

Сочетанная вирусная инфекция при раке мочевого пузыря

И.В.Косова^{✉1,2}, О.Б.Лоран¹, Л.А.Синякова¹, Л.В.Гундорова², В.А.Косов³, И.Е.Погодина⁴, Д.Н.Колбасов²

¹ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России. 125993, Россия, Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1;

²ГБУЗ «Городская клиническая больница им. В.П.Демикова» Департамента здравоохранения г. Москвы. 109263, Россия, Москва, ул. Шкулева, д. 4;

³ГУ «Ками республиканский онкологический диспансер». 167904, Россия, Сыктывкар, п. Краснозатонский, Нювчимское ш., д. 46;

⁴БУЗ «Вологодская областная клиническая больница №2». 162602, Россия, Череповец, ул. Данилова, д. 15

✉kosovainga@mail.ru

В настоящее время активно обсуждается роль сочетанной вирусной инфекции в генезе различных онкологических заболеваний, таких как рак молочной железы, шейки матки, орофарингеальной локализации опухолевого процесса.

Цель исследования – выявление морфологических, иммуногистохимических особенностей опухоли мочевого пузыря на фоне сочетанной вирусной инфекции.

Материалы и методы. В пилотном исследовании проведено обследование и лечение 100 больных (72 мужчин и 28 женщин) в возрасте от 38 до 90 лет (средний возраст 65±10) с диагнозом «рак мочевого пузыря». Дополнительно выполнены молекулярно-генетические, иммуноферментные методы диагностики наличия вирусных инфекций (герпеса – вируса простого герпеса 1 и 2-го типа, цитомегаловируса – ЦМВ), вируса Эпштейна–Барр – ВЭБ, вируса папилломы человека – ВПЧ высокого онкогенного риска), морфологические (оценка лимфоцитарно-плазмочитарного инфильтрата, активности воспаления, цитопатических изменений), иммуногистохимические исследования (CD31, EGFR, Ki67, p63, p53, CD44, Vcl-2).

Результаты. Экспрессия EGFR у пациентов с наличием вирусных ДНК в опухолевой ткани коррелировала с наличием ВПЧ в опухоли (R=0,354, p=0,115), уровнем экспрессии p63 (R=0,707, p=0,182), p53 (R=0,499, p=0,025), Ki67 (R=0,747, p=0,05), а также уровнем анти-ВЭБ Ig-VCA (R=0,47, p=0,032). У пациентов с наличием ВЭБ в опухолевой ткани уровень экспрессии ростовых факторов коррелировал с уровнем противовирусных антител к ВЭБ анти-ВЭБ Ig-VCA (R=0,577, p=0,049), наличием койлоцитоза (R=0,368, p=0,24) и внутриядерных включений (R=0,485, p=0,11) как проявлений ВПЧ-инфекции. У пациентов с отсутствием вирусных ДНК имела место незначительная степень цитопатических изменений (2 балла: 10,3% vs 28,6%, p=0,046), тогда как при наличии вирусных ДНК степень этих изменений выше (3 балла: 27,6% vs 9,5% соответственно, p=0,06). Такая же тенденция прослеживается и в случае наличия внутриядерных включений (1 балл: 10,7% vs 28,6%, p=0,046; 2–3 балла: по 17,9% vs 9,5% и 11,9% соответственно). Получены высокие корреляционные связи между пролиферативной активностью и наличием ВПЧ высокого онкогенного риска в опухолевой ткани (R=0,706, p=0,05), койлоцитозом и факторами неоангиогенеза (R=0,576, p=0,008), маркерами пролиферации (R=0,408, p=0,316). Умеренные корреляционные связи были выявлены между наличием внутриядерных включений и ВЭБ в опухолевой ткани (R=0,303, p=0,04), койлоцитозом (R=0,411, p=0,005), очаговой гиперплазией (R=0,459, p=0,001), периваскулярной инфильтрацией (R=0,335, p=0,023). Наличие ЦМВ в опухолевой ткани коррелировало с очаговой гиперплазией в виде фолликулов (R=0,362, p=0,012), койлоцитозом (R=0,32, p=0,028), наличием лейкоцитов (R=0,439, p=0,012) и эозинофилов (R=0,439, p=0,012).

Заключение. Признаки сочетанной вирусной инфекции в той или иной степени определяются у пациентов как с наличием, так и отсутствием вирусных ДНК в опухолевой ткани, определенных методом полимеразной цепной реакции. Определяются корреляционные взаимосвязи между морфологическими, молекулярно-генетическими, иммуноферментными показателями наличия вирусной коинфекции у больных раком мочевого пузыря. Повышение пролиферативной активности, экспрессии факторов апоптоза, ростовых факторов у пациентов с наличием вирусных ДНК в опухолевой ткани свидетельствует о неблагоприятном течении опухолевого процесса.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, вирус Эпштейна–Барр, цитомегаловирус, вирусы простого герпеса 1 и 2-го типа, вирус папилломы человека высокого онкогенного риска, коинфекция, CD31, Ki67, EGFR, Vcl-2.

Для цитирования: Косова И.В., Лоран О.Б., Синякова Л.А. и др. Сочетанная вирусная инфекция при раке мочевого пузыря. Consilium Medicum. 2018; 20 (7): 30–36. DOI: 10.26442/2075-1753_2018.7.30-36

Original article

Comorbid viral infection in patients with bladder cancer

I.V.Kosova^{✉1,2}, O.B.Loran¹, L.A.Sinyakova¹, L.V.Gundorova², V.A.Kosov³, I.E.Pogodina⁴, D.N.Kolbasov²

¹Russian Medical Academy of Continuous Professional Education of the Ministry of Health of the Russian Federation. 125993, Russian Federation, Moscow, ul. Barrikadnaia, d. 2/1;

²V.P.Demikhov City Clinical Hospital of the Department of Health of Moscow. 109263, Russian Federation, Moscow, ul. Shkuleva, d. 4;

³Komi Republican Oncology Center. 167904, Russian Federation, Syktyvkar, p. Krasnozatonskij, Nyuvchimsкое sh., d. 46;

⁴Vologda Regional Clinical Hospital №2. 162602, Russian Federation, Cherepovets, ul. Danilova, d. 15

✉kosovainga@mail.ru

Abstract

The role of combined viral infection in the genesis of various cancers, such as breast cancer, cervical cancer, oropharyngeal localization of the tumor process is being actively discussed.

The aim of the study was to identify possible morphological, immunohistochemical features of the bladder tumor against the background of a combined viral infection. 100 patients (72 men and 28 women) aged 38 to 90 years (mean age 65±10) with a diagnosis of bladder cancer were examined and treated. In addition, molecular genetic, serological methods for the diagnosis of viral infections (herpes type 1 and 2, cytomegalovirus – CMV, Epstein–Barr virus – EBV, human papillomavirus – HPV of high oncogenic risk), morphological and immunohistochemical studies were performed. The indicators of proliferative activity, factors of angiogenesis, growth factors depending on the degree of anaplasia and the stage of the process are analyzed.

