

Р. Б. Самсонов, Т. Г. Клочкова, В. И. Евтушенко

Изменения инфицированности ткани предстательной железы вирусами семейства *Herpesviridae* и *HPV* у больных раком простаты в зависимости от стадии патологического процесса

ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий»
Минздрава России, Санкт-Петербург

Роль инфекции в возникновении и развитии рака предстательной железы (РПЖ) до сих пор не до конца понятна и этот вопрос требует дальнейших исследований. Экспериментальные данные, представленные в работе, получены методом гибридизации *in situ* и демонстрируют высокую степень инфицированности ткани предстательной железы (ПЖ) больных РПЖ вирусами, обладающими онкогенными и онкомодулирующими свойствами – HCMV, EBV, HHV8 и HPV. Авторами показано, что у больных, находящихся на разных подстадиях стадии T2, инфицированность ткани ПЖ вирусами увеличивается от T2a к T2c. Обсуждаются возможные биологические механизмы и следствия обнаруженной тенденции.

Ключевые слова: рак предстательной железы, вирусная инфекция, иммуносупрессия, онкогенность, онкомодуляция

В настоящее время остро стоит вопрос как о причинах возникновения, так и о дифференциальной диагностике рака предстательной железы (РПЖ) – второй наиболее распространенной формы рака у мужчин по всему миру [11]. До сих пор остаются невыявленными многие факторы, влияющие на возникновение и течение РПЖ. В предшествующие два десятилетия ряд авторов неоднократно высказывали предположения о том, что значительную роль в этих процессах может играть инфекция предстательной железы (ПЖ) микроорганизмами, в частности, вирусами [10]. Существуют исследования, достаточно убедительно показывающие присутствие в ткани ПЖ генетического материала тех или иных вирусов [8,10]. Нами было проведено комплексное исследование инфицированности вирусами семейства *Herpesviridae* и *HPV* ткани ПЖ у больных РПЖ и доброкачественной гиперплазией предстательной железы (ДГПЖ) методом ПЦР и *in situ* гибридизации (ИСГ) [1,2]. Мы обнаружили, что степень инфицированности ткани ПЖ вирусами очень высока –

HCMV – 87 %, EBV – 54%, HHV8 – 50%, HPV – 23%. В данной работе мы предприняли исследование инфицированности ткани ПЖ вирусами в зависимости от стадии РПЖ. Для исследования были выбраны больные, находящиеся на стадии T2. Особенностью этой стадии развития РПЖ является то, что опухоль ещё не выходит за пределы ПЖ, что, с некоторыми оговорками, позволяет изучать процессы, происходящие только в опухолевой и прилегающей условно нормальной ткани ПЖ. Подстадии T2a, T2b, T2c характеризуются возрастанием размера опухоли. Мы предположили, что выявленные закономерности изменения инфицированности по мере развития злокачественного процесса позволят приблизиться к ответу на вопрос о возможной роли вирусной инфекции в прогрессии РПЖ.

Материалы и методы

Исследование проведено на архивных образцах ткани ПЖ 30 пациентов в возрасте 55–75 лет с диагнозом РПЖ (стадии T2a–T2c). Материал был получен в ходе операций радикальной простатэктомии в клинике ФГБУ РНЦРХТ Минздрава России. Препараты были охарактеризованы патоморфологом. Суспензии клеток, содержащих ДНК HCMV были предоставлены лабораторией по разработке и производству препаратов для диагностики инфекционных заболеваний ФГУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Суспензии клеток, содержащих ДНК EBV и HHV-8 были предоставлены лабораторией вирусного канцерогенеза ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН.

Выделение ДНК из архивных образцов и суспензий клеток, праймеры и условия реакций ПЦР, получение меченых Dig-11-дУТФ зондов и методика ИСГ подробно описаны в [2].

Для статистического анализа были использованы пакеты программ Microsoft Office 2003 (AtteStat), программа Statgraphics Plus версия 5,1 и STATISTICA версия 6. 0.

