

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

ИНФИЦИРОВАННОСТЬ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ВИРУСАМИ СЕМЕЙСТВА HERPESVIRIDAE И HPV У БОЛЬНЫХ РАКОМ ПРОСТАТЫ

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

Проведено исследование инфицированности 30 архивных образцов ткани предстательной железы (ПЖ) больных раком предстательной железы (РПЖ) цитомегаловирусом (HCMV), вирусом Эпштейна-Барр (EBV), вирусом герпеса 8-го типа (HHV8) и папилломавирусом 16-го и 18-го типов (HPV). Идентификацию вирусов проводили методами ПЦР и гибридизации *in situ* (ИСГ). В целом обнаружена высокая инфицированность ткани ПЖ вирусами. По результатам ПЦР и ИСГ вирусы встречались соответственно со следующей частотой: HCMV—87 и 77%, EBV—53 и 54%, HHV8—0 и 50%, HPV—0 и 23%.

Ключевые слова: рак предстательной железы, HCMV, EBV, HHV8, HPV, ПЦР, гибридизация *in situ*, инфицированность

Рак предстательной железы (РПЖ) является второй наиболее распространенной формой рака в мире у мужчин. Около 910 000 случаев РПЖ были зарегистрированы в 2008 г., что составляет около 14% от всех новых случаев рака у мужчин [9]. Предполагают, возможность дальнейшего роста заболеваемости РПЖ. Между тем, до сих пор остаются невыявленными многие факторы, влияющие на возникновение и течение этой формы рака. В предшествующие 2 десятилетия ряд авторов неоднократно высказывали предположения о том, что значительную роль в процессе канцерогенеза может играть инфекция предстательной железы (ПЖ) микроорганизмами и, в частности, вирусами [8]. Однако данные о наличии тех или иных вирусов в ткани ПЖ довольно противоречивы [7]. Существуют исследования, достаточно убедительно показывающие присутствие в ткани ПЖ генетического материала тех или иных вирусов [5, 6]. Другие исследователи не находят вирусных ДНК или РНК в ткани ПЖ [4]. Нами были проведены исследования инфицированности цитомегаловирусом (HCMV) ткани ПЖ при ее доброкачественной гиперплазии и РПЖ методом ПЦР [2]. Мы обнаружили, что степень инфицированности ткани ПЖ HCMV очень высока—до 70%. Использование метода ПЦР в выявлении вирусов в опухолях приводит к противоречивым представлени-

ям об инфицированности ткани ПЖ вирусами в нормальном состоянии и при опухолях. В связи с этим мы в настоящей работе исследовали локализацию цитомегаловируса (HCMV) на тканевых срезах ПЖ методом гибридизации *in situ* (ИСГ), вирусом Эпштейна-Барр (EBV), герпеса 8-го типа (HHV8) и папилломавируса (HPV).

Материалы и методика

Исследование проведено на архивных образцах ткани ПЖ 30 пациентов в возрасте 55—75 лет с диагнозом РПЖ (стадии T1-T2). Материал был получен в ходе операций радикальной простатэктомии в ФГБУ РНЦРХТ. Средний возраст пациентов составлял 65 лет. Препараты были исследованы 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 РАНН.

Выделение ДНК из архивных образцов проводили по протоколу, разработанному ранее [1]. Качество полученной ДНК оценивали методом ПЦР с праймерами к гену бета-актина человека. Выделение вирусных ДНК из суспензий клеток проводили набором Axuprep blood genomic DNA miniprep kit (Axugen biosciences, USA) в соответствии с инструкцией производителя.

ПЦР проводили по протоколу компании «Литех». Праймеры и условия реакций перечислены в табл. 1.

Разделение фрагментов осуществляли электрофорезом в агарозном геле в буфере TBE.

Для получения зондов гибридизации *in situ* фрагменты вирусной ДНК клонировали в вектор pAL-TA (Eurogene). В дальнейшем наработанные с помощью ПЦР вставки метили праймер-мечением Dig-11-дУТФ (Roche, Германия) с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I (Fermentas, Литва), также как и отрицательный контроль гибридизации *in situ* ДНК фага λ. В качестве положительного контроля гибридизации *in situ* использовали клонотекку 4-й хромосомы человека в векторе pBluescribe (Stratagene, США), предоставленную лабораторией радиационной генетики ФГБУ РНЦРХТ. Мечение клонотекки Dig-11-дУТФ осуществляли в процессе реамплификации.