Results. The expression of EGFR in patients with the presence of viral DNA in tumor tissue correlated with the presence of HPV in the tumor (R=0.354, p=0.115), p63 (R=0.707, p=0.182), p53 (R=0.499, p=0.025), Ki67 (R=0.747, p=0.05) and also with the level of anti-EBV Ig-VCA (R=0.47, p=0.032). In patients with the presence of EBV in tumor tissue, expression of growth factors correlated with the level of anti-EBV Ig-VCA (R=0.577, p=0.049), the presence of coilocytosis

($R=0.368$, $p=0.24$) and intranuclear inclusions ($R=0.485$, $p=0.11$) as manifestations of HPV infection. In patients with no viral DNA there is a slight degree of cytopathic changes (2 points: 10.3% vs. 28.6%, $p=0.046$), whereas in the presence of viral DNA the degree of these changes is higher (3 points: 27.6% vs. 9.5% respectively, $p=0.06$). The same situation can be observed in the case of the presence of intra-nuclear inclusions (1 point: 10.7% vs. 28.6%, $p=0.046$; 2–3 points: 17.9% vs 9.5% and 11.9% respectively). High correlation links between proliferative activity and the presence of high oncogenic risk HPV in tumor tissue were obtained ($R=0.706$, $p=0.05$), koilocytosis and factors of angiogenesis ($R=0.576$, $p=0.008$) and markers of proliferation ($R=0.408$, $p=0.316$). Moderate correlations were found between the presence of intracardiac inclusions and the presence of EBV in tumor tissue ($R=0.303$, $p=0.04$), koilocytosis ($R=0.411$, $p=0.005$), focal hyperplasia ($R=0.459$, $p=0.001$), perivascular infiltration ($R=0.335$, $p=0.023$). The presence of CMV in tumor tissue was correlated with focal hyperplasia in the form of follicles ($R=0.362$, $p=0.012$), koilocytosis ($R=0.32$, $p=0.028$), the presence of leukocytes ($R=0.439$, $p=0.012$) and eosinophils ($R=0.439$, $p=0.012$).

Conclusion. The signs of a combined viral infection are to be determined both in patients with the presence and absence of viral DNA in the tumor tissue. Correlation interrelations between morphological, molecular genetic, immunoenzyme indicators of presence of virus co-infection in patients with bladder cancer are determined. Increased proliferative activity, expression of apoptosis factors, growth factors in patients with the presence of viral DNA in tumor tissue indicates an unfavorable course of the tumor process.

Key words: bladder cancer, Epstein–Barr virus, cytomegalovirus, herpes simplex viruses 1 and 2 type, human papillomavirus of high oncogenic risk, co-infection, CD31, Ki67, EGFR, Bcl-2.

For citation: Kosova I.V., Loran O.B., Sinyakova L.A. et al. Comorbid viral infection in patients with bladder cancer. Consilium Medicum. 2018; 20 (7): 30–36. DOI: 10.26442/2075-1753_2018.7.30-36

Введение

В основополагающей монографии, посвященной вирусному онкогенезу, «Infections causing human cancer» Н. zur Hausen говорит о том, что около 20% всех видов рака ассоциировано с тем или иным инфекционным агентом [1]. В настоящее время доказана роль вируса папилломы человека (ВПЧ) при плоскоклеточном раке шейки матки и верхних дыхательных путей, раке молочной железы, особенно у пациенток молодого возраста [2–5]. Некоторые авторы указывают на наличие у этой группы пациентов активной сексуальной жизни, заболеваний, передающихся половым путем, оральных контактов [5]. Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) является представителем онкогенных ДНК-содержащих вирусов. Диапазон онкологических заболеваний, ассоциированных с ним, постоянно растет. Доказано участие ВЭБ в развитии лимфомы Беркитта, назофарингеальной карциномы, волосатой лейкоплакии, рака желудка, рака молочной железы [6–10]. Онкомодулирующий эффект цитомегаловируса (ЦМВ) доказан при глиобластоме головного мозга [11]. Что касается вирусного канцерогенеза при раке мочевого пузыря, то в литературе крайне мало публикаций, посвященных этому вопросу [12–18]. При этом данные исследований противоречивы. В настоящее время активно обсуждается роль сочетанной вирусной инфекции в генезе различных онкологических заболеваний, таких как рак молочной железы, шейки матки, орофарингеальной локализации опухолевого процесса [19–24]. Указывается на способность одних вирусов потенцировать действие других, что увеличивает инвазивные свойства опухоли [20–24].

Материалы и методы

В пилотном исследовании проведены обследование и лечение 100 больных (72 мужчин и 28 женщин) в возрасте от 38 до 90 лет (средний возраст 65 ± 10), поступивших в стационар с направительным диагнозом «рак мочевого пузыря». Дополнительно к общепринятым методам обследования при раке мочевого пузыря взяты анализы крови на иммуноглобулин (Ig) G, M к герпесу (вирусу простого герпеса – ВПГ) 1 и 2-го типа, ЦМВ, ВЭБ. Ткань опухоли и моча взяты на полимеразную цепную реакцию (ПЦР) – диагностику наличия вирусов ВПГ 1 и 2-го типа, ВПЧ высокого онкогенного риска, ЦМВ, ВЭБ. Была произведена оценка воспалительной инфильтрации в опухолевой ткани и подлежащей строме у 70 из 100 больных. Полуколичественно – от 0 до 3 баллов (отсутствие, слабая, умеренная и выраженная степень) оценивались следующие признаки:

1. Лимфоцитарно-плазмочитарный инфильтрат:
 - а) в опухоли;
 - б) рассеянный в подлежащей строме;
 - в) периваскулярная инфильтрация;
 - г) очаговая гиперплазия лимфоидной ткани в виде лимфоидных фолликулов.

2. Активность воспаления:

- а) степень лейкоцитарного инфильтрата (количество полиморфно-ядерных лейкоцитов в 1 поле зрения микроскопа; ув. 40);
- б) степень эозинофильной инфильтрации.

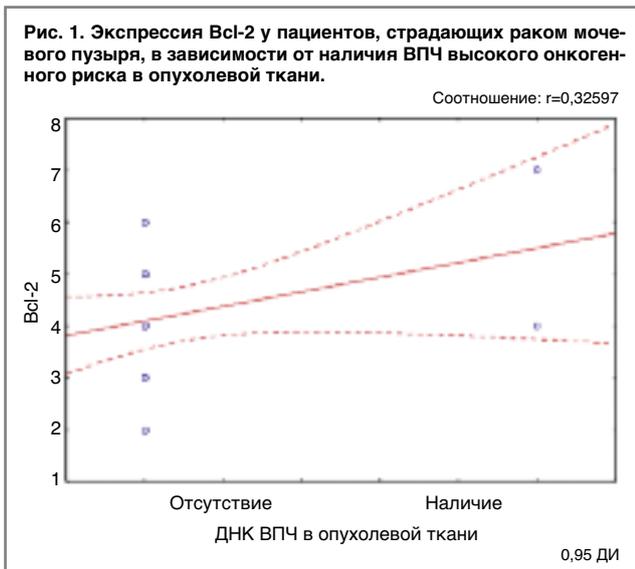
3. Цитопатические изменения:

- а) внутриклеточные включения (койлоцитоз);
- б) внутриядерные включения.