Результаты и обсуждение

30 использованных в работе архивных образцов были разделены на 3 группы в соответствии со стадией РПЖ: стадия T2a – 10 образцов, T2b – 12 образцов, T2c – 8 образ-

цов. Был проведен анализ инфицированности образцов ткани ПЖ каждого пациента методом гибридизации *in situ* с зондами, гомологичными последовательностям ДНК следующих вирусов: HCMV, EBV, HHV8 и HPV 16-го и 18-го типов (комплексный зонд на оба типа). В целом данные распределились следующим образом: HCMV был обнаружен у 23 пациентов (77%), EBV – у 16 (54%), HHV8 – у 15 (50%), HPV – у 7 (23%). Для подтверждения результатов было сделано по одному дополнительному срезу парафинизированного образца ткани каждого пациента, из этих участков ткани была выделена ДНК и проведен ее анализ методом ПЦР с праймерами к последовательностям геномов изучаемых вирусов. В целом, результаты ПЦР-анализа (данные не приводятся) совпали с результатами, полученными методом гибридизации *in situ*, однако выявленное последним методом разнообразие вирусов было существенно больше. Причины расхождений в данных, полученных этими двумя методами, мы подробно обсуждали в [2]. Вкратце, мы пришли к выводу, что метод ПЦР более чувствителен к ингибиторам, присутствующим в фиксированной ткани, чем метод гибридизации *in situ*, поэтому показатели инфицированности, полученные первым методом были ниже, чем вторым.

Результаты распределения гибридизационных сигналов в зависимости от стадии заболевания представлены в табл. 1. Полученные результаты свидетельствуют как о тенденции к увеличению общей вирусной нагрузки ткани ПЖ, так и об увеличении разнообразия типов вирусов, присутствующих в ткани, по мере возрастания размера опухоли. Анализ данных, представленных в табл. 1, с использованием критерия Фримана-Холтона показал статистически достоверные различия в инфицированности для всех типов вирусов для больных, находящихся на разных стадиях заболевания (табл. 2).

В результате проведенного анализа мы не нашли существенной разницы в распределении гибридизационного сигнала между опухолевой и прилегающей условно-нормальной тканью. В табл. 3 – 5 приведены данные о насыщенности гибридизационными сигналами препаратов (пропорциональной количеству знаков «+» в клетках таблиц) и распределении между эпителиальными и стромальными клетками для разных стадий, относящиеся в равной мере, как к опухолевым, так и к прилегающим условно нормальным участкам ткани ПЖ.

Дисперсионный анализ данных таблиц продемонстрировал, что число типов вирусов, обнаруживаемых в ткани ПЖ, и количественная представленность каждого вируса зависит от стадийности заболевания ($p = 0,002$ и $p = 0,004$

Таблица 1.

Результаты детекции вирусных ДНК методом ИСГ в препаратах ткани предстательной железы больных РПЖ, находящихся на разных стадиях заболевания

	T2a		T2b		T2c	
	Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%
HCMV	3	30	1	8,3	-	-
EBV	-	-	-	-	-	-
HCMV+EBV	2	20	3	25,0	-	-
HCMV+HHV8	-	-	-	-	1	12,5
HCMV+EBV+HHV8	-	-	4	33,3	2	25
HCMV+HHV8+HPV	-	-	2	16,7	1	12,5
EBV+HHV8+HPV	-	-	1	8,3	-	-
HCMV+EBV+HHV8+HPV	-	-	-	-	3	37,5
Не обнаружено вирусов	5	50	1	8,3	1	12,5
Всего пациентов	10	100	12	100	8	100

Таблица 2.

Определение статистических различий в представленности вирусов на разных стадиях РПЖ

Тип вируса	p-значение
HCMV	0,04
EBV	0,04
HHV8	0,003
HPV	0,03

Таблица 3.

Количественная представленность вирусов, обнаруженных у пациентов группы T2a в эпителии и строме предстательной железы

№ пациента	HCMV		EBV	
	Э*	С*	Э	С
5	+	+	++	++
8	+	+++	-	
13	++	++	-	
23	+++	+	+	-
29	++	-	-	

* Э железистый эпителий, С – строма

соответственно). Что касается локализации сигналов, то в целом не удалось обнаружить статистически достоверных различий между инфицированностью стромы и эпителия. Для более детальной оценки вклада эпителиальной или стромальной локализации каждого из исследуемых вирусов в стадийность заболевания в зависимости от количества обнаруженного вируса был использован критерий Манна-Уитни. В результате оказалось, что только для HHV8 количественные различия в эпителиальной локализации на стадиях T2b-T2c являются достоверными ($p = 0,006$). Таким образом, можно утверждать,

