

# Взаимосвязь ВПЧ-инфицирования карциномы эндометрия с ее клинико-морфологическими особенностями

Т.А. Зыкова, Т.И. Моисеенко, Е.М. Франциянц, М.А. Вовкочина

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России;  
Россия, 344047 Ростов-на-Дону, 14-я линия, 63

Контакты: Татьяна Алексеевна Зыкова [tatiana2904@yandex.ru](mailto:tatiana2904@yandex.ru)

**Введение.** Данные о выявлении вируса папилломы человека (ВПЧ) в ткани опухоли при раке эндометрия (РЭ) довольно противоречивы.

**Цель исследования** — изучение распространенности ВПЧ в ткани опухоли при РЭ и установление взаимосвязи статуса ВПЧ-инфицирования с морфологическими характеристиками опухоли.

**Материалы и методы.** Исследовали 57 образцов, фиксированных в формалине и парафине (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE), тканей опухоли больных РЭ в возрасте 47–78 лет. ДНК ВПЧ была обнаружена в 54,4 % образцов.

**Результаты и заключение.** Не удалось установить взаимосвязи ВПЧ-статуса опухоли с возрастом, наличием метастазов и глубиной инвазии. В то же время обнаружена достоверная взаимосвязь ВПЧ-инфицирования от ряда морфологических характеристик опухоли: гистологического типа (аденокарциномы с очагами плоскоклеточной дифференцировки в 1,8 раза чаще были ВПЧ-положительными, чем без нее; в 1-м случае ткани опухоли чаще были инфицированы 16-м типом ВПЧ, во 2-м — 18-м), степени дифференцировки (в общей когорте и при серозно-папиллярных аденокарциномах со снижением степени дифференцировки опухоли увеличивалась частота ВПЧ-инфицированных образцов от 0 до 81,8 % и от 0 до 100 % соответственно), стадии заболевания (в общей когорте больных удельный вес ВПЧ-положительных опухолей при II стадии был больше в 2,4 раза, а при III стадии в 1,6 раза, чем при I стадии, при этом при стадии IA ВПЧ-положительные опухоли регистрировались в 2,3 раза чаще, чем при IB), типа роста опухоли (среди опухолей с инфильтративным ростом ВПЧ-положительные встречались в 1,7 раза чаще, чем с экзофитным, и в 2,2 раза чаще, чем со смешанным).

**Ключевые слова:** рак эндометрия, вирус папилломы человека, полимеразная цепная реакция в реальном времени, распространенность ВПЧ, генотип, вирусная нагрузка

**Для цитирования:** Зыкова Т.А., Моисеенко Т.И., Франциянц Е.М., Вовкочина М.А. Взаимосвязь ВПЧ-инфицирования карциномы эндометрия с ее клинико-морфологическими особенностями. *Успехи молекулярной онкологии* 2018;5(3):75–82.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-3-75-82

## Interrelation of HPV-infection of endometry carcinoma and its clinical-morphological features

T.A. Zykova, T.I. Moiseenko, E.M. Frantsiyants, M.A. Vovkochina

Rostov Research Institute of Oncology; 63 14<sup>th</sup> Liniya, Rostov-on-Don 344047, Russia

**Background.** There are contradictory data on the detection of human papillomavirus (HPV) in the tumor tissue in endometrial cancer (EC).

**Objective:** to assess HPV infection rates in EC tumor tissues and to establish the relationship between the status of HPV infection and tumor morphological characteristics.

**Materials and methods.** 57 formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue samples of EC patients aged 47–78 years were studied. HPV DNAs were found in 54.4 % of samples.