Приготовление гистологических срезов и проведение процедуры гибридизации *in situ* осуществляли в соответствии с протоколом Boehringer Mannheim. Микроскопию осуществляли на микроскопе Leica (Leica Microsystems GmbH).

Результаты и обсуждение

Из архивных образцов ткани ПЖ 30 пациентов с диагнозом РПЖ была выделена ДНК

Таблица 1.

Праймеры и условия ПЦР, использованные в работе

Название праймера	Последовательность	Условия ПЦР	Размер продукта, п.н.
b-actin-up	5'-CCT TCC TGG GCA TGG AGT CCT G-3'	95 30'', 64 30'', 72 40'' 25 циклов	200
b-actin-low	5'-GGA GCA ATG ATC TTG ATC TTC-3'		
M13 F	5'- GTA AAA CGA CGG CCA G -3'	93 1', 60 1', 72 4' 35 циклов или 95 30'', 52 30'', 72 1,5' 25 циклов	зависит от размера вставки
M13 R	5'- CAG GAA ACA GCT ATG AC -3'		
CMV C1	5'- TGT GTC TGT CAA GTC TGA GC -3'	95 40'', 60 1', 72 30'' 40 циклов	220
CMV C2	5'- TTT CAC AGG CGT GAC ACG TT -3'		
Jas F1	5'- TAC AAA GCC GCA GTG TCG TCC AGA GGA TTA CG -3'	95 45'', 60 1', 72 45'' 35 циклов	345
Jas B1	5'- GTA GAT GGA TTC TAG CGT CGA GCG CAT -3'		
CMV-1984-F	5'-CCG AGA CAA GAT TGC ATT GGC TGA ACT GTT-3'	95 1', 67 1', 72 2' 40 циклов	1984
CMV-1984-R	5'- CCG TAT GTC CTC CAA ACC GTA TCT CCT CAT -3'		
HHV8-642-up	5'- AGG ATT CCA CCA TTG TGC TC -3'	95 1', 60 1', 72 1' 35 циклов	642
HHV8-642-low	5'- GAG ACT TCA CAG ACG GAG CC -3'		
HHV8-388-up	5'- GCT AGT CAT GGC ACT CGA CA -3'	95 1', 60 1', 72 1' 35 циклов	388
HHV8-388-low	5'- GAG CAC AAT GGT GGA ATC CT -3'		
EBV-467-up	5'- CCA CAC AAA TGT AAG AGG GG -3'	95 1', 62 1', 72 1' 35 циклов	467
EBV-467-low	5'- CTT TAT GTG AGC CCT GGA GA -3'		
EBV-895-up	5'- AAA GTA GAG GCT CAG GCC AT -3'	95 1', 62 1', 72 1' 35 циклов	895
EBV-895-low	5'- ACC CTT CTA CGG ACT CGT CT -3'		
HPV 16-up	5'- AGC AAC AGT TAC TGC GAC GT -3'	95 1', 60 1', 72 40'' 35 циклов	604
HPV 16-low	5'- CAG GTC TTC CAA AGT ACG AA -3'		
HPV 18-up	5'- CAA CAC GGC GAC CCT ACA AG -3'	95 1', 60 1', 72 40'' 35 циклов	713
HPV 18-low	5'- CAA CAC GGC GAC CCT ACA AG -3'		

Таблица 2.

Результаты выявления вирусов методом ПЦР на матрице ДНК, выделенной из парафиновых блоков

Вирусы	HCMV	EBV	HHV8	HPV	HCMV+EBV	Отсутствуют	Всего
Число пациентов	11	1	0	0	15	3	30
%	36,6	3,3	0,0	0,0	50,0	10,0	100

Таблица 3.

Результаты выявления вирусов методом гибридизации in situ

Вирусы и их сочетания	HCMV	EBV	HHV8	HPV	HCMV + EBV	HCMV + HHV8	HCMV + EBV + HHV8	HCMV + HHV8 + HPV	EBV + HHV8 + HPV	Все 4	Нет	Всего
Число пациентов	4	0	0	0	5	1	7	3	1	3	6	30
%	13,3	0,0	0,0	0,0	16,7	3,3	23,3	10,0	3,3	10,0	20,0	100

Таблица 4.