Мы провели исследование оценки маркеров пролиферации, ангиогенеза, апоптоза, ростовых факторов и маркеров адгезии у пациентов с наличием вирусных ДНК в опухолевой ткани мочевого пузыря. Материалом для иммуногистохимического исследования послужил биопсийный и операционный материал от 32 пациентов с верифицированной опухолью мочевого пузыря. Из них у 21 больного выявлено наличие вирусных ДНК в опухолевой ткани, в 11 случаях вирусных ДНК выявлено не было. Операционный материал фиксировался в 1% растворе нейтрального формалина и заливался в парафин. Срезы толщиной 5 мкм, окрашенные гематоксилин-эозином, были подвергнуты обзорному морфологическому анализу, при котором стадию рака определяли в соответствии с классификацией TNM, а степень дифференцировки опухолевых клеток оценивали в соответствии с рекомендациями Всемирной организации здравоохранения от 1973 г. Микроскопическое изучение препаратов проводилось с применением бинокулярного микроскопа с фотопроставкой Axio Zeis при 400-кратном увеличении. Иммуногистохимическое исследование проводилось на серийных парафиновых срезах 95 мкм, использовался стрептавидин-биотинный метод. В качестве детекционной системы использовалось 6 маркеров. Определялись следующие показатели:

- маркеры пролиферативной активности Ki67, p63;
- маркеры супрессора опухолевого роста Bcl-2, p53;
- маркер ангиогенеза CD31;
- маркер адгезии CD44;
- ростовый фактор EGFR.

Интенсивность реакций с антигенами, локализованными на мембранах клеток и внутриклеточных мембранах (CD44, CD31, EGFR и Bcl-2), оценивалась полуколичественным способом по балльной шкале от 0 до 3, учитывая выраженность реакции и ее локализацию: 0 – отсутствие реакции; 1 – слабая реакция; 2 – умеренная реакция; 3 – сильная реакция. Результаты реакции с антигенами, имеющими ядерную локализацию (Ki67, p63), оценивались по системе подсчета histochemical score, включающей в себя интенсивность иммуногистохимической окраски по 3-балльной шкале и долю (%) окрашенных клеток и представляющей сумму произведений процентов, отражающих долю клеток с различной интенсивностью окраски на балл, соответствующий интенсивности реакции. Интен-



сивность окраски: 0 – нет окрашивания; 1 – слабое окрашивание; 2 – умеренное окрашивание; 3 – сильное окрашивание.

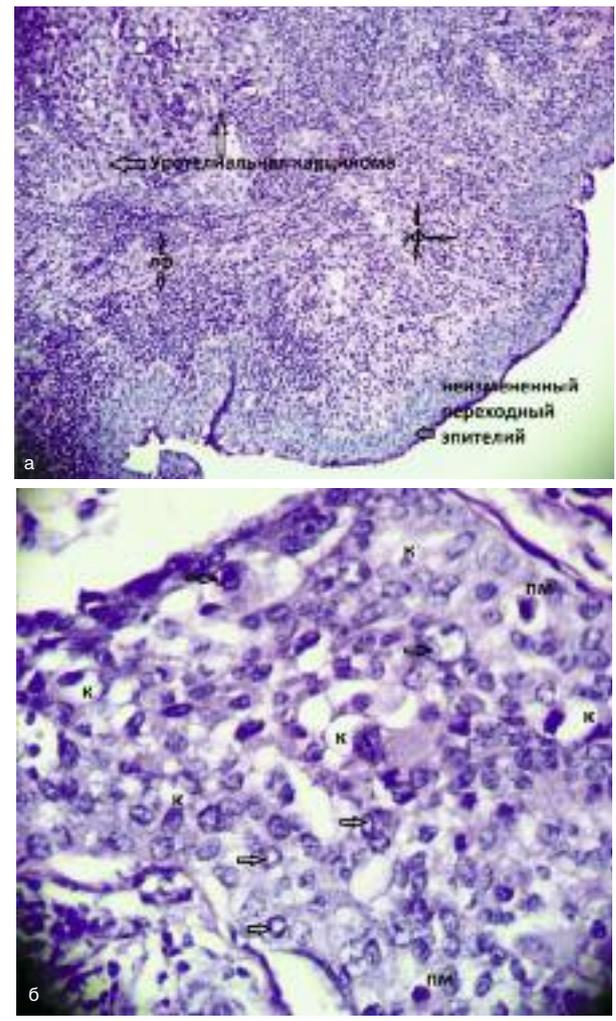
В работе использовались общепринятые методы статистической обработки данных: все числовые показатели проверялись на соответствие нормальному закону распределения с помощью критерия Лиллиефорса, определялись средние значения (M), стандартное отклонение (SD), ошибка среднего (m), 95% доверительный интервал (ДИ), частоты (%). Различия между количественными показателями осуществлялись с помощью t-критерия Стьюдента для независимых выборок или непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Различия между частотой признаков находились с помощью критерия χ^2 -квадрат, точечного критерия Фишера для малых выборок, для случаев частоты, равной 0 или 100%, использовался t-критерий Стьюдента для частот с поправкой на концевые точки. Для определения связи между изучаемыми параметрами применяли корреляционный анализ Пирсона (r) или Спирмена (R). Статистически значимыми принимались различия при $p < 0,05$.

Результаты

Стадия процесса соответствовала T1NxM0 у 51 больного, в одном случае имела место папиллома мочевого пузыря, T2NxM0 – у 25 больных, в 23% случаев выявлен местно-распространенный процесс. У 7 пациентов имело место лимфогенное метастазирование. Трансуретральная резекция стенки мочевого пузыря с опухолью выполнена 70 больным, 16 больным – радикальная цистэктомия с формированием гетеротопического резервуара (уретерокутанеостомией в двух случаях и ряде случаев с сигмостомией), 14 пациентам – резекция мочевого пузыря. Опухоль была рецидивная у 24 пациентов. Наличие вирусных ДНК в опухолевой ткани было выявлено у 34 пациентов (21 мужчины и 13 женщин). Инфицирование ткани ВЭБ имело место в 27 случаях, ЦМВ – в 6, у 5 больных – ВПЧ высокого онкогенного риска (16, 39, 45, 52, 59), в 1 случае выявлено наличие ВПГ 1, 2-го типа. ДНК нескольких вирусов (ВПЧ+ВЭБ, ВЭБ+ЦМВ, ЦМВ+ВЭБ+ВПЧ) была выявлена у 4 пациентов. Опухоли являлись низкодифференцированными в 56% случаев.