**Results and conclusion.** We did not reveal an association between the HPV tumor status and age, metastasis or invasion depth. However, there was an interdependence between HPV infection and some morphological characteristics of the tumor: its histological type (adenocarcinomas with squamous cell differentiation were HPV-positive 1.8 times more frequent compared to adenocarcinomas without one; in the first case, tumor tissues were more often infected with HPV 16, and in the second case with HPV 18); tumor grade (in the total cohort and in serous-papillary adenocarcinomas, tumors with higher grades were more often HPV-infected: from 0 to 81.8 % and from 0 to 100 % respectively); disease stage (in the total cohort the percentage of HPV-positive tumors in stage II was 2.4 times and in stage III — 1.6 times higher than in stage I, and stage IA tumors were HPV-positive 2.3 times more often than IB tumors); type of tumor growth (tumors with infiltrative growth type were HPV-positive 1.7 times more often than with exophytic growth, and 2.2 times more often than with mixed growth). The achieved results do not allow us to conclude with confidence that HPV is the main tumor forming factor in EC.

**Key words:** endometrial cancer, human papillomavirus, real-time polymerase chain reaction, HPV infection rates, genotype, viral load

**For citation:** Zykova T.A., Moiseenko T.I., Frantsiyants E.M., Vovkochina M.A. Interrelation of HPV-infection of endometry carcinoma and its clinical-morphological features. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5(3):75–82.

### Введение

Важность проблемы рака эндометрия (РЭ) не только не снижается на протяжении многих лет, но и становится более острой по мере роста заболеваемости и неэффективности лечения рецидивов и распространенных форм.

По экспертным данным, из 14 млн новых случаев рака, зарегистрированных в 2012 г., 2,2 млн (15,4 %) связаны с инфекционными агентами. Наиболее важными из них, на совокупную долю которых приходилось 92 % всех наблюдений рака, связанных с инфекцией, были *Helicobacter pylori*, вирус папилломы человека (ВПЧ), вирус гепатита В, вирус гепатита С и вирус Эпштейна–Барр. Помимо 530 тыс. наблюдений рака шейки матки (РШМ) с ВПЧ ассоциировано 113 тыс. заболеваний раком других локализаций [1]. По данным А.А. Костина и соавт., в России с ВПЧ связано развитие РШМ практически в 100 % наблюдений, рака вульвы – в 45 %, рака влагалища – в 40 %, рака анального канала – в 92 %, рака полового члена – в 42,5 %, злокачественных новообразований головы и шеи – в 25 % [2]. ДНК ВПЧ обнаруживают в различных опухолях. Однако, по данным Международного агентства по изучению рака (International Agency for Research on Cancer, IARC), убедительные доказательства этиологической роли ВПЧ представлены только для РШМ, рака вульвы, влагалища, пениса, ануса и ротоглотки [3]. Что касается опухолей других локализаций, роль ВПЧ в их развитии остается до конца не выясненной. Данные о распространенности ВПЧ при РЭ малочисленны и крайне противоречивы [4–7], что и побудило нас к проведению настоящей работы.

**Цель исследования** – провести сравнительный анализ распространенности, типовой принадлежности и вирусной нагрузки ВПЧ в ткани опухоли различной гистологической структуры при РЭ, а также установить возможную взаимозависимость между статусом ВПЧ-инфицирования и некоторыми клинико-морфологическими характеристиками опухоли.

### Материалы и методы

Исследовали образцы фиксированных в формалине и парафине (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) тканей опухоли при РЭ. Депарафинизацию проводили с использованием ксилола и этанола 96°, экстракцию вирусной ДНК из ткани опухоли – методом сорбции на колонках с силиконовой мембраной. Выявление ДНК ВПЧ высокого и низкого канцерогенного риска проводили методом мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени.

Для выявления ДНК ВПЧ высокого канцерогенного риска и определения типа и концентрации вируса в образцах использовали следующие наборы реагентов: «АмплиСенс® ВПЧ высокого канцерогенного риска генотип-FL» для раздельного определения ДНК