Сравнительные данные, выявляемости вирусов методами ПЦР и гибридизации in situ

Метод	Инфицированность вирусами (%)			
	HCMV	EBV	HHV8	HPV
ПЦР	87	53	0	0
ИСГ	77	54	50	23

и проведен ее анализ методом ПЦР с праймерами к последовательностям геномов следующих вирусов: HCMV, EBV, HHV8 и HPV 16-го и 18-го типов. Вирусные последовательности ДНК были обнаружены в ткани ПЖ у 27 пациентов из 30. Последовательности ДНК HCMV были обнаружены у 26 пациентов (87%), EBV—у 16 пациентов (53%), при этом в 15 из 16 случаев была выявлена одновременная инфицированность HCMV и EBV, и лишь образец ткани только одного пациента был ПЦР-положителен по EBV и ПЦР-отрицателен по HCMV. ДНК HHV8, HPV16 и HPV18 ни в одном из 30 образцов обнаружены не были (табл. 2).

Для той же выборки пациентов был проведен анализ инфицированности методом гибридизации *in situ*. Данные распределились следующим образом: HCMV был обнаружен у 23 пациентов (77%), EBV—у 16 (54%), HHV8—у 15 (50%), HPV (комплексный зонд для 16-го и 18-го типов)—у 7 (23%) (табл. 3). Вирусы оказались представлены в различных сочетаниях у разных пациентов: наличие всех 4 типов вирусов одновременно было выявлено лишь у 3 из 30 пациентов. Одновременная инфицированность 3 вирусами в разных сочетаниях была выявлена у 11-и пациентов. Одновременная инфицированность 2 вирусами была выявлена у 6-и пациентов: HCMV, EBV—5 пациентов, HCMV, HHV-8—1 пациент. У 4-х пациентов был выявлен только HCMV. В образцах ткани 6 пациентов вирусные ДНК обнаружены не были (см. табл. 3).

Как показано на примерах, приведённых на рисунке, ткани ПЖ у разных пациентов в исследуемой группе были как частично (отдельные единичные сигналы, группы сигналов), так и тотально инфицированы. Для всех вирусов гибридизационные сигналы выявлены как в железистом эпителии, так и в стромальных клетках, при этом инфицированными оказались не только опухолевые клетки, но и клетки прилегающей условно нормальной ткани.

Результаты исследования инфицированности значительно различаются в зависимости от применённого метода (табл. 4). Так, методом гибридизации *in situ* выявлено большее разнообразие вирусов (табл. 4), чем методом ПЦР (этим методом HHV8 и HPV не выявлены вообще). Причина таких различий может быть обусловлена спецификой каждого метода. Так, метод ПЦР чувствителен к повреждениям ДНК, которые неизбежно возникают при фиксации гистологических препаратов и загрязнению, которые могут сохраняться в ДНК после выделения из блоков. Этим можно объяснить отсутствие ПЦР-сигналов HHV8 и HPV. При обоих методах могут быть получены как ложноположительные,

так и ложноотрицательные результаты. В этом, вероятно, заключается причина и столь различных результатов, полученных другими исследователями [7]. Не исключено, что часть результатов, полученных нами, является ложноположительными, однако, одинаковая для двух разных методов тенденция в отношении частоты встречаемости HCMV и EBV, даёт возможность предполагать, что результаты отражают объективную картину.