В нашем исследовании ВПЧ высокого онкогенного риска (16, 31, 45, 52, 59, 39-го типа) были выявлены у 8 больных. Пациенты эти были преимущественно «молодого» возраста, только 2 человека в возрасте 75 лет, остальные – от 46 до 66 (средний возраст 54,8 года). У 3 пациентов наличие ВПЧ сочеталось с наличием ВЭБ, в 1 случае – ЦМВ и ВЭБ. Начальная стадия заболевания имела место в 5 слу-

Рис. 3. Пациент П., 64 года, с ВЭБ+: а – фрагмент уротелиальной карциномы умеренной и низкой степени дифференцировки с выраженным смешанным воспалительным инфильтратом [(лимфоциты (ЛФ) + эозинофилы (ЭФ)] в строме, ув. Plan10/0.25(160/0.17); б – фрагмент уротелиальной карциномы с признаками внутриклеточной инфекции: выраженный койлоцитоз (К), признаки внутриядерных включений (отмечены стрелками). Выраженный клеточный полиморфизм и атипия: патологические митозы (ПМ), ув. Plan40/0.65(160/0.17).



чаях, в остальных – стадия болезни соответствовала T2-T3N0M0. В 1 случае выявлено множественное поражение мочевого пузыря, у 2 больных опухоли были рецидивны-

Рис. 4. Медиана показателей экспрессии Ki67 у пациентов, страдающих раком мочевого пузыря, с наличием и отсутствием ДНК ВЭБ и ВПЧ высокого онкогенного риска в опухолевой ткани.

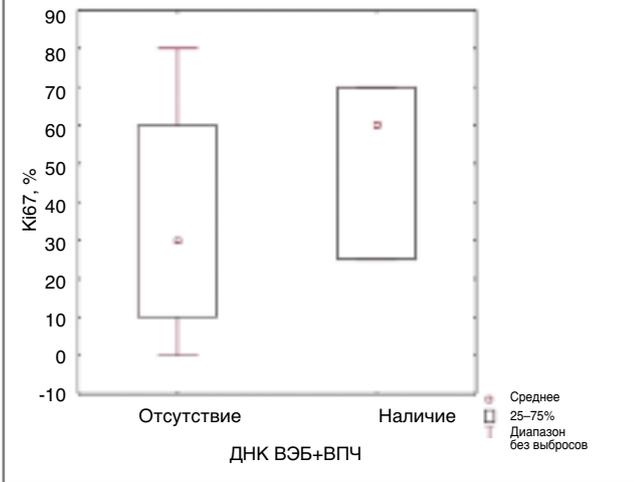


Рис. 5. Экспрессия Ki67 у пациентов, страдающих раком мочевого пузыря, с наличием и отсутствием ДНК ВЭБ и ВПЧ высокого онкогенного риска в опухолевой ткани в зависимости от степени анаплазии.

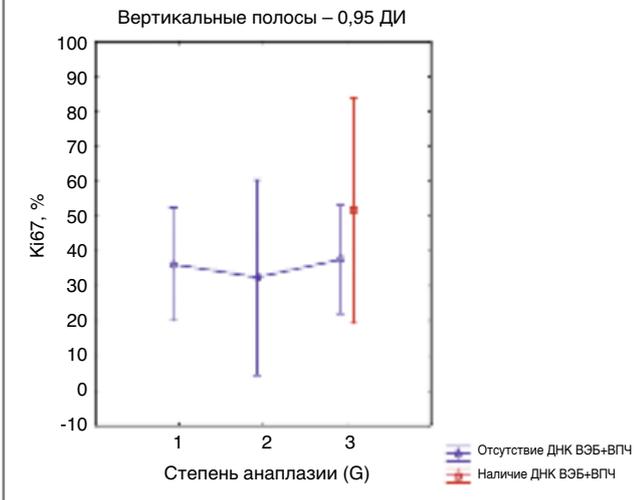
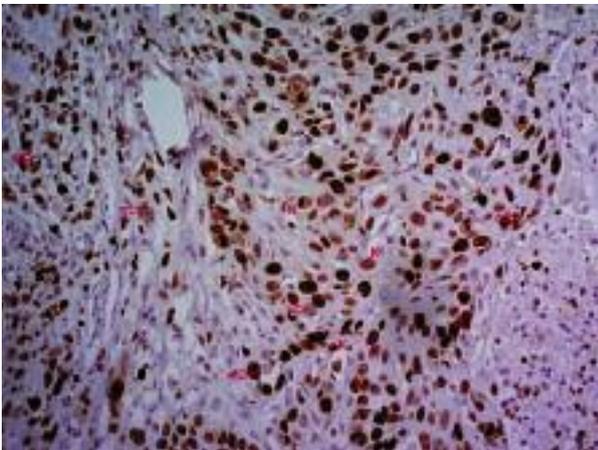
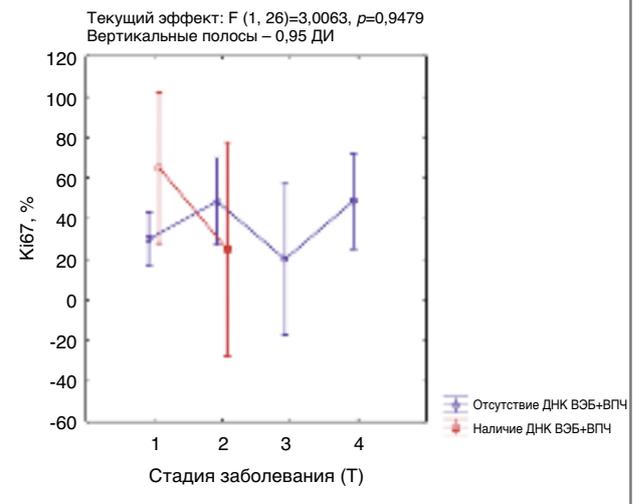


Рис. 6. Фрагмент уротелиальной карциномы с признаками низкой степени дифференцировки и высокой пролиферативной активности. Выраженная экспрессия Ki67 (более 80% клеток опухоли имеет интенсивное ядерное окрашивание). Признаки внутриклеточной инфекции: койлоцитоз (К), внутриядерные включения (обозначены стрелками); ув. 400.



ми. Низкодифференцированная опухоль выявлена в 50% случаев, в 1 случае имел место плоскоклеточный ороговевающий вариант рака мочевого пузыря. В соскобе из урет-

Рис. 7. Экспрессия Ki67 у пациентов, страдающих раком мочевого пузыря, с наличием и отсутствием ДНК ВЭБ и ВПЧ высокого онкогенного риска в опухолевой ткани в зависимости от степени анаплазии.



ры у 3 мужчин и 2 женщин выявлен такой же тип ВПЧ, как и в опухоли. Наличие ВПЧ высокого онкогенного риска в опухоли коррелировало с выявлением других вирусов в опухоли ($R=0,32$, $p=0,001$) и имела место обратная корреляция с наличием лимфоцитов ($R=-0,381$, $p=0,009$). Выделение ВПЧ в соскобе из уретры слабо коррелировало с наличием ВЭБ в опухоли ($R=0,189$, $p=0,038$) и наличием в ней других вирусов ($R=0,238$, $p=0,026$), хотя данные статистически достоверны.

