

Вирус папилломы человека как фактор риска при раке мочевого пузыря

Г.М. Волгарева¹, Г.А. Франк², Д.А. Головина¹, Л.Э. Завалишина², Ю.Ю. Андреева², А.В. Хачатурян³, Н.Л. Чебан³, В.Б. Матвеев³

¹ НИИ канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН

² Отделение патологической анатомии ФГУ МНИОИ им. П.А. Герцена

³ НИИ клинической онкологии РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, г. Москва

Онкоурология. – № 4, 2010

Представлен обзор литературы по проблеме возможного участия вируса папилломы человека в индукции рака мочевого пузыря (РМП). Суммированы результаты собственных исследований в этой области. Данные, полученные на клиническом материале и экспериментальных моделях *in vivo* и *in vitro*, свидетельствуют в пользу точки зрения, согласно которой вирус папилломы человека может участвовать в генезе РМП.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, вирус папилломы человека.

Вирусы папилломы человека (ВПЧ) типов высокого риска часто приводят к возникновению рака шейки матки (РШМ). Этиологически гетерогенными в плане участия ВПЧ являются карциномы некоторых других органов, таких как влагалище, вульва, половой член, ротоглотка, прямая кишка [1–3]. В каждом из этих органов, включая шейку матки, ВПЧ-положительный рак отличается от ВПЧ-отрицательного молекулярно-биологически, морфологически и клинически [4, 5].

Канцерогенность ВПЧ типов высокого риска обуславливают 2 вирусных гена Е6 и Е7, экспрессия которых признана необходимым и достаточным условием превращения зараженной ВПЧ клетки из нормальной в раковую. Вирусные онкобелки Е6 и Е7 способны взаимодействовать со многими клеточными белками, нарушая их нормальное функционирование. Среди активностей этих белков главным образом принято считать способность Е7 связываться с белком ретинобластомы рRb, а также способность Е6 взаимодействовать с белком р53. В результате оба этих клеточных белка-супрессора опухолевого роста инактивируются и распадаются. При этом нарушаются все подконтрольные им процессы, такие, как пролиферация, апоптоз, репарация, функционирование теломеразы и др. [1, 3].

Поскольку РШМ является вторым по частоте в мире онкологическим заболеванием женщин, поиском ранних диагностических маркеров этой формы рака занимаются многие группы исследователей. Накопленный при этом опыт после соответствующих проверок распространяют и на ВПЧ-ассоциированный рак других органов. При разработке маркеров РШМ попытки выявления ДНК ВПЧ высокого риска в полимеразной цепной реакции (ПЦР) не привели к созданию надежного теста: рак *in situ* и инвазивный РШМ развиваются лишь у незначительной части женщин, у которых выявлены ВПЧ-положительные дисплазии шейки матки [3]. Таким образом, вопреки высокой чувствительности ПЦР специфичность данного подхода оказалась низкой. Попытки усовершенствовать раннюю диагностику РШМ в настоящее время сосредоточены на поиске генов зараженной ВПЧ клетки-хозяина, экспрессия которых в дисплазиях и карциномах необратимо меняется под действием онкобелков вируса.

Одним из этих генов оказался INK4a. Он кодирует белок *p16^{INK4a}*, являющийся ингибитором циклин-Д-зависимых киназ Cdk 4/6. В зараженных ВПЧ типов высокого риска диспластических и раковых клетках эпителия шейки матки вследствие экспрессии вирусного онкобелка Е7 транскрипция INK4a многократно усиливается по сравнению с нормальным эпителием, при этом резко возрастает и содержание белка *p16^{INK4a}* [6]. Описанный феномен лег в основу иммуногистохимического теста, получившего широкое применение в ранней диагностике РШМ [7, 8]. В последнее время этот тест приобретает популярность и в диагностике ВПЧ-положительных опухолей других локализаций [9, 10].

Что касается рака мочевого пузыря (РМП), то в структуре онкологической заболеваемости в мире он занимает 7-е место. РМП составляет примерно 2–5% всех новообразований. Мужчины болеют РМП в 2,5–6 раз чаще женщин: ежегодно в мире регистрируется 260 тыс. новых случаев РМП у мужчин и 76 тыс. – у женщин. Характерно нарастание частоты заболевания с возрастом. Опухоли мочевого пузыря редко выявляют у людей моложе 35 лет, однако в последние годы карцинома мочевого пузыря все чаще встречается у молодых пациентов [11]. В связи с этим постоянно упоминается попытка анализа динамики молекулярных маркеров РМП, предпринятая скандинавскими исследователями [12]. Результаты данной работы свидетельствуют о том, что за 70 лет произошли существенные изменения молекулярного профиля заболевания. Это обстоятельство, возможно, отражает произошедшие за это время изменения в наборе факторов, причастных к этиологии РМП.

В России в структуре онкологической заболеваемости на долю РМП приходится 2,7%. За последние 10 лет отмечена устойчивая тенденция роста вновь выявленных случаев этого заболевания [13].

Возникновение РМП – многостадийный процесс, характеризующийся непредсказуемым течением. Известен ряд факторов, повышающих риск развития РМП [14–18]. К их числу относят географическое положение, в зависимости от которого частота возникновения РМП может варьировать 10-кратно; профессиональную деятельность – установлено около 40 потенциально опасных в плане развития РМП профессий (производство красителей, пластмасс, кожаное дело и др.); курение; характер питания и качество питьевой воды; применение определенных видов лекарств (фенацетин, циклофосфамид); паразитарное заболевание, вызываемое гельминтами из рода *Schistosoma*. Обсуждаются и другие факторы повышенного риска развития РМП: радиация, семейная предрасположенность, ВПЧ [3, 17, 19].

На возможность участия биологических факторов в возникновении РМП указывают результаты оценки онкологической заболеваемости, полученные в когортном исследовании, включавшем около 6000 больных, которым ранее

провели трансплантацию того или иного органа (почка, печень и др.) и которые в связи с трансплантацией получали иммуносупрессорные препараты [20]. Частота встречаемости РМП среди этих пациентов в 2–4 раза превысила ожидаемую на основании популяционных показателей. Для сравнения – формы карцином, в этиологии которых роль ВПЧ является доказанной, возникали у таких больных еще чаще. Так, частота развития карцином вульвы и влагалища в данной группе была повышена в 20 раз, анального рака и рака ротовой полости – в 10 и 5 раз соответственно.