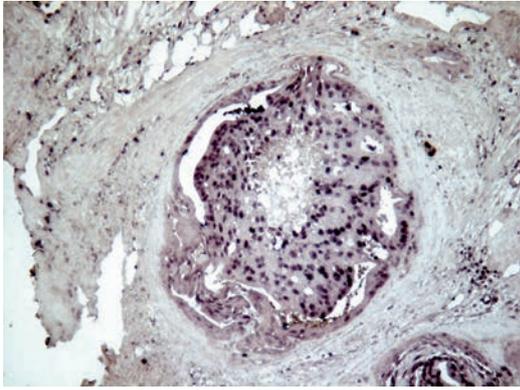
Чаще всего в исследованных нами препаратах ткани ПЖ у больных РПЖ встречается HCMV (77-87% по данным двух методов). Полученные высокие значения частоты встречаемости HCMV в ткани ПЖ близки значениям, полученным в 2-х из 6-ти похожих исследований—100% [5] и 40% [3] и в нашем более раннем исследовании—67,8% [2]. В остальных работах HCMV ПЖ у больных РПЖ не был обнаружен [7]. Данные, полученные нами по частоте встречаемости в ткани ПЖ EBV и HHV8 численно значительно превышают данные литературных источников [7]. В отношении EBV можно предположить, что значения инфицированности объективно отражают реальность для исследуемой группы пациентов, поскольку получены двумя разными методами. В отношении же полученных нами методом гибридизации *in situ* данных по инфицированности HHV8, сильно расходящихся как с данными литературы, так и с нашими результатами ПЦР, можно предположить, что часть из них является ложноположительными. Такое же предположение можно сделать и в отношении наших результатов по инфицированности HPV, хотя в литературе встречается очень широкий спектр значений инфицированности ткани ПЖ HPV при РПЖ (0–60%) [7].

В заключение следует сказать, что вопрос инфицированности ткани ПЖ у больных РПЖ различными вирусами требует дальнейшего изучения. Для получения объективной картины необходимо вести исследования различными взаимодополняющими методами в стандартных условиях.

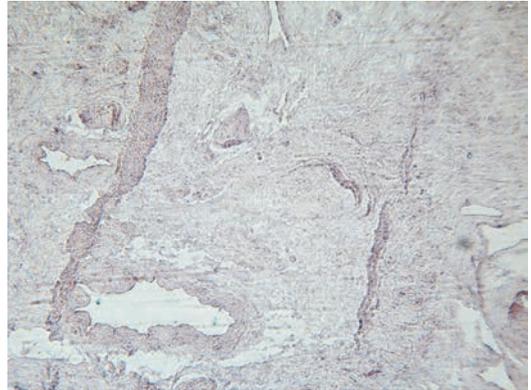
Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках реализации ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2007-2013 годы» с использованием оборудования ЦКП «Биотехнологический центр исследования экспрессии генома» в рамках государственных контрактов № 16.552.11.7021 и № 14.740.11.0011.

Литература

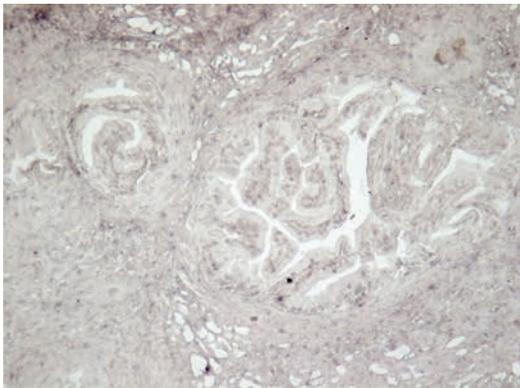
1. Евтушенко В. И., Школьник М. И., Андабеков Т. Т. Патент № 2351652 от 3 июля 2007 г.
2. Клочкова Т. Г., Андабеков Т. Т., Самсонов Р. Б. и др. Анализ инфицированности предстательной железы цитомегаловирусом у больных раком и доброкачественных гиперплазий простаты.