У пациентов с наличием вирусных ДНК в опухолевой ткани мы выявили умеренные коррелятивные связи между наличием ВПЧ высокого онкогенного риска в опухолевой ткани и факторами апоптоза Bcl2 ($R=0,386$, $p=0,215$); рис. 1. Получены статистически достоверные высокие корреляционные связи между пролиферативной активностью и наличием ВПЧ высокого онкогенного риска в опухолевой ткани ($R=0,706$, $p=0,05$); рис. 2.

Несмотря на то, что сочетанная инфекция с ВПЧ была выявлена только в 4 случаях, мы проанализировали пролиферативную активность опухоли мочевого пузыря при коинфекции ВПЧ высокого онкогенного риска и ВЭБ. По данным разных авторов, герпес-вирусы могут участвовать в канцерогенезе как кофакторы развития неоплазий различных локализаций [21–24].

Мы приводим данные пациента П. 64 лет (рис. 3, а) с наличием низкодифференцированной мышечно-инвазивной уротелиальной карциномы pT3N1M0 и сочетанной вирусной инфекции: положительным ВЭБ- и ЦМВ-инфекции в ткани опухоли методом ПЦР. Однако при морфологическом исследовании, несмотря на отсутствие ВПЧ в опухолевой ткани, методом ПЦР выявлены признаки как герпес-вирусной инфекции, так и ВПЧ (наличие койлоцитоза и внутриядерных включений). Препараты рассмотрены при разном увеличении.

По нашим данным, медиана показателей пролиферативной активности клеток опухоли мочевого пузыря выше при наличии сочетанной вирусной инфекции (рис. 4). Следует отметить, что сочетанная вирусная инфекция имела место у пациентов с низкодифференцированными формами рака мочевого пузыря, при этом экспрессия Ki67 выше опять же у пациентов с наличием именно коинфекции с ВЭБ (рис. 5, 6).

Несмотря на то, что сочетанная инфекция чаще встречалась у пациентов с начальными стадиями заболевания, экспрессия Ki67 была выше у пациентов с мышечно-неинвазивным раком при наличии сочетанной инфекции (рис. 7). На наш взгляд, это может свидетельствовать о появлении

Рис. 8. Экспрессия CD31 (общее число сосудов) у пациентов, страдающих раком мочевого пузыря, с наличием и отсутствием ДНК ВЭБ и ВПЧ высокого онкогенного риска в опухолевой ткани.

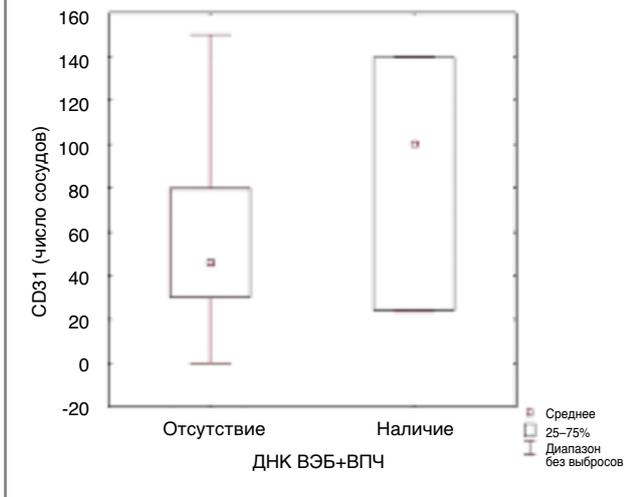
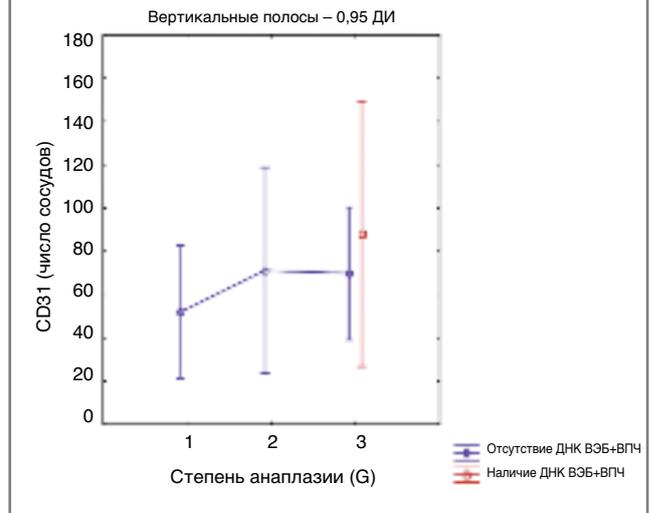


Рис. 9. Экспрессия CD31 (общее число сосудов) у пациентов, страдающих раком мочевого пузыря, с наличием и отсутствием ДНК ВЭБ и ВПЧ высокого онкогенного риска в опухолевой ткани в зависимости от степени анаплазии.



пролиферативной активности на этапе «премалигнизации», что, в свою очередь, способствует развитию неоплазий мочевого пузыря.

Подобные данные были получены при исследовании сосудистого компонента опухолевой ткани (рис. 8, 9). Подсчитывались сосуды опухолевой ткани с окрашенным эндотелием, ув. 100 (Plan10/0.25(160/0.17), в нескольких полях зрения подсчитывалось число окрашенных сосудов (общее число сосудов) и вычислялся процент по отношению ко всей исследуемой площади опухоли (соотношение числа сосудов к проценту площади опухоли). Экспрессия CD31 как такового, так и в зависимости от степени анаплазии была выше у пациентов с сочетанной коинфекцией, чем в ее отсутствие.

Считается, что ВЭБ предрасполагает клетки, в частности молочной железы, к малигнизации через активацию HER2/HER3-сигнальных каскадов [22, 23]. HER2/HER3 – это мембранный белок, тирозинкиназа семейства рецептора эпидермального фактора роста EGFR/ErbB [25]. Мы исследовали экспрессию EGFR у больных раком мочевого пузыря. Были выявлены умеренные и высокие коррелятивные связи между уровнем экспрессии EGFR у пациентов с наличием вирусных ДНК в опухолевой ткани и наличием ВПЧ в опухоли ($R=0,354$, $p=0,115$), уровнем экспрессии p63 ($R=0,707$, $p=0,182$), p53 ($R=0,499$, $p=0,025$), Ki67 ($R=0,747$, $p=0,05$), а также уровнем анти-ВЭБ Ig-VCA ($R=0,47$, $p=0,032$). Если мы рассматриваем уровень экспрессии данного маркера только у пациентов с наличием ВЭБ в опухолевой ткани, то корреляционные связи усиливаются. В частности, корреляционные связи с уровнем противовирусных антител к ВЭБ анти-ВЭБ Ig-VCA ($R=0,577$, $p=0,049$), данные статистически достоверны. Также у этой группы больных определяются высокие корреляционные связи с наличием койлоцитоза ($R=0,368$, $p=0,24$) и внутриядерных включений ($R=0,485$, $p=0,11$) как проявлений ВПЧ-инфекции. Экспрессия ростового фактора (EGFR) в зависимости от степени анаплазии представлена на рис. 10, 11.