Вопрос о том, принимают ли участие ВПЧ в уротелиальном онкогенезе, не является новым. Исторически одним из первых указаний на возможную связь РМП с ВПЧ стало то, что частота возникновения вторичного РМП, зарегистрированная у женщин с первичным РШМ, оказалась достоверно (в 5–6 раз) повышенной по сравнению с ожидаемой на основании популяционных данных [21–23]. Лишь позже, после того как в работах Н. zug Hauzenp и соавторов была доказана канцерогенность ВПЧ типов высокого риска для эпителия шейки матки [1, 2, 24], стала возможной интерпретация этого факта как свидетельства причастности именно ВПЧ к онкогенезу в мочевом пузыре. Однако окончательное истолкование этих данных в пользу ВПЧ как этиологического агента РМП остается затруднительным в силу того, что и РШМ, и РМП чаще развиваются у курящих женщин.

Еще одним указанием на возможность участия ВПЧ в злокачественном превращении клеток, выстилающих мочевой пузырь, стали сообщения о единичных больных с иммунодефицитами, у которых в доброкачественных или злокачественных новообразованиях мочевого пузыря была обнаружена ДНК ВПЧ [25–28].

Международной группой экспертов по ВПЧ было отобрано более 20 работ, посвященных выяснению роли ВПЧ в генезе РМП, которые были выполнены в 1991–2001 гг. в разных лабораториях мира. ДНК ВПЧ в образцах РМП авторы этих работ выявляли с помощью методов ПЦР, гибридизации *in situ* и/или блот-гибридизации по Саузерну. Доля ВПЧ-положительных образцов в данных сообщениях варьировала в пределах от 0 до 82,6%; закономерностей в колебаниях результатов в зависимости от использованного метода, типа РМП (переходноклеточный или плоскоклеточный), географического региона проследить не удалось. В итоге РМП был отнесен к той же категории опухолей, что и рак пищевода, легкого, грудной железы, яичников, предстательной железы, в возникновении которых роль ВПЧ остается неясной – *inadequate evidence* [3].

В последние годы появилось еще несколько сообщений, свидетельствующих о том, что вопрос о роли ВПЧ в этиологии РМП сохраняет свою актуальность [29–32].

Так, в 35,6% (21 из 59 изученных) образцов переходноклеточного РМП, полученных иранскими исследователями, была обнаружена ДНК ВПЧ [29]. Преобладающим типом вируса, выявленного у 17 (81%) из 21 больного, оказался 18-й, являющийся вторым по частоте встречаемости после ВПЧ-16 этиологическим агентом РШМ. Примером положительного контроля послужили образцы ткани мочевого пузыря, полученные от 20 неонкологических больных: ДНК ВПЧ-18 в контрольной группе была обнаружена в 1 (5%) случае (у больного с тяжелым циститом, не исключаяющим, по мнению авторов, наличия предраковых изменений). Авторы считают, что ВПЧ в Иране может играть роль причинного фактора в возникновении РМП.

Сходной точки зрения придерживается и исследовательская группа из Нидерландов [30]. В ходе изучения ма-

териалов, полученных от 107 больных РМП, эти авторы выявили ДНК ВПЧ различных типов в образцах РМП у 15,2% больных, а ДНК типов высокого риска – в 8,1% случаев. От стадии к стадии (Т₀, Т₁ и Т₂–Т₄) частота получения образцов РМП, положительных по ДНК ВПЧ типов высокого риска, возрастала: 0, 12,5 и 18,2% соответственно.

Н. Yang и соавторы представили данные, подтвержденные спустя год другой группой авторов из Египта – А. Helal Tel и соавторы [32]. При проведении анализа 64 шистозомоз-ассоциированных образцов РМП, ДНК ВПЧ-16/18 эти исследователи обнаружили только в 1 (при плоскоклеточном раке *in situ*). В данной работе был использован значительно менее чувствительный метод детекции ДНК ВПЧ, чем в исследовании Н. Yang и соавторов – гибридизация *in situ*, чем, по-видимому, и объясняется наличие такого контраста между результатами А. Helal Tel и соавторы, с одной стороны, и Н. Yang и соавторы – с другой. В общей сложности А. Helal Tel и соавторы изучили 114 образцов РМП (67 – переходноклеточного, 32 – плоскоклеточного, 15 – прочих карцином), среди которых упомянутый ВПЧ-положительный образец оказался единственным. Авторы пришли к заключению, что в Египте ВПЧ в патогенезе РМП, по-видимому, роли не играет.

Результаты последних двух работ и сделанные их авторами взаимоисключающие выводы могут расцениваться как предупреждение против поспешных заключений, которые могут иметь место при решении вопроса о роли ВПЧ в генезе РМП. Существенным является тот факт, что именно результат Н. Yang и соавторы недавно получил подтверждение в работе еще одной египетской исследовательской группы – Н. Badawi и соавторы [33]. Этими авторами с помощью метода ПЦР ДНК ВПЧ типов высокого риска (16, 18, 52) в образцах РМП были верифицированы достоверно чаще, чем в данных, полученных при выполнении биопсии мочевого пузыря у больных циститом. Имело место полное совпадение результатов ПЦР с данными анализа сыворотки крови больных ВПЧ-16-положительным РМП на присутствие антител к белку L1 вируса. Установлена связь между ВПЧ-положительным ответом у пациентов с РМП и склонностью заболевания к развитию рецидива. Авторы считают, что в генезе РМП ВПЧ оказывают синергическое действие наряду с другими факторами риска, одним из которых мог быть шистозомоз мочевого пузыря, также часто встречающийся у обследованной группы пациентов. Для оптимизации лечения больных РМП и дальнейшего наблюдения за ними авторы рекомендуют использование теста на антитела к L1.

Таким образом, знакомство с проблемой свидетельствует о ее сложности. По этой причине возникают следующие вопросы.