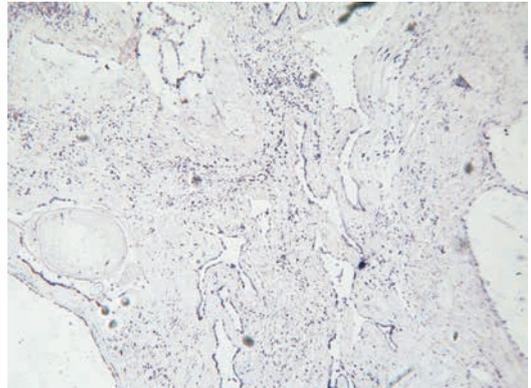
А HCMV



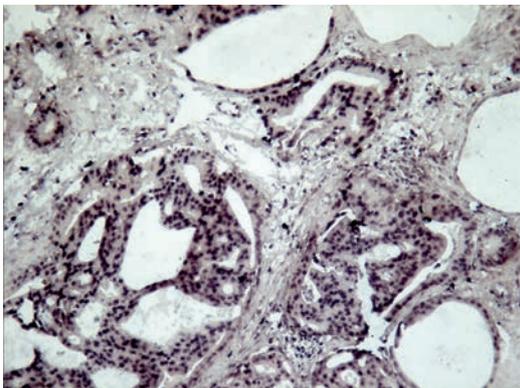
Б К-



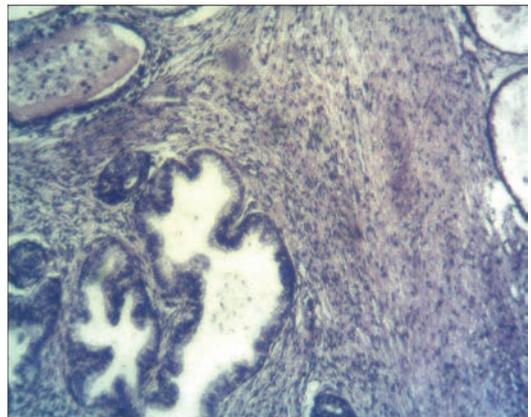
А К-



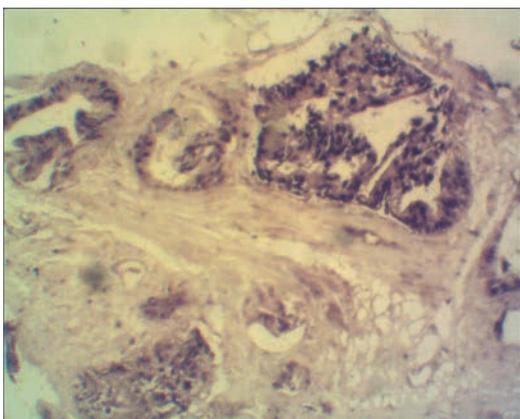
Б К+



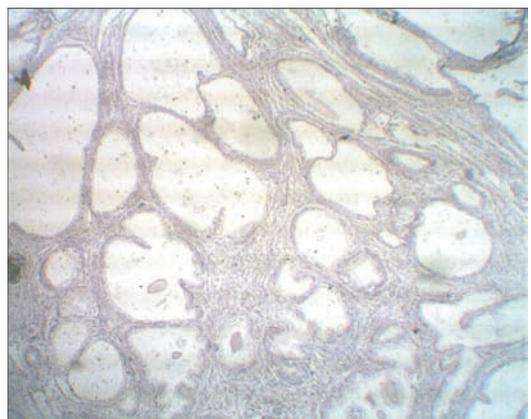
А К+



Б HHV8*

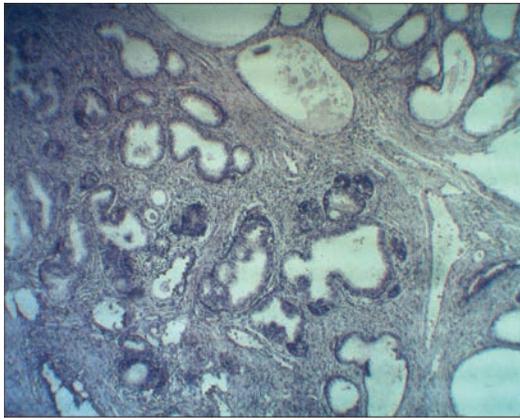


Б EBV

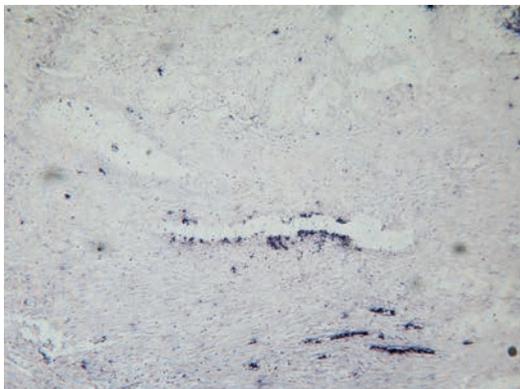


Б К-

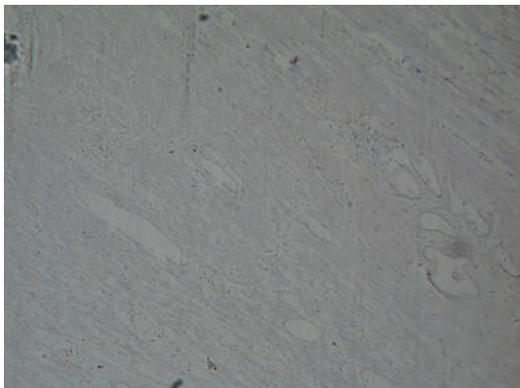
Рис. 1. Примеры результатов in situ гибридизации ядерной ДНК клеток ПЖ разных пациентов с вирусными зондами. Гибридизационные сигналы указаны стрелками. А – HCMV-зонд, многочисленные сигналы в клетках патологического эпителия, единичные сигналы в клетках стромы; Б – EBV-зонд, многочисленные сигналы в клетках нормального и патологического эпителия, единичные сигналы в клетках стромы; В- HHV8-зонд, многочисленные сигналы в клетках нормального и патологического эпителия и стромы; Г – HPV-зонд, немногочисленные сигналы в клетках нормального эпителия и стромы; К+ - положительный контроль (клонотекта фрагментов 4-й хромосомы человека), К- - отрицательный контроль (ДНК фага λ).



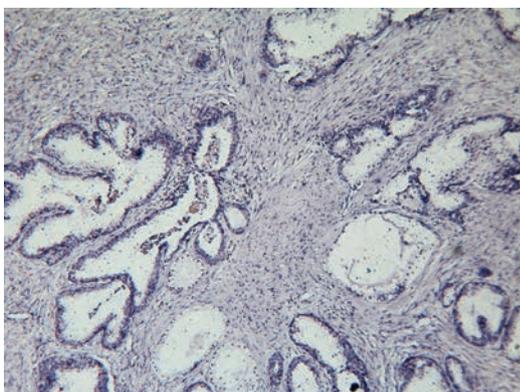
В К+



ГHPV



ГК-



ГК+

ственной гиперплазией простаты // Мед. акад. журн.- 2008.- Т. 8. - С. 64-70.

3. Boldogh I., Baskar J. F., Mar E. C. et al. Human cytomegalovirus and herpes simplex type 2 virus in normal and adenocarcinomatous prostate glands // J. Natl. Cancer Inst.- 1983.- Vol. 70.- P. 819-826.