Таблица 4.
Количественная представленность вирусов, обнаруженных у пациентов группы T2b в эпителии и строме предстательной железы

№ пациента	HCMV		EBV		HHV8		HPV	
	Э*	С	Э	С	Э	С	Э	С
1	++	+	+	-	-	-	-	-
4	++	-	+++	-	-	-	-	-
9	+	+	-	-	+	+	+	-
11	++	+++	-	-	-	+++++	-	+++++
12	+++++	+++++	-	-	-	-	-	-
14	-	-	+	-	+	+	+	-
18	+++++	-	+++++	+++	+++	-	-	-
21	+++++	+++++	+++++	+++++	-	-	-	-
22	+	+	+	+	++	++	-	-
25	+++++	-	++	+	+	-	-	-
30	++	++	+	-	+	+	-	-

* Э железистый эпителий, С – строма

Таблица 5.
Количественная представленность вирусов, обнаруженных у пациентов группы T2c в эпителии и строме предстательной железы

№ пациента	HCMV		EBV		HHV8		HPV	
	Э*	С	Э	С	Э	С	Э	С
3	+++	-	++	-	+++++	+++++	-	-
6	+	+	-	+	+++++	+++++	-	-
10	+++	+++	-	-	+++++	+++++	-	-
19	+++++	+++++	-	-	+	-	+	-
20	+++++	+++	+++++	+	+++	+	-	+
24	+	+	+	-	+	+	-	-
27	++	++	+	+	+	-	++++	-
29	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+	+

* Э железистый эпителий, С – строма

что более поздние стадии заболевания характеризуются большим видовым разнообразием вирусов и большим количеством вирусных геномов в ткани.

Обнаруженное нами разнообразие вирусов в ткани ПЖ у больных РПЖ подтверждает данные других исследователей и наши ранее опубликованные наблюдения [1,2,8,10]. При этом нам кажется, что выявленная корреляция вирусной инфицированности ткани ПЖ и стадии заболевания имеет важное значение и требует более детального изучения. Возможно, существует несколько биологических механизмов, определяющих данную корреляцию. Во-первых, известно, что увеличение количества вирусной инфекции по мере роста опухоли можно связать с усилением экспрессии рецепторов ростовых факторов, таких как EGFR [4] и PDGFR [3] по мере прогрессирования РПЖ. При проникновении в клетку некоторые вирусы, например HCMV [5,9], могут взаимодействовать с этими рецепторами; таким образом, увеличение количества клеток, экспрессирующих EGFR и PDGFR, и представленности этих рецепторов на поверхности клеток может спо-

собствовать увеличению инфицированности ткани.

Можно также предположить, что по мере роста опухоли в ней накапливается всё больше клеток, обладающих способностью эффективно уходить от иммунного ответа, используя различные механизмы, и создаётся соответствующее микроокружение в прилегающей здоровой ткани и строме за счёт синтеза опухолью определённого набора иммуносупрессирующих цитокинов [7]. По-видимому, такие клетки не будут элиминированы иммунной системой и в случае их инфицированности вирусами. Именно этим можно было бы объяснить наблюдаемое нами увеличение разнообразия и количества вирусной инфекции в ткани ПЖ, поражённой опухолью. С этой точки зрения, инфицированность ткани простаты можно было бы рассматривать как прогностический показатель – маркер иммуносупрессивности опухоли, а, возможно, и её агрессивности.

Изучаемые нами вирусы обладают механизмами подавления иммунной системы подобными опухолевым, а именно, они также ингибируют систему представления антигенов

и создают иммуносупрессирующее микроокружение вокруг инфицированных клеток [6]. Поэтому полученные данные предполагают и иную трактовку: за рост опухоли ответственна в значительной степени именно вирусная инфекция, поскольку при наличии вирусов в ткани увеличиваются возможности ухода опухолевых клеток от иммунного контроля, и, как следствие, усиливается рост опухоли. Однако, несмотря на то, что все изученные нами вирусы обладают онкогенными или онкомодулирующими свойствами [5,10], следует признать, что такая возможность выглядит менее вероятно, поскольку увеличение инфицированности мы наблюдали для всех вирусов, а не для одного типа, кроме того, не было найдено различий в инфицированности опухолевой и прилегающей условно нормальной ткани. Нельзя всё же исключить то, что прогрессия в инфицированной несколькими онкомодулирующими вирусами опухоли всё же ускоряется в силу кумулятивного эффекта вирусной и опухолевой иммуносупрессии. Этот вопрос в настоящее время остаётся неисследованным, также как не изучен вопрос об общем влиянии на организм больного РПЖ увеличения вирусной нагрузки в ткани.