- Каковы источники противоречивости данных разных авторов относительно возможной роли ВПЧ в возникновении РМП? Можно ли в связи с этим оптимизировать собственное исследование?
- Обнаруживаются ли ВПЧ в образцах уротелиальных дисплазий и карцином, полученных от российских больных?
- Предпринимались ли попытки исследовать роль ВПЧ в уротелиальном канцерогенезе на экспериментальных моделях?
- Если предположение о существовании ВПЧ-ассоциированного РМП в медицинской науке получит подтверждение, что это может дать практической онкоурологии?

Каковы источники противоречивости данных разных авторов относительно возможной роли ВПЧ в возникновении РМП? Можно ли в связи с этим оптимизировать собственное исследование?

Вероятные источники неоднородности данных о роли ВПЧ в этиологии РМП исследователи традиционно относят к одной из 2 категорий:

- 1) объективная этногеографическая неоднородность РМП;
- 2) методические особенности работ, посвященных детекции ВПЧ в клиническом материале, полученном от больных РМП.

В первом случае представляется очевидным наличие связи между состоянием выстилки экскреторного органа и такими факторами, как качество потребляемой воды, региональные и национальные особенности питания, эндемичные паразитарные заболевания мочевого пузыря. Любой из этих факторов может влиять и на частоту ассоциаций РМП с ВПЧ. Подтвердить этот тезис могло бы сравнение частоты развития ВПЧ-положительного РМП в разных регионах мира, проведенное одной и той же группой исследователей с использованием одних и тех же методов. Подобные работы, насколько нам известно, не проводились.

Вторая группа причин включает наличие малого числа образцов РМП в некоторых работах, использование единственного метода детекции вирусной ДНК в раковых клетках (чаще всего ПЦР или гибридизации *in situ*, где каждый из методов имеет и свои достоинства, и свои ограничения), обнаружение только 1-го или 2-го типов ВПЧ (обычно HPV-16 и 18, являющихся основными этиологическими агентами РШМ), что не исключает возможности участия в онкогенезе ВПЧ иных типов. Последнее подтверждают данные, полученные С. De Gaetani и соавторы [34], которые с помощью применения метода гибридизации *in situ* выявили ВПЧ с зондами к ДНК типов 31/33/35 в образцах РМП в 60% всех ВПЧ-положительных случаях, тогда как реакция с зондами к ДНК типов 16/18 была положительной только в 24% наблюдений.

Кроме того, в подавляющем большинстве работ, в которых была отмечена высокая частота обнаружения ДНК-ВПЧ-положительного РМП, не предпринималось попыток подтвердить наличие экспрессии вирусного генома, в частности экспрессии онкогенов E6 и E7 ВПЧ типов высокого риска. Следует отметить, что помимо лабораторной контаминации исследуемых образцов продуктами амплификации вирусного генома, которая в подобных исследованиях нередко дает ложноположительные результаты, при РМП не исключена также контаминация «внутри больного»: при возникновении инфекции ВПЧ соседних органов (вульва, половой член) случайное попадание одной или нескольких клеток из них в мочевой пузырь (с током крови во время операции, на наружной поверхности эндоскопа при выполнении цистоскопии и т.д.) может привести к получению ложноположительного результата как при скрининге ткани мочевого пузыря с помощью ПЦР на присутствие ДНК ВПЧ, так и при проверке экспрессии вирусных онкогенов на уровне мРНК методом ПЦР с обратной транскрипцией.

Таким образом, для изучения возможного участия ВПЧ в уротелиальном канцерогенезе целесообразно применять комплексный подход. Выявление генетического материала вируса желательнее проводить методами, дающими возможность обнаруживать не только ВПЧ-16 и 18, но и ВПЧ иных типов. Проверку экспрессии онкогенов E6 и E7 ВПЧ в ДНК ВПЧ-положительных образцах целесообразно осуществлять как на уровне мРНК E6/E7 с помощью метода ПЦР с

обратной транскрипцией, так и иммуногистохимически на уровне соответствующих онкобелков. У женщин, больных РМП, желательнее проверять наличие ВПЧ в эпителии шейки матки.

Обнаруживаются ли ВПЧ в образцах уротелиальных дисплазий и карцином, полученных от российских больных?

ДНК ВПЧ-16 и 18 была выявлена методом гибридизации *in situ* приблизительно в 50% дисплазий и карцином *in situ* мочевого пузыря [35]. Также осуществляли проверку тканей мочевого пузыря на присутствие ДНК ВПЧ иных типов (6, 11, 31, 33 и 51). Наличия генетического материала вирусов этих типов в мочевом пузыре не обнаружено.

Скрининг 130 образцов РМП, полученных от другой группы урологических больных, на присутствие в них ДНК ВПЧ был проведен нами с помощью нескольких версий ПЦР, включая ПЦР в режиме реального времени, с праймерами к генам L1, E6 и E7 ВПЧ [36–39]. Среди прочего были использованы и литературные, так называемые вырожденные праймеры GP5-6, позволяющие выявлять генетический материал ВПЧ различных, в том числе и не описанных до настоящего времени, типов. ДНК ВПЧ-16 обнаружена в 40% случаев. Методом ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени в части ДНК-ВПЧ-положительных случаев выявлена экспрессия генома ВПЧ-16 на уровне мРНК. С помощью применения иммуногистохимического метода подтверждено наличие экспрессии в опухолевых клетках больных РМП вирусного онкобелка E7 ВПЧ-16 [38, 40]. Образцы РМП, давшие положительную реакцию при окрашивании их поликлональной антисывороткой к E7 ВПЧ-16, разработанной S. Cheng и соавторами, окрашивали антителами к E6 и E7 ВПЧ-16 от Neodiagnostic [41]. Факт обнаружения онкобелка E7 ВПЧ-16 примерно в 30% образцов РМП свидетельствует о том, что ВПЧ-16 действительно играет какую-то роль в уротелиальном канцерогенезе у российских больных РМП. Вместе с тем в случае ВПЧ-ассоциированного канцерогенеза в эпителии мочевого пузыря, по-видимому, существуют и некоторые отличия от тех процессов, которые имеют место при возникновении РШМ. На это указывают следующие сделанные нами наблюдения.