4. Leskinen M. J., Vainionp R., Syrjnen S. et al. Herpes simplex virus, cytomegalovirus, and papillomavirus DNA are not found in patients with chronic pelvic pain syndrome undergoing radical prostatectomy for localized prostate cancer // Urology.-2003.-Vol. 61.-P. 397-401.
5. 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.
6. Silverman R. H., Nguyen C., Weight C. J., Klein E. A. The human retrovirus XMRV in prostate cancer and chronic fatigue syndrome // Nat. Rev. Urol.- 2010.- Vol. 7.- P. 392-402.
7. 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.
8. Sutcliffe S., Platz E. A. Inflammation and prostate cancer: A focus on infections // Curr. Urol. Rep.- 2008.- Vol. 9.- P. 243-249.
9. http://www.wcrf.org/cancer_facts/prostate-cancer-worldwide.php

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

INFECTION OF THE PROSTATE TISSUE OF THE PROSTATE CANCER PATIENTS BY THE HERPESVIRIDAE AND HPV

FSBI Russian Research Centre for Radiology and Surgical Technologies, St. Petersburg

The exploration of the presence of the HCMV, EBV, HHV8 and HPV-infection in the prostatic tissue of the prostate cancer patients was conducted. The methods of PCR and in situ hybridization (ISH) were used and the results were compared. Authors revealed high degree of virus infection in prostate. Using of PCR and ISH resulted in following frequencies of the viruses in prostate tissue: HCMV—87 and 77%, EBV—53 and 54%, HHV8—0 and 50%, HPV—0 and 23%. The question of the nature of discrepancies is discussed.