Если рассматривать койлоцитоз как проявление ВПЧ-инфекции, то у пациентов с наличием вирусных ДНК в опухолевой ткани выявлены высокие коррелятивные связи между койлоцитозом и экспрессией CD31 (общее число сосудов), $R=0,576$, $p=0,008$, CD31 (соотношение числа сосудов к проценту площади опухоли), $R=0,47$, $p=0,036$, экспрессией Ki67 (в баллах), $R=0,408$, $p=0,316$. Кроме того, у этой группы пациентов выявлены связи между наличием ЦМВ в опухолевой ткани и койлоцитозом ($R=0,32$,

Рис. 10. Экспрессия EGFR у пациентов, страдающих раком мочевого пузыря с наличием и отсутствием ДНК ВЭБ и ВПЧ высокого онкогенного риска в опухолевой ткани, в зависимости от степени анаплазии.

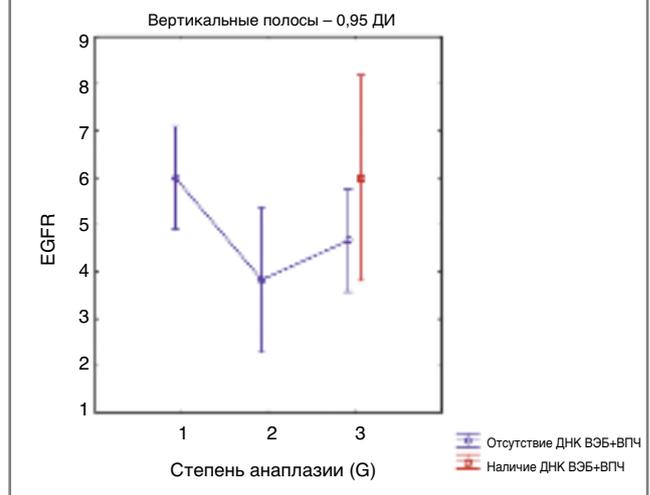
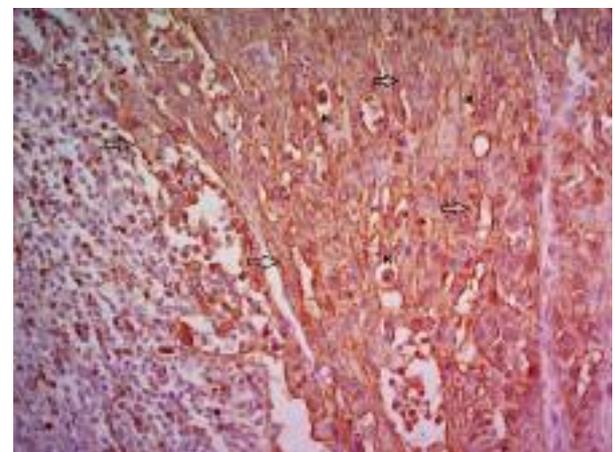


Рис. 11. Фрагмент уротелиальной карциномы. Выраженная мембранная экспрессия EGFR в ткани опухоли (обозначена стрелками) в сочетании с признаками койлоцитоза (K); ув. 200.



$p=0,028$), очаговой гиперплазией в виде фолликулов ($R=0,362$, $p=0,012$), а также наличием лейкоцитов ($R=0,439$, $p=0,012$) и эозинофилов ($R=0,439$, $p=0,012$).

Следует отметить, что наличие койлоцитоза без подтвержденного методом ПЦР ВПЧ было выявлено и в группе пациентов с отсутствием вирусных ДНК в опухолевой ткани. При этом статистически достоверно наличие умеренно выраженных изменений (2 балла) было выше в группе пациентов именно с отсутствием вирусных ДНК (10,3% vs 28,6%, $p=0,046$), тогда как выраженные изменения (3 балла) имели место в большинстве случаев у пациентов с наличием вирусных ДНК в опухолевой ткани (27,6% vs 9,5% соответственно, $p=0,06$). Такая же тенденция прослеживается и в случае наличия внутриядерных включений (1 балл: 10,7% vs 28,6%, $p=0,046$; 2–3 балла: по 17,9% vs 9,5% и 11,9% соответственно).

Были выявлены умеренные корреляционные связи между наличием внутриядерных включений и наличием ВЭБ в опухолевой ткани ($R=0,303$, $p=0,04$), койлоцитозом ($R=0,411$, $p=0,005$), очаговой гиперплазией ($R=0,459$, $p=0,001$), периваскулярной инфильтрацией ($R=0,335$, $p=0,023$). Ранее в наших работах мы указывали на возможность сочетанной вирусной инфекции у этой категории больных [26].

Обсуждение

Все больше появляется публикаций, посвященных потенцированию действия одних вирусов другими при неоплазиях различных локализаций [20–24]. Следует отметить, что способность вирусов потенцировать действие друг друга описана достаточно давно. Известно, что на фоне ЦМВ может развиваться инфицирование другими видами вирусов или бактериями, т.е. суперинфекция. Доказано, что ЦМВ инфицирует В-клетки, латентно инфицированные ВЭБ, более эффективно, чем ВЭБ-негативные [27].

В настоящее время обсуждается роль коинфекции, сочетанного действия вирусов, особенно ВПЧ и ВЭБ, на развитие неоплазий. А.Абудоккадег и соавт. обнаружили статистически достоверное повышение выявляемости сочетанной ВПЧ+ВЭБ-инфекции по мере прогрессии рака шейки матки ($r=0,46$; $p<0,01$). Авторы указывают на определенную роль не только моноинфекции ВПЧ или ВЭБ, но и сочетанной инфекции как при возникновении, так и прогрессировании рака шейки матки [28].

Подобные данные получили и Т.МсСормик и соавт., при этом авторы указывают на нарушение процессов метилирования генов, в частности, RB1, именно при наличии коинфекции ВПЧ+ВЭБ – у 33,3% больных раком шейки матки. Авторы делают вывод о том, что ВЭБ является кофактором развития цервикальных неоплазий [21].

В нашей работе мы также выявили корреляционные взаимоотношения между морфологическими признаками ВПЧ и герпес-вирусными инфекциями: умеренные корреляционные связи были выявлены между наличием внутриядерных включений и наличием ВЭБ в опухолевой ткани ($R=0,303$, $p=0,04$), койлоцитозом ($R=0,411$, $p=0,005$), очаговой гиперплазией ($R=0,459$, $p=0,001$), периваскулярной инфильтрацией ($R=0,335$, $p=0,023$).