Во-первых, наряду с образцами РМП, в которых вирусный онкобелок E7 выявляется, как и при РШМ, во всех опухолевых клетках, встречаются и образцы РМП, где он присутствует только в некоторых группах клеток или в отдельных клетках (так называемое фокальное окрашивание). Принципиально то, что для части таких образцов мы получили подтверждение экспрессии вирусного генома и на уровне мРНК методом ПЦР с обратной транскрипцией. В связи с этим необходимо отметить, что во всех случаях, когда в образце РМП имело место фокальное окрашивание E7 ВПЧ-16-специфичными антителами, оно наблюдалось именно в массиве опухолевых клеток, а не в виде так называемого краевого эффекта. Это дает основание исключать описанную выше возможность контаминации мочевого пузыря ВПЧ-положительными клетками другого органа «внутри больного». Фокальная экспрессия вирусного онкобелка E7 ВПЧ-16 в части образцов РМП в нашей работе хорошо согласуется с результатами С. de Gaetani и соавторов [34], полученными при осуществлении детекции ДНК ВПЧ в РМП методом гибридизации *in situ*. Эти исследователи располагали материалом нескольких биопсий, взятом от каждого из 10 больных РМП. Лишь в одном из 10 случаев однородные положительные результаты были получены при выполнении всех 5 биопсий из РМП 1 больного, в ос-

тальных 9 – только часть образцов оказывалась ДНК-ВПЧ-положительной.

Во-вторых, в случаях фокального окрашивания образца часть опухолевых клеток содержат белок E7 исключительно в цитоплазме, что дает основание усомниться в способности E7 связываться с ядерным белком pRb.

В-третьих, онкобелок E7 ВПЧ-16 был неожиданно обнаружен нами и в некоторых образцах морфологически нормального уротелия мочевого пузыря, полученных от пожилых больных, умерших от неонкологических заболеваний. Остается неясным, означают ли эти результаты, что «нормальный» уротелий мочевого пузыря был получен в этих случаях от лиц, не успевших дожить до возникновения своего ВПЧ-ассоциированного РМП.

Неожиданными оказались и результаты проведенного нами в 2009 г. повторного обследования больной рецидивирующим РМП. Ранее в первичной опухоли, удаленной у нее в 2004 г., были выявлены ДНК ВПЧ-16, мРНК, соответствующая онкогену E7, а также белок E7 (при окрашивании антителами 2 типов). Больная курила. Более 20 лет она проработала на химическом производстве, где контактировала с растворителями и анилиновыми красителями. В период с 2005 по 2008 г. у нее было зарегистрировано 3 рецидива заболевания. При очередном рецидиве, возникшем в 2009 г., ДНК ВПЧ в опухолевых клетках отсутствовала. Белок E7 ВПЧ-16 в клетках РМП также не выявлен. Больной проведено кольпоскопическое обследование шейки матки и проверено наличие у нее ДНК ВПЧ в клетках цервикального эпителия. Результаты обоих тестов свидетельствовали об отсутствии у пациентки ВПЧ в клетках эпителия шейки матки [42].

Еще один аспект предпринятого нами комплексного изучения роли ВПЧ в уротелиальном онкогенезе базировался на упомянутом выше феномене возникновения гиперэкспрессии p16^{INK4a} в клетках цервикального эпителия в случае наличия экспрессии в этих клетках вирусного онкобелка E7. С целью подтверждения факта присутствия экспрессии генома ВПЧ-16 в образцах РМП, в которых была обнаружена ДНК вируса, экспрессия клеточного гена INK4a была исследована нами на уровне мРНК и белка p16^{INK4a}. Работу проводили на 50 образцах РМП, в 12 из которых имела место экспрессия E7 ВПЧ-16 на уровне мРНК и/или белка, а также на образцах морфологически нормального уротелия мочевого пузыря, полученного от 5 из тех же больных РМП. Наличие гиперэкспрессии гена INK4a, кодирующего этот белок на уровне мРНК и белка p16^{INK4a}, наблюдалось в опухолевых клетках у части больных РМП, ассоциированных с ВПЧ-16. Однако, в отличие от РШМ, в уротелиальных карциномах существование данного феномена ни в одном случае не коррелировало с наличием экспрессии онкогена E7 ВПЧ-16 [43]. Тем не менее мы не расцениваем получение этого результата как повод для того, чтобы усомниться в роли ВПЧ в уротелиальном канцерогенезе. Дело в том, что, согласно данным литературы, факторы, определяющие экспрессию p16^{INK4a} в клетках РМП, могут принципиально отличаться от таковых в ВПЧ-положительном РШМ. Так, в РМП, в отличие от РШМ, ген INK4a часто подвергается делециям и точечным мутациям, а также метилируется в промоторной области [44–46]. Вследствие любого из перечисленных событий экспрессия INK4a на уровне белка может частично или полностью быть подавлена. Так, гомозиготные делеции гена INK4a, в результате возникновения которых клетка лишается возможности синтезировать p16^{INK4a}, обнаружены приблизительно в 30-50% образцов РМП [45,

46]. Таким образом, полученный нами результат можно рассматривать не как опровержение возможного участия ВПЧ в генезе РМП, а как указание на непригодность использования p16^{INK4a} в качестве маркера ВПЧ-ассоциированного уротелиального канцерогенеза.

В целом, результаты, полученные нами при изучении возможной роли ВПЧ в генезе РМП и основанные на клиническом материале российских больных, свидетельствуют о том, что генетический материал ВПЧ типов высокого риска может быть выявлен в разных выборках РМП с частотой до 40–50%. Наличие в опухолевых клетках ДНК ВПЧ нередко сопровождается развитием экспрессии вирусных онкогенов. Эти результаты согласуются с представлением, согласно которому ВПЧ могут принимать участие в инициации злокачественного перерождения клеток эпителия мочевого пузыря как сольно, так и в сочетании с другими факторами, в частности с влиянием химических канцерогенов. Вместе с тем имеются основания предполагать, что роль этих вирусов в уротелиальном канцерогенезе не полностью сходна с той ролью, которую они играют в генезе РШМ.