ВПЧ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59-го типов; «АмплиСенс® ВПЧ высокого канцерогенного риска скрин-титр-FL» для количественного определения ДНК ВПЧ 12 типов, относящихся к филогенетическим группам А9 (16, 31, 33, 35, 52, 58-й типы), А7 (18, 39, 45, 59-й типы), А5/А6 (51-й и 56-й генотипы); «АмплиСенс® ВПЧ 16/18-FL» для дифференциации и количественного определения ДНК ВПЧ 16-го и 18-го типов; «АмплиСенс® ВПЧ 6/11-FL» для выявления и дифференциации ДНК ВПЧ низкого канцерогенного риска 6-го и 11-го типов. Во всех указанных наборах используется эндогенный внутренний контроль (участок ДНК гена  $\beta$ -глобина). Результат учитывали при его количестве не менее 1000 копий/реакцию. При расчете вирусной нагрузки проводили нормализацию показателей на 100 тыс. копий гена  $\beta$ -глобина. Одновременное использование наборов реагентов с различными мишенями (участки гена *E1-E2* или гена *E6*) позволило нам косвенно судить о наличии интегрированной в геном или эписомальной формы вируса. Наличие флуоресцентного сигнала только в наборе реагентов «АмплиСенс® ВПЧ 16/18-FL» свидетельствовало о присутствии вируса в интегрированной форме (100 % интеграции). В случае появления флуоресцентного сигнала в 2 наборах проводили дополнительное исследование с использованием набора реагентов, разработанного Центральным НИИ эпидемиологии. Степень интеграции ВПЧ 16-го или 18-го типа, обнаруженных в моноварианте, оценивали по соотношению числа копий генов *E2* и *E6*:  $(1-E2/E6) \times 100 \%$ , где *E2* – число копий гена *E2*; *E6* – число копий гена *E6*.

Исследовано 57 образцов FFPE ткани от больных с диагнозом РЭ в возрасте 47–78 лет, из них 10 женщин (возраст до 55 лет) находились в периоде перименопаузы, 39 (56–75 лет) – постменопаузы, 8 (старше 76 лет) – глубокой менопаузы. По морфологическим признакам 13 (22,8 %) опухолей относились к серозно-папиллярной аденокарциноме, 44 (77,2 %) – к эндометриальной аденокарциноме (12 (27,3 %) из них имели очаги плоскоклеточной дифференцировки). С учетом того, что ВПЧ поражает преимущественно плоский эпителий, мы сгруппировали исследуемые образцы по следующему принципу: 1-ю группу составили эндометриальные аденокарциномы с плоскоклеточной дифференцировкой ( $n = 12$ ), 2-ю – серозно-папиллярные и эндометриальные аденокарциномы без плоскоклеточной дифференцировки ( $n = 45$ ). У 38 (66,7 %) женщин установлена I стадия заболевания, в том числе у 32 (71,7 %) с аденокарциномой без плоскоклеточной дифференцировки и у 6 (50,0 %) с ее наличием; у 4 (7,0 %) пациенток – II стадия, в том числе у 2 (4,4 %) без плоскоклеточной дифференцировки и у 2 (16,7 %) с ее наличием; у 13 (22,8 %) женщин – III стадия, в том числе у 9 (20,0 %) без плоскоклеточной дифференцировки и у 4 (33,3 %) с ее наличием; у 2 (3,5 %) пациенток – IV стадия, у 2 (4,4 %) без плоскоклеточной дифференцировки и у 0 % с ее наличием.

Статистическую обработку данных проводили в соответствии с общепринятыми методами [8] с использованием пакета прикладных программ Microsoft Office Excel и программного пакета Statistica 10.0. Для сравнения качественных признаков выборок применяли  $\chi^2$ -критерий Пирсона; если хотя бы одно из значений ожидаемого явления было меньше 10, для анализа использовали точный критерий Фишера. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ ; при уровне значимости  $0,05 \leq p < 0,1$  отмечали тенденцию к достоверности.

### Результаты

При исследовании FFPE ткани ДНК ВПЧ высокого канцерогенного риска обнаружена у 54,4 % больных, 45,6 % образцов были ВПЧ-отрицательными. Таким образом, установлен высокий уровень ВПЧ-инфицирования ткани опухоли при РЭ.