Следует отметить, что экспрессия EGFR, особенно у пациентов с наличием ВЭБ, коррелировала также с уровнем анти-ВЭБ Ig-VCA ($R=0,47$, $p=0,032$), что свидетельствует о реактивации вирусной инфекции у пациентов с наличием вирусных ДНК в опухолевой ткани, особенно при наличии ВЭБ. Кроме того, у этой категории больных выявлена корреляционная зависимость экспрессии ростовых факторов с наличием ВПЧ в опухолевой ткани ($R=0,354$, $p=0,115$), а у пациентов с наличием ВЭБ определялись корреляционные взаимодействия и с морфологическими признаками ВПЧ-инфекции – наличием койлоцитоза ($R=0,368$, $p=0,24$) и внутриядерных включений ($R=0,485$, $p=0,11$), однако данные статистически недостоверны. Обращают на себя внимание статистически достоверные коррелятивные связи экспрессии EGFR и пролиферативной активности ($R=0,747$, $p=0,05$), p53 ($R=0,499$, $p=0,025$) у пациентов с на-

личием вирусных ДНК в опухолевой ткани, что, в свою очередь, приводит к неблагоприятному течению опухолевого процесса.

Рассматривая вирусный канцерогенез рака шейки матки, S.Szostek и соавт. делают вывод о том, что герпес-вирусы (ЦМВ и ВЭБ) увеличивают риск появления интегрированного или смешанного генома ВПЧ 16-го типа и, соответственно, развития рака шейки матки: при сочетанной ЦМВ-инфекции – в 6 раз (ЦМВ: отношение шансов 6,069; 95% ДИ 1,91–19,22; $p=0,002$), при сочетанной ВЭБ-инфекции – в 7 раз (ВЭБ: отношение шансов 7,11; 95% ДИ 1,70–29,67; $p=0,007$). Авторы считают, что коинфекция ЦМВ, ВЭБ с ВПЧ высоко онкогенного риска способствует более быстрому развитию рака шейки матки [23]. В нашем исследовании наличие ЦМВ в опухолевой ткани коррелировало с очаговой гиперплазией в виде фолликулов ($R=0,362$, $p=0,012$), койлоцитозом ($R=0,32$, $p=0,028$), наличием лейкоцитов ($R=0,439$, $p=0,012$) и эозинофилов ($R=0,439$, $p=0,012$). При этом получены высокие корреляционные связи между пролиферативной активностью и наличием ВПЧ высоко онкогенного риска в опухолевой ткани ($R=0,706$, $p=0,05$), койлоцитозом и факторами неоангиогенеза ($R=0,576$, $p=0,008$) и маркерами пролиферации ($R=0,408$, $p=0,316$).

R.Jiang и соавт. указывают на высокую (от 25 до 70%) выявляемость коинфекции ВПЧ+ВЭБ при раке ротоглотки и основания языка соответственно, ассоциированных с опухолевым статусом. In vitro авторы указывают на приобретение опухолью инвазивных свойств ($p<0,01$) при сочетанной инфекции. Кроме того, ассоциация вирусов была выявлена только в опухолевой ткани, богатой лимфоидными сосудами [20].

J.Lawson и соавт. в одном из своих последних исследований, посвященных влиянию онкогенных вирусов на развитие рака молочной железы, говорит о том, что влияние онкогенных вирусов в настоящее время является основной вероятной гипотезой развития рака молочной железы и прямого воздействия вирусов на клетки молочной железы [22]. При этом данная группа авторов в ранее проведенных исследованиях указывает на персистенцию онкогенных вирусов в ткани молочной железы, в частности ВПЧ у 13 (72%) из 17 больных в неизменной ткани молочной железы и у 13 (76%) из 17 тех же самых пациенток, у которых впоследствии развился рак молочной железы, тогда как ВЭБ не был выявлен в здоровой ткани ни у одной пациентки, только в опухолевой ткани. При этом ВПЧ и ВЭБ были выявлены в одних и тех же клетках опухолевой ткани. Авторы подчеркивают, что наличие предшествующей вирусной инфекции (персистирующей в ткани от 1 до 11 лет до развития рака молочной железы) в ткани молочной железы до развития заболевания является ключевым критерием при оценке причинно-следственной связи персистенции онкогенных вирусов и развития рака молочной железы [24]. По всей видимости, персистирующая длительное время вирусная инфекция присутствует и у больных, страдающих раком мочевого пузыря, так как признаки вирусной инфекции в той или иной степени определяются у пациентов как с наличием, так и отсутствием вирусных ДНК в опухолевой ткани, определенных методом ПЦР. В последнем случае имеет место незначительная степень цитопатических изменений (2 балла: 10,3% vs 28,6%, $p=0,046$), тогда как при наличии вирусных ДНК степень этих изменений выше (3 балла: 27,6% vs 9,5% соответственно, $p=0,06$). Такая же тенденция прослеживается и в случае наличия внутриядерных включений (1 балл: 10,7% vs 28,6%, $p=0,046$; 2–3 балла: по 17,9% vs 9,5% и 11,9% соответственно).

Заключение

Таким образом, были проанализированы некоторые морфологические, а у ряда больных подтвержденные молекулярно-генетическими методами признаки наличия

сочетанной вирусной инфекции, приведены клинические примеры. Признаки сочетанной вирусной инфекции в той или иной степени определяются как у пациентов с наличием, так и отсутствием вирусных ДНК в опухолевой ткани, определенным методом ПЦР. Выявляются корреляционные взаимосвязи между морфологическими, молекулярно-генетическими, иммуноферментными показателями наличия вирусной коинфекции у больных раком мочевого пузыря. Так, статистически достоверные коррелятивные связи мы получили между экспрессией EGFR и уровнем анти-ВЭБ Ig-VCA ($R=0,47$, $p=0,032$), пролиферативной активностью ($R=0,747$, $p=0,05$), p53 ($R=0,499$, $p=0,025$) у пациентов с наличием вирусных ДНК в опухолевой ткани. Получены высокие корреляционные связи между пролиферативной активностью и наличием ВПЧ высокого онкогенного риска в опухолевой ткани ($R=0,706$, $p=0,05$); койлоцитозом и факторами неангиогенеза ($R=0,576$, $p=0,008$). Повышение пролиферативной активности, экспрессии факторов апоптоза, ростовых факторов и факторов неангиогенеза у пациентов с наличием вирусных ДНК в опухолевой ткани свидетельствует о неблагоприятном течении опухолевого процесса.