Предпринимались ли попытки исследовать роль ВПЧ в уротелиальном канцерогенезе на экспериментальных моделях?

Мочевой пузырь, так же как и другие органы мочевыводящей системы (почечные лоханки, мочеточники, мочеиспускательный канал), выстлан эпителием особого типа, так называемым переходным (е. *transitorium*, синоним – эпителий Генле [47]). В связи с этим вопрос о том, способны ли ВПЧ вызывать онкогенез в эпителии мочевого пузыря на экспериментальных моделях, представляет особый интерес.

In vivo эта проблема была изучена М. Кампо и соавторы [48, 49] на модели крупного рогатого скота. Участие бычьего папилломавируса (ВПБ-2) в генезе РМП авторы показали для условий как спонтанного, так и экспериментального заражения. Важной особенностью данной модели явилось то, что ВПБ-ассоциированный РМП чаще развивался у коров, в рационе которых в свежем или сушеном виде присутствовал папоротник орляк. Помимо РМП у таких коров очень часто имели место карциномы разных отделов пищеварительного тракта (ПТ). Оказалось, что орляк содержит ряд веществ, обладающих мутагенными, канцерогенными и иммуносупрессорными свойствами.

С учетом видоспецифичности канцерогенного действия вирусов папиллом полная экстраполяция результатов этих работ на ВПЧ и их возможное участие в уротелиальном онкогенезе Homo sapiens, очевидно, не вполне корректна. Есть, однако, косвенные указания на то, что экстраполяция является небезосновательной. Во-первых, среди различных гистологических типов РМП этими авторами зарегистрировано наличие у крупного рогатого скота значительной доли переходноклеточных карцином, составляющих подавляющую часть всех случаев РМП среди российских больных. Во-вторых, потребление людьми в пищу орляка, так же как и в случае крупного рогатого скота, способствовало развитию у них рака ПТ. ВПЧ-16 в соответствующих регионах, в частности, в Бразилии, был обнаружен в большинстве всех дисплазий и карцином пищевода. В-третьих, с помощью кверцетина – одного из мутагенов, содержащихся в орляке, была продемонстрирована трансактивация промотора ВПЧ-16. Таким образом, установлено, что некоторые формы рака человека, при которых в опухолевых клетках регулярно выявляются ВПЧ, в частности, рак верхних отделов ПТ, могут иметь этиологию, сходную с этиологией рака крупного рогатого скота [50] (цитируется по [49]).

Попытку ответить на вопрос о способности ВПЧ вызывать онкогенез уротелия *in vitro* предприняли С. Reznikoff и соавторы [51]. В клетки изогенных клонов, полученных из ткани слизистой оболочки мочеиспускательного канала человека, по отдельности или совместно они вводили гены Е6 и Е7 ВПЧ-16. Осуществление интеграции в геном клеток как Е6, так и Е7, вызвало их иммортализацию, такой же результат дало и совместное введение этих двух генов. Морфологические нарушения и нестабильность генома уротелиальных клеток оказались гораздо более выраженными в случае введения в них Е6, чем при трансформации их с помощью Е7 (при этом отмечено нарушение функций клеточных супрессоров опухолевого роста p53 и pRb соответственно). Совместное введение двух этих генов ВПЧ-16 приводило к возникновению изменений кариотипа и фенотипа клеток, которые оказались очень сходны с изменениями, вызываемыми введением Е6. Наряду со случайными нарушениями кариотипа, сопровождавшими трансформацию клеток, были зафиксированы и перестройки клоновой природы: амплификация района 20q – при трансформации с помощью Е7 и утрата районов 3p, 6q и 9p – при трансформации с помощью Е6. Ни при одном из трансформированных этими вирусными онкогенами вместе и/или по отдельности клеточных клонов не наблюдалось развития опухоли в ходе осуществления попытки привить их бестимусным мышам на 25-м пассаже культивирования *in vitro*. С учетом большого сходства аномалий кариотипа в клетках трансформированных клонов с аномалиями, которые другие исследователи находили в клиническом материале, полученном от больных РМП, авторы пришли к заключению, что описанные ими явления могут соответствовать начальной стадии онкогенеза в уротелии *in vivo*.

Таким образом, результаты, полученные на экспериментальных моделях, свидетельствуют о том, что нет достаточных оснований для исключения папилломавирусов из перечня потенциальных участников онкогенеза в уротелии мочевого пузыря у *Номо sapiens*.

Если предположение о существовании ВПЧ-ассоциированного РМП в медицинской науке получит подтверждение, что это может дать практической онкоурологии?

В случае подтверждения данного предположения откроется новая перспектива для профилактики РМП. С учетом того что разработаны эффективные вакцины для профилактики РШМ, с одной стороны, а также того, что РМП является преимущественно «мужским» видом рака, с другой, таким направлением могло бы стать введение этих вакцин не только девочкам, но и мальчикам [2]. Примечательно, что при обсуждении вопроса о целесообразности осуществления вакцинации мальчиков (а обсуждение это пока ведется исключительно в плане повышения надежности профилактики РШМ у их будущих жен) в странах с ограниченным бюджетным финансированием здравоохранения вопрос этот неизменно решается отрицательно. Что же касается РМП у женщин, то информация о возможности предупреждения с помощью применения профилактической ВПЧ-вакцины не только РШМ, но также и других ВПЧ-ассоциированных форм рака, в том числе РМП, могла бы стать дополнительным аргументом в пользу проведения вакцинации девочек.

Знание о существовании ВПЧ-ассоциированного РМП должно заострить внимание как клиницистов, так и экспериментаторов на уяснении возможных путей попадания ВПЧ в клетки эпителия мочевого пузыря человека. Это также должно стать основанием для дополнения принятых ны-

не методов предоперационного обследования больных РМП проведением тестов на наличие у них аногенитальных ВПЧ и постановки вопроса о безопасности использования цистоскопа и катетера при лечении тех пациентов с РМП, у которых имеют место аногенитальные ВПЧ-инфекции.