Итак, нами обнаружено увеличение инфицированности вирусами ткани ПЖ у больных РПЖ по мере возрастания стадии заболевания внутри исследованной группы больных от T2a к T2c, причём увеличивалось как количество, так и разнообразие инфекционных агентов. Для адекватной оценки этого факта необходимы дальнейшие исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Клочкова Т. Г., Андабеков Т. Т., Самсонов Р. Б. и др. Анализ инфицированности предстательной железы цитомегаловирусом у больных раком и доброкачественной гиперплазией простаты // Мед. академ. журнал. - 2008. - Т. 8. - С. 64-70.
2. Самсонов Р. Б., Клочкова Т. Г., Евтушенко В. И. Инфицированность ткани предстательной железы вирусами семейства Herpesviridae и HPV у больных раком простаты // Вопр. онкол. - 2012. - Т. 58. - С. 795-799.
3. Dolloff N., Shulby S. S., Nelson A. V. et al. Bone-metastatic potential of human prostate cancer cells correlates with Akt/PKB activation by alpha platelet derived growth factor receptor // Oncogene. - 2005. - Vol. 24. - P. 6848-6854.
4. Marks R. A., Zhang S., Montironi R. et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in prostatic adenocarcinoma after hormonal therapy: a fluorescence in situ hybridization and immunohistochemical analysis // The Prostate. - 2008. - Vol. 68. - P. 919-923.
5. Michaelis M., Baumgarten P., Mittelbronn M. et al. Oncomodulation by human cytomegalovirus: novel clinical findings open new roads // Med. Microbiol. Immunol. - 2011. - Vol. 200. - P. 1-5.
6. Naniche D., Oldstone M. B. A. Generalized immunosuppression: how viruses undermine the immune response // Cell. Mol. Life Sci. - 2000. - Vol. 57. - P. 1399-1407.
7. Rabinovich G. A., Gabrilovich D., Sotomayor E. M. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells // Ann. Rev. Immunol. - 2007. - Vol. 25. - P. 267-296.
8. Samanta M., Harkins L., Klemm K. et al. High prevalence of human cytomegalovirus in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic carcinoma // J. Urol. - 2003. - Vol. 170. - P. 998-1002.
9. Soroceanu L., Akhavan A., Cobbs C. S. Platelet-derived growth factor alpha receptor activation is required for human cytomegalovirus infection // Nature. - 2008. - Vol. 455. - P. 391-395.
10. Sutcliffe S. Sexually transmitted infections and risk of prostate cancer: Review of historical and emerging hypotheses // Epidemiology Faculty Publications. - 2010. - Paper 2. - http://digitalcommons.wustl.edu/epid_pubs/2.
11. http://www.wcrf.org/cancer_facts/prostate-cancer-worldwide.php

Поступила в редакцию 26. 11. 2016 г

R. B. Samsonov, T. G. Klochkova, V. I. Evtushenko

Changes of infection of the prostate tissue by Herpesviridae family viruses and HPV in prostate cancer patients depending on the stage of the pathological process

Russian Research Center of Radiology and Surgical Technologies
St. Petersburg

The role of infection in the beginning and progression of prostate cancer is not known to the end at the moment. Experimental data, presented in the article, are obtained by hybridization in situ and demonstrate high degree of infection of the prostate tissue by viruses with the oncogenic and oncomodulation properties HCMV, EBV, HHV8 and HPV. The authors revealed that in patients at different substages of T2 stage infection of the prostate tissue increased from T2a to T2c. The importance of these findings is discussed.

Key words: prostate cancer, virus infection, immunosuppression, oncogenecity, oncomodulation