Литература/References

- Harald zur Hausen. Infections causing human cancer. 2006. Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGa, Weinheim. p 517.
- Jalilvand S, Shoja Z, Hamkar R. Human papillomavirus burden in different cancers in Iran: a systematic assessment. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15 (17): 7029–35. [PubMed]
- Karbalaie Niya HM, Safarnezhad Tameshkel F, Panahi M et al. Human papillomavirus investigation in head and neck squamous cell carcinoma: initial report from the low risk HPV types associations. *Asian Pac J Cancer Prev* 2017; 18 (9): 2573–9. [PubMed]
- Yahyapour Y, Shamsi-Shahrabadi M, Mahmoudi M et al. Evaluation of human papilloma virus infection in patients with esophageal squamous cell carcinoma from the Caspian Sea area, north of Iran. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13 (4): 1261–6. [PubMed]
- Lawson JS, Glenn WK, Whitaker NJ. Breast cancer, human papilloma virus and sexual activities. *Br J Cancer* 2008; 98: 510–1. DOI: 10.1038/sj.bjc.6604104
- Исаков В.А., Архипова Е.И., Исаков Д.В. Герпесвирусные инфекции человека. Руководство для врачей. Изд. 2-е, перераб. и доп. СПб.: СпецЛит, 2013. / Isakov V.A., Arhipova E.I., Isakov D.V. Herpesvirusnye infekcii cheloveka. Rukovodstvo dlya vrachej. Izd. 2-e, pererab. i dop. SPb.: SpecLit, 2013. [in Russian]
- Richardson AK, Currie MJ, Robinson BA et al. Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in breast cancer. *PLoS One* 2015; 10 (2): e0118989.
- Tsao SW, Tsang CM, To KF, Lo KW. The role of Epstein-Barr virus in epithelial malignancies. *J Pathol* 2015; 235: 323–33. [PubMed]
- Young LS, Rickinson AB. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 757–68. [PubMed]
- Rickinson AB. Co infections, inflammation and oncogenesis: future directions for EBV research. *Semin Cancer Biol* 2014; 26: 99–115. [PubMed]
- Michaelis M, Doerr HW, Cinatl Jr. The story of Human Cytomegalovirus and Cancer Increasing Evidence and Open Questions. *Neoplasia* 2009; 11 (1): 1–9.
- Андреева Ю.Ю. Морфологические и молекулярно-биологические факторы прогноза рака мочевого пузыря. Дис. ... д-ра мед. наук. М., 2009. / Andreeva Yu.Yu. Morfologicheskie i molekulyarno-biologicheskie faktory prognoza raka mochevogo puzyrya. Dis. ... d-ra med. nauk. M., 2009. [in Russian]
- Abol-Enein H. Infection: is it cause of bladder cancer? *Scand H Urol Nephrol Suppl* 2008; 218: 79–84.
- Abe T, Shinohara N, Tada M et al. Infiltration of Epstein-Barr virus-harboring lymphocytes occurs in a large subset of bladder cancers. *Int J Urol* 2008; 15 (5): 429–34. DOI: 10.1111/j.1442-2042.2008.02030.x
- Panagiotakis GI, Papadogianni D, Chatziioannou MN et al. Association of human herpes, papilloma and polyoma virus families with bladder cancer. *Tumour Biol* 2013; 34 (1): 71–9. DOI: 10.1007/s13277-012-0512-2
- Chuang KL, Pang ST, Liao SK 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
- Fioriti D, Pietropaolo V, Dal Forno S et al. Urothelial carcinoma and viral infections: different association with human polyomaviruses and papillomaviruses. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2003; 16 (3): 283–83.
- Golovina DA, Ermilova VD, Zavalishina LE et al. Loss of Cell Differentiation in HPV-Associated Bladder Cancer. *Bull Exp Biol Med* 2016; 161 (1): 96–8. DOI: 10.1007/s10517-016-3354-x
- Naushad W, Surriya O, Sadia H. Prevalence of EBV, HPV and MMTV in Pakistani breast cancer patients: A possible etiological role of viruses in breast cancer. *Infect Genet Evol* 2017; 54: 230–7. DOI: 10.1016/j.meegid.2017.07.010
- Jiang R, Ekshyyan O, Moore-Medlin T et al. Association between human papilloma virus/Epstein-Barr virus coinfection and oral carcinogenesis. *J Oral Pathol Med* 2015; 44 (1): 28–36. DOI: 10.1111/jop.12221
- McCormick TM, Canedo NH, Furtado YL et al. Association between human papillomavirus and Epstein-Barr virus DNA and gene promoter methylation of RB1 and CDH1 in the cervical lesions: a transversal study. *Diagn Pathol* 2015; 10: 59. DOI: 10.1186/s13000-015-0283-3
- James S.Lawson, Brian Salmons, Wendy K.Glenn. Oncogenic Viruses and Breast Cancer: Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV), Bovine Leukemia Virus (BLV), Human Papilloma Virus (HPV), and Epstein-Barr Virus (EBV). *Front Oncol* 2018; 8: 1.
- Szostek S, Zawilinska B, Kopec J, Kosz-Vnenchak M. Herpesviruses as possible cofactors in HPV-16-related oncogenesis. *Acta Biochim Pol* 2009; 56 (2): 337–42.
- James S.Lawson, Wendy K.Glenn. Multiple oncogenic viruses are present in human breast tissues before development of virus associated breast cancer. *Infect Agent Cancer* 2017; 12: 55.
- Zhou BP, Hun MC. Dysregulation of cellular signaling by HER2/neu in breast Cancer. *Semin Oncol* 2003; 30 (5 Suppl. 16): 38–48.
- Лоран О.Б., Синякова Л.А., Гундорова Л.В. и др. Морфологические особенности рака мочевого пузыря у больных с хронической герпес-вирусной инфекцией. *Лечащий врач*. 2017; 9: 13–8. / Loran O.B., Sinyakova L.A., Gundorova L.V. i dr. Morfologicheskie osobennosti raka mochevogo puzyrya u bolnyh s hronicheskoy herpes-virusnoj infekciej. *Lechashij vrach*. 2017; 9: 13–8. [in Russian]
- Flamand L, Romero F, Reitz MS, Gallo RC. CD4 promoter transactivation by human herpesvirus 6. *J Virol* 1998; 72 (11): 8797–805.
- Abudoukadeer A, Niyazi M, Aikula A et al. Association of EBV and HPV co-infection with the development of cervical cancer in ethnic Uyghur women. *Eur J Gynaecol Oncol* 2015; 36 (5): 546–50.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Косова Инга Владимировна – канд. мед. наук, ФГБОУ ДПО РМАНПО, врач-уролог урологического отделения ГБУЗ «ГКБ им. В.П.Демидова». E-mail: kosovainga@mail.ru

Лоран Олег Борисович – акад. РАН, д-р мед. наук, проф. каф. урологии и хирургической андрологии ФГБОУ ДПО РМАНПО. E-mail: oleg_loran@gmail.com

Синякова Любовь Александровна – д-р мед. наук, проф. каф. урологии и хирургической андрологии ФГБОУ ДПО РМАНПО. E-mail: l.a.sinyakova@mail.ru

Гундорова Людмила Викторовна – д-р мед. наук, зав. патологоанатомическим отделением ГБУЗ «ГКБ им. В.П.Демидова». E-mail: ludovik-213@mail.ru

Косов Владимир Алексеевич – врач уролог-онколог, вед. спец. ГУ КРОД. E-mail: zinaidakosova@yandex.ru

Погодина Ирина Евгеньевна – канд. мед. наук, врач-патоморфолог патологоанатомического отделения БУЗ ВОКБ №2. E-mail: utk-irina@yandex.ru

Колбасов Дмитрий Николаевич – канд. мед. наук, врач-уролог, зав. урологическим отделением ГБУЗ «ГКБ им. В.П.Демидова». E-mail: urology68@rambler.ru