Несмотря на то что вопрос об участии ВПЧ в возникновении РМП пока остается открытым, несколько групп исследователей попытались получить ответ на другой, близкий к нему, вопрос: влияет ли на характер течения РМП обнаружение генетического материала папилломавирусов в клетках уротелия мочевого пузыря?

Так, Ю.Ю. Андреева и соавторы [52] выяснили, влияет ли ВПЧ мочевого пузыря на частоту рецидивирования РМП. Из общей группы пациентов с поверхностным РМП (стадии Та и Т1) было отобрано 44 образца по признаку наличия в них койлоцитов – косвенного доказательства существования вирусной инфекции. Данные образцы разделили на 3 группы: 16 – полученные от больных с высоким, 13 – средним и 15 – низким риском рецидивирования. ДНК ВПЧ-16 и 18 была обнаружена с помощью метода гибридизации *in situ* на гистологических срезах только в материалах, полученных от больных со средним и высоким риском рецидивирования РМП. В последнем случае у 7 (44%) из 16 пациентов в раковых клетках установлено наличие ДНК ВПЧ-16. В группе со средним риском рецидивирования у 3 (23%) больных выявлен генетический материал ВПЧ-18, тогда как наличия ВПЧ-16 у этих пациентов не обнаружено. Полученные результаты послужили основанием для заключения, согласно которому присутствие в уротелиальных клетках ДНК ВПЧ с большой вероятностью повышает риск развития рецидива поверхностного РМП.

А. Lopes-Beltran и соавторы [53] исследовали влияние присутствия ДНК ВПЧ в раковых клетках на выживаемость больных РМП. Работа проведена в группе больных переходноклеточным РМП (n=76) без осуществления какого-либо предварительного их отбора. Методом ПЦР в материалах, полученных в ходе выполнения трансуретральной резекции (ТУР), определяли присутствие ДНК ВПЧ 6, 11, 16 и 18-го типов. В 7 (9,2%) случаях в клетках опухоли был обнаружен генетический материал ВПЧ-16, а у 1 из этих больных также имела место ДНК ВПЧ-6. Наличия ВПЧ 11-го и 18-го типов не зарегистрировано ни у одного пациента. Наблюдение за всеми больными проводили на протяжении 5 лет. Через 9–13 мес большинство (5 из 7) ВПЧ-положительных пациентов умерли. У всех умерших при поступлении в госпиталь был диагностирован РМП III степени анаплазии. У 2 ВПЧ-положительных больных, проживших 5 лет после осуществления ТУР и не имевших через 5 лет признаков заболевания, на момент проведения операции были верифицированы карциномы I степени анаплазии. Итоговые показатели 5-летней выживаемости, полученные среди ВПЧ-положительных (2 из 7; 28,6%) и ВПЧ-отрицательных (52 из 69; 75,4%) пациентов, позволили исследователям сделать вывод о том, что присутствие ДНК ВПЧ в раковых клетках является фактором прогноза выживаемости при РМП. С данными А. Lopes-Beltran и соавторов хорошо согласуются результаты исследования, проведенного С. de Gaetani и соавторами [34]. При проведении детекции ДНК ВПЧ в клетках 43 образцов РМП методом гибридизации *in situ* эти авторы обнаружили ее в 17 случаях (с зондами к типам 16/18 или 31/33/35). Подтверждением того, что присутствие в РМП генетического материала ВПЧ является отрицательным фактором прогноза заболевания, служат следующие результаты: при среднем времени наблюдения за больными, равном 72 мес, среди

17 ВПЧ-положительных умерли 10 (59%), а среди 26 ВПЧ-отрицательных – 5 (20%) пациентов.

То обстоятельство, что, по-видимому, существуют различия в клиническом течении заболевания у пациентов с ВПЧ-отрицательным и ВПЧ-положительным РМП, делает актуальными проведение их дифференциальной диагностики и разработку соответствующих маркеров.

Признание существования ВПЧ-ассоциированного РМП в недалекой перспективе, возможно, позволит дополнить существующие методы лечения РМП введением в мочевой пузырь больных с ВПЧ-положительным РМП низкомолекулярных химических соединений, ингибирующих экспрессию онкогенов ВПЧ. Первые результаты успешных испытаний использования таких соединений, полученные на экспериментальных моделях, были представлены на 25-й Международной конференции по папилломавирусам [54].

В целом, признание того факта, что ВПЧ-ассоциированный РМП все-таки существует, позволит предложить применение дополнительного комплекса мер для профилактики этого заболевания. Знание о том, что конкретный случай заболевания РМП может быть ВПЧ-ассоциированным и что от этого зависит прогноз (подверженность рака рецидивированию, вероятность развития летального исхода) заболевания, ставит на повестку дня вопросы о выработке оптимальных подходов и определении маркеров для осуществления дифференциальной диагностики такого РМП. В недалеком будущем, очевидно, появятся химические препараты, с помощью которых станет возможным более эффективное лечение этих больных.

Заключение

Вопрос о возможном участии папилломавирусов в злокачественном перерождении клеток уротелия мочевого пузыря человека остается открытым. В комплексном исследовании, проведенном на клиническом материале, полученном от российских больных, с использованием различных методов выявления ДНК ВПЧ (гибридизация *in situ*, ПЦР с несколькими типами праймеров) на нескольких выборках образцов дисплазий и РМП, частота выявления нами ВПЧ-положительных случаев составила 40–50%. Для многих образцов это сопровождалось наличием экспрессии вирусных онкогенов E6 и E7 на уровне мРНК и/или белка. Так, вирусный онкобелок E7 ВПЧ-16, известный своей способностью нарушать функционирование белка ретинобластомы pRb (в результате чего клетка бесконтрольно переходит из стадии G₁ клеточного цикла в стадию S), был обнаружен нами в каждом третьем образце РМП, в котором определялась ДНК ВПЧ-16. Результаты других исследователей, полученные на клиническом материале и экспериментальных моделях *in vivo* и *in vitro*, также свидетельствуют в пользу точки зрения, согласно которой ВПЧ могут участвовать в генезе РМП. Имеется ряд указаний на то, что роль ВПЧ в уротелиальном онкогенезе может отличаться от роли этих вирусов в генезе РШМ. Наиболее вероятной представляется их роль в инициации процесса в условиях совместного с другими агентами (паразитические гельминты, иммуносупрессоры, промышленные вредные вещества, компоненты табачного дыма) воздействия на клетки эпителия мочевого пузыря. Знания о том, что у некоторых больных РМП ВПЧ принимают участие в уротелиальном онкогенезе, могут быть полезны при проведении профилактики заболевания, прогнозировании его течения и в перспективе – при лечении ВПЧ-ассоциированного РМП.

