277-017-3115-6. PMID: 28842748.
32. Лоран О.Б., Синякова Л.А., Гундорова Л.В. и др. Влияние латентной вирусной инфекции на течение и прогноз рака мочевого пузыря. Доклад на XIII Съезде XVII Конгресса Российского общества урологов, 8–10 ноября 2017. [Loran O.B., Sinyakova L.A., Gundorova L.V. et al. The Influence of latent viral infection on the course and prognosis of bladder cancer. Report on the XIII Congress, of the Russian society of urology, November 8–10, 2017. [Loran O.B., Sinyakova L.A., Gundorova L.V. et al. Impact of latent viral infection on the course and prognosis of bladder cancer. Oral presentation at the 17<sup>th</sup> Congress of the Russian Society of Urology; November 8–10, 2017. (In Russ.)].
33. Bracarda S., Altavilla A., Hamzaj A. et al. Immunologic checkpoints blockade in renal cell, prostate, and urothelial malignancies. *Semin Oncol* 2015;42(3):495–505. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2015.02.004. PMID: 25965369.
34. Seo A.N., Kang B.W., Kwon O.K. et al. Intratumoural PD—L1 expression is associated with worse survival of patients with Epstein—Barr virus-associated gastric cancer. *Br J Cancer* 2017;117(12):1753–60. DOI: 10.1038/bjc.2017.369. PMID: 29073638.
35. Wankowicz S.A. M., Werner L., Orsola A. et al. Differential expression of PD—L1 in high grade T1 vs muscle invasive bladder carcinoma and its prognostic implications. *J Urol* 2017;198(4):817–23. DOI: 10.1016/j.juro.2017.04.102. PMID: 28487100.
36. Chen B.J., Chapuy B., Ouyang J. et al. PD—L1 expression is characteristic of a subset of aggressive B-cell lymphomas and virus-associated malignancies. *Clin Cancer Res* 2013;19(13):3462–73. DOI: 10.1158/1078–0432.CCR-13–0855. PMID: 23674495.

### Вклад авторов

И.В. Косова: выбор темы проекта, разработка дизайна исследования, задач и целей, получение данных для анализа, анализ полученных данных (включая статистический), обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи;

О.Б. Лоран, Л.А. Синякова: выбор темы проекта, разработка дизайна исследования, задач и целей, анализ полученных данных, общее руководство исследованием;

Л.В. Гундорова, И.Е. Погодина: проведение основных морфологических исследований, включая выполнение иммуногистохимических исследований и оценку полученных результатов;

В.А. Косов, Д.Н. Колбасов: получение данных для анализа, анализ полученных данных.

### Authors’ contributions

I.V. Kosova: selection of the project theme, developing the research design and objectives, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data (including statistical), reviewing of publications of the article’s theme, article writing;

O.B. Loran, L.A. Sinyakova: selection of the project theme, developing the research design, objectives, analysis of the obtained data, overall research management;

L.V. Gundorova, I.E. Pogodina: carrying out of the basic morphological researches, including performance of immunohistochemical researches and an estimation of the received results;

V.A. Kosov, D.N. Kolbasov: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data.

### ORCID авторов

И.В. Косова: <https://orcid.org/0000-0002-0051-0583>

О.Б. Лоран: <https://orcid.org/0000-0002-7531-1511>

### ORCID of authors

I.V. Kosova: <https://orcid.org/0000-0002-0051-0583>

O.B. Loran: <https://orcid.org/0000-0002-7531-1511>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.  
**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Исследование проведено без спонсорской поддержки.  
**Financing.** The study was performed without external funding.

**Информированное согласие.** Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.  
**Informed consent.** All patients gave written informed consent to participate in the study.

**Статья поступила:** 31.03.2018. **Принята к публикации:** 15.06.2018  
**Article received:** 31.03.2018. **Accepted for publication:** 15.06.2018

DOI: 10.17650/1726-9776-2018-14-2-154-155

## Рецензия на статью «Иммуногистохимические аспекты рака мочевого пузыря на фоне вирусной инфекции»

Review of the article “Immunohistochemical characteristics  
of bladder cancer in patients with virus-positive tumors”

В своей работе авторы изучали экспрессию маркеров апоптоза, пролиферативной активности, ангиогенеза, а также ростовых факторов у больных раком мочевого пузыря (РМП) и их ассоциацию с наличием вирусной инфекции. В исследование включено 100 больных с верифицированным РМП. Авторы исследовали клинические образцы на наличие ДНК вирусов простого герпеса 1-го и 2-го типа, цитомегаловируса, вируса папилломы человека (ВПЧ) и вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ), а также серологические маркеры инфекции. Наличие вирусных ДНК в ткани опухоли было выявлено у 34 больных, причем преобладающим вирусом был ВЭБ (обнаружен в 27 случаях). Данные, полученные авторами, совпадают с данными литературы [1, 2]. Новым в данной работе является исследование экспрессии молекулярно-биологических маркеров опухоли и их ассоциации с наличием вирусной ДНК в опухолевой ткани. Так, иммуногистохимическое исследование данных маркеров было выполнено для 32 пациентов. Выявлены статистически значимые положительные корреляции между наличием ДНК ВЭБ и экспрессией CD31, Ki-67, а также между наличием ДНК ВПЧ высокого онкогенного риска и экспрессией маркера апоптоза (Bcl-2). Высокий титр анти-ВЭБ капсидных антител коррелировал с экспрессией EGFR и Ki-67, а уровень нуклеарных антител — с экспрессией CD44. Выявлены особенности экспрессии исследуемых маркеров в зависимости от стадии опухолевого процесса, степени анаплазии, рецидивного характера поражения.

В настоящее время уделяется особое внимание роли инфекционных процессов, вызванных некоторыми вирусами, бактериями и паразитами, в развитии онкологических заболеваний. Показана ассоциация рака мочевого пузыря с вирусной инфекцией. Среди вирусов, часто обнаруживаемых в опухолях этой локализации, можно выделить ВПЧ, ВЭБ, цитомегаловирус и полиомавирусы [1]. Многочисленные исследования показали прямую корреляцию наличия ДНК ВПЧ высокого канцерогенного риска [2–4] и ВЭБ [5, 6] с развитием РМП. Анализ имеющихся данных показывает, что потенциальными этиологическими агентами РМП могут быть также полиомавирусы [7]. Однако современные исследования носят скорее эпидемиологический характер, что не является достаточным для доказательства этиологической роли вирусов в канцерогенезе РМП. Выяснение молекулярных механизмов действия вирусов остается актуальной задачей. Требуются дальнейшие исследования, направленные на изучение молекулярно-биологических механизмов воздействия вирусов на основные клеточные сигнальные пути, регулирующие пролиферативную и апоптотическую активность инфицированных клеток.

В связи с этим данные, представленные в публикации, хотя и носят предварительный характер, важны для понимания этиологической роли вирусов в развитии РМП. Исследования в этом направлении будут