Human papillomavirus as a risk factor for bladder cancer

G.M. Volgareva, G.A. Frank, D.A. Golovina,
L.E. Zavalishina, Yu.Yu. Andreyeva,
A.V. Khachatryan, N.L. Cheban, V.B. Matveev

The paper reviews the data available in the literature on the possible involvement of human papillomavirus in the induction of bladder cancer (BC). The results of the authors studies in this area are summarized. The data obtained in clinical and experimental studies in vivo and in vitro count in favor of the idea that human papillomavirus may be implicated in the genesis of BC.

Key words: bladder cancer, human papillomavirus.

ЛИТЕРАТУРА

- Zur Hauzen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:690–8.
- Zur Hauzen H. Papillomaviruses – to vaccination and beyond. *Biochemistry* 2008;73(5): 498–505.
- IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Human papillomaviruses. Lyon, 2007. Available from: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol90/index.php>
- Morrison C., Catania F., Wakely P.Jr., Nuovo G.J. Highly differentiated keratinizing squamous cell cancer of the cervix. A rare, locally aggressive tumor not associated with human papillomavirus or squamous intraepithelial lesions. *Am J Surg Path* 2001;25:1310–5.
- Gillison M.L., Shah K.V. Role of mucosal human papillomavirus in non-genital cancers. *J Natl Cancer Inst Monograph* 2003;31(9): 57–65.
- Волгарева Г.М., Завалишина Л.Э., Андреева Ю.Ю. и др. Гиперэкспрессия клеточного белка p16INK4a в эпителиальных злокачественных опухолях, индуцированных вирусами папиллом человека. *Обзор. Арх патол* 2008;70(5): 57–61.
- Klaes R., Fridrich T., Spitkovsky D. et al. Overexpression of p16 (INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001;92:276–84.
- Volgareva G., Zavalishina L., Andreeva Y. et al. Protein p16 as a marker of dysplastic and neoplastic alterations in cervical epithelial cells. *BMC Cancer*, 2004. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC517716/>
- Begum S., Gillison M.L., Nikol T.L., Westra W.H. Detection of human papillomavirus-16 in fine-needle aspirates to determine tumor origin in patients with metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2007;13(4):1186–91.
- Kim S.H., Koo B.S., Kang S. et al. HPV integration begins in the tonsillar crypt and leads to the alteration of p16, EGFR and c-myc during tumor formation. *Int J Cancer* 2007;120:1418–25.
- Parkin D.M., Whelan S.L., Ferlay J. et al. Cancer incidence in five continents. Vol. VIII. Lyon: IARC Press, 2002; p.705–71.
- Littlekalsoy J., Vatne V., Hostmark J.G., Laerum O.D. Immunohistochemical markers in urinary bladder carcinomas from paraffin-embedded archival tissue after storage for 5–70 years. *Br J Urol Int* 2007;99:1013–9.
- Злокачественные новообразования в России в 2007 г. (заболеваемость и смертность). Под ред. В.И. Чиссова, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М., 2009.
- Заридзе Д.Г., Некрасова Л.И., Басиева Т.Х. Факторы повышенного риска возникновения рака мочевого пузыря. *Вопр онкол* 1992;38 (7–9): 1066–73.
- Заридзе Д.Г. Эпидемиология и этиология злокачественных новообразований. Канцерогенез. Руководство. М.: Медицина, 2004; с. 29–85.
- Заридзе Д.Г. Профилактика рака. М.: ИМА–ПРЕСС, 2009.
- Матвеев Б.П. Статистика, эпидемиология и генетическая детерминация рака мочевого пузыря. В кн.: Клиническая онкоурология. Под ред. Б.П. Матвеева. М.: Вердана, 2003; с. 197–206.
- Dinney C.P.N., McConcey D.J., Millikan R.E. et al. Focus on bladder cancer. *Cancer Cell* 2004;6:111–6.
- Zur Hauzen H. Infection causing human cancer. WILEY-VCH Verlag GmbH&Co., KgaA, Weinheim, Germany, 2006; p.182–3.
- Adami J., Gabel H., Lindelof B. et al. Cancer risk following organ transplantation: a nationwide cohort study in Sweden. *Br J Cancer* 2003;89: 1221–7.
- Bailar J.C. The incidence of independent tumors among uterine cancer patients. *Cancer* 1963;16:842–53.

22. Newell G.R., Rawlings W., Kremenetz E.T., Roberts J.D. Multiple primary neoplasms in blacks compared to whites. III. Initial cancers at the female breast and uterus. *J Natl Cancer Inst* 1974;53:369–73.
23. Newell G.R., Kremenetz E.T., Roberts J.D. Excess occurrence of cancer of the oral cavity, lung, and bladder following cancer of the cervix. *Cancer* 1975;36: 2155–8.
24. Durst M., Gissmann L., Ikenberg H., zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:3812–5.
25. Querci della Rovere G., Oliver R.T., McCance D.J., Castro J.E. Development of bladder tumor containing HPV type 11 DNA after renal transplantation. *Br J Urol* 1988;62:36–8.
26. Del Mistro A., Koss L.G., Braunstein J. et al. Condyloma acuminata of the urinary bladder. Natural history, viral typing, and DNA content. *Am J Surg Pathol* 1988;12:205–12.
27. Kitamura T., Yogo Y., Ueki T. et al. Presence of human papillomavirus type 16 genome in bladder carcinoma in situ of a patient with mild immunodeficiency. *Cancer Res* 1988;48:7207–11.
28. Maloney K.E., Wiener J.S., Walther P.J. Oncogenic human papillomaviruses are rarely associated with squamous cell carcinoma of the bladder: evaluation by differential polymerase chain reaction. *J Urol* 1994;151:360–4.
29. Barghi M.R., Hajimohammadmehdiarbab A., Moghaddam S.M., Kazemi B. Correlation between human papillomavirus infection and bladder transitional cell carcinoma. *BMC Infect Dis* 2005;5:102. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1310619/>
30. Moonen P.M., Bakkens J.M., Kiemeny LA. et al. Human papilloma virus DNA and p53 mutation analysis on bladder washes in relation to clinical outcome of bladder cancer. *Eur Urol* 2007;52(2):468–9.
31. Yang H., Yang K., Khafagi A. et al. Sensitive detection of human papillomavirus in cervical, head/neck, and schistosomiasis-associated bladder malignancies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(21):7683–8.
32. Helal Tel A., Fadel M.T., El-Sayed N.K. Human papilloma virus and p53 expression in bladder cancer in Egypt: correlation to schistosomiasis and clinicopathologic factors. *Pathol Oncol Res* 2006;12(3):173–8.
33. Badawi H., Ahmed H., Ismail A. et al. Role of human papillomavirus types 16 and 52 in recurrent cystitis and urinary bladder cancer among Egyptian patients. *Medscape J Med* 2008;10:232. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2605136/>
34. De Gaetani C., Ferrari G., Righi E. et al. Detection of human papillomavirus DNA in urinary bladder carcinoma by in situ hybridization. *J Clin Pathol* 1999;52:103–6.
35. Франк Г.А., Завалишина Л.Э., Андреева Ю.Ю. Иммуногистохимическая характеристика и степень дифференцировки рака мочевого пузыря. *Арх патол* 2002;64(6):16–8.
36. Volgareva G., Zavalishina L., Golovina D. et al. In search of bladder cancer markers: are human papillomaviruses and cellular INK4a expression associated? In: Tumor markers research perspectives. G.A. Sinise ed. NY: Nova Science Publishers, 2007; p. 135–43.
37. Volgareva G.M., Kuevda D.A., Zavalishina L.E. et al. Human papillomaviruses: is bladder urothelium a target of their carcinogenic action? *World Cancer Congress UICC Geneva* 2008. *Int J Cancer* 2008; (Suppl):216.
38. Volgareva G., Trofimova O., Kuevda D. et al. HPV and urinary bladder cancer. 25-th International Papillomavirus Conference, Malmö, Sweden, May 2009. Abstract book; p. 18–42.
39. Trofimova O., Kuevda D., Shipulina O., Volgareva G. Development of HPV genotyping and expression methods and validation on group of urinary bladder cancer. 25-th International Papillomavirus Conference, Malmö, Sweden, May 2009. Abstract book; p.29–58.
40. Волгарева Г.М., Завалишина Л.Э., Головина Д.А. и др. Обнаружение онкобелка E7 HPV16 в раковом и нормальном уротелии мочевого пузыря. *Арх патол* 2009;71(1):29–30.
41. Cheng S., Hsiao L., Jung S., Volgareva G.M. Detection of HPV E6 and E7 oncoproteins in bladder cancers. 25-th International Papillomavirus Conference, Malmö, Sweden, May 2009. Abstract book; p. 14–9.
42. Волгарева Г.М., Завалишина Л.Э., Трофимова О.Б. и др. Причастны ли вирусы папиллом человека к возникновению рака мочевого пузыря? Описание клинического случая. *Арх патол* 2010;72 (3).
43. Волгарева Г.М., Завалишина Л.Э., Головина Д.А. и др. Экспрессия гена INK4a в клетках рака мочевого пузыря, ассоциированного с вирусом папиллом человека 16-го типа. *Бюлл экспер биол мед* 2010;149(2):204–8.
44. Ruas M., Peters G. The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta* 1998;1378:115–77.
45. Aveyard J.S., Knowles M.A. Measurement of relative copy number of CDKN2A/ARF and CDKN2B in bladder cancer by real-time quantitative PCR and multiplex ligation-dependent probe amplification *J Mol Diagnost* 2004;6(4):356–64.
46. Gallucci M., Vico E., Merola R. et al. Adverse genetic prognostic profiles define a poor outcome for cystectomy in bladder cancer. *Exp Mol Pathol* 2007;83:385–91.
47. Энциклопедический словарь медицинских терминов. – М.: Советская энциклопедия, 1984.
48. Campo M.S., Jarrett WE, Barron R. et al. Association of bovine papillomavirus type 2 and braken fern with bladder cancer in cattle. *Cancer Res* 1992;52:6898–904.
49. Campo M.S. Animal models of papillomavirus pathogenesis. *Virus Res* 2002;89:249–61.
50. Campo M.S., Beniston R.G., Connolly J.A., Grindlay G.J. Synergism between papillomavirus and braken fern in carcinogenesis of the upper gastrointestinal tract in cattle and humans: quercetin and cell transformation. In: Braken fern: toxicity, biology and control. Taylor J.A., Smith R.T. eds. Manchester, 1999; p. 116–22.
51. Reznikoff C.A., Belair C., Savelieva E. et al. Long-term genome stability and minimal genotypic and phenotypic alterations in HPV16 E7-, but not E6-, immortalized human uroepithelial cells. *Gen Dev* 1994;8: 2227–40.
52. Андреева Ю.Ю., Завалишина Л.Э., Морозов А.А. и др. Выявление ДНК вируса папилломы человека в поверхностной уротелиальной карциноме мочевого пузыря. *Онкоурология* 2008;(1):34–5.
53. Lopes-Beltran A., Escudero A.L., Vicioso L. et al. Human papillomavirus DNA as a factor determining the survival of bladder cancer patients. *Br J Cancer* 1996;73:124–7.
54. Hellner K., Baldwin A., Xian J. et al. PAK3 inhibitors identified by high-throughput-screening as therapeutics for HPV-associated cancers. 25-th International Papillomavirus Conference, Malmö, Sweden, May 2009. Abstract book: oral presentation O–09.05.