Среди женщин перименопаузального периода 6 (60,0 %) пациенток имели ВПЧ-положительный статус опухоли, 4 (40,0 %) – ВПЧ-отрицательный, постменопаузального периода – 21 (53,8 %) и 18 (46,2 %) пациенток соответственно. Несмотря на преобладание ВПЧ-положительных образцов, различия не были статистически значимыми ( $p > 0,05$ ). В группе женщин в период глубокой менопаузы количество ВПЧ-положительных и ВПЧ-отрицательных было равным (по 50,0 %).

Нами выявлены достоверные различия в частоте ВПЧ-инфицирования ткани различного гистологического типа. Так, образцы с плоскоклеточной дифференцировкой в 1,8 раза чаще были ВПЧ-положительными, чем ткани аденокарциномы без нее (83,3 % против 46,7 %;  $p = 0,0237$ ) (табл. 1). Среди серозно-папиллярных аденокарцином преобладали ВПЧ-положительные (53,8 %), а среди эндометриальных без плоскоклеточной дифференцировки, напротив, ВПЧ-отрицательные (56,3 %), однако достоверной зависимости статуса ВПЧ-инфицирования от гистологического подтипа аденокарцином без плоскоклеточной дифференцировки не установлено ( $p > 0,05$ ) (табл. 2).

Среди опухолей с высокой степенью дифференцировки были только ВПЧ-отрицательные, в группах умеренно и низкодифференцированных преобладали опухоли с ВПЧ-положительным статусом, причем в группе низкодифференцированных опухолей это преобладание выражено значительно сильнее (см. табл. 1). Удельный вес ВПЧ-положительных образцов среди умеренно дифференцированных опухолей составил 55,6 %, среди низкодифференцированных – 73,3 %, а соотношение ВПЧ-положительных образцов к ВПЧ-отрицательным составило 1,25 и 2,75 соответственно. Таким образом, в ходе исследования мы установили, что со снижением степени дифференцировки опухоли достоверно увеличивалась частота ВПЧ-инфицированных образцов ( $p = 0,01$ ). Данная закономерность сохранялась только для опухолей без плоскоклеточной

дифференцировки. В этой группе высокодифференцированные опухоли были только ВПЧ-отрицательными, умеренно дифференцированные – преимущественно ВПЧ-отрицательными (57,1 %), а низкодифференцированные, напротив, – ВПЧ-положительными (81,8 %). Таким образом, при аденокарциномах без плоскоклеточной метаплазии по мере снижения степени дифференцировки опухоли повышался удельный вес образцов с положительным ВПЧ-статусом ( $p = 0,005$ ). Эта закономерность была сформирована за счет серозно-папиллярных аденокарцином ( $p = 0,002$ ); при эндометриальных аденокарциномах без плоскоклеточной метаплазии степень дифференцировки не зависела от ВПЧ-статуса опухоли. При сравнении частоты выявления ДНК ВПЧ у женщин с разными гистологическими подтипами РЭ и одной степенью дифференцировки нами обнаружена тенденция к преобладанию ВПЧ-положительных эндометриальных аденокарцином без плоскоклеточной метаплазии по сравнению с серозно-папиллярными ( $p = 0,089$ ), но только среди умеренно дифференцированных опухолей. Эндометриальные аденокарциномы с плоскоклеточной дифференцировкой имели противоположные характеристики. Высокодифференцированного рака не было ни среди ВПЧ-положительных, ни среди ВПЧ-отрицательных, умеренно дифференцированный рак регистрировался только среди ВПЧ-положительных, а при низкодифференцированном раке удельный вес образцов с различным ВПЧ-статусом был равным (см. табл. 1). При аденокарциномах с плоскоклеточной метаплазией установлена тенденция к уменьшению частоты выявления ДНК ВПЧ со снижением степени дифференцировки между умеренно дифференцированными и низкодифференцированными опухолями ( $p = 0,091$ ).

Одним из свойств злокачественности, приводящих к летальному исходу, является метастазирование. Статистически значимой разницы между опухолями с разным ВПЧ-статусом в общей когорте не выявлено ( $p > 0,05$ ). Отдаленные метастазы обнаружены только среди больных с ВПЧ-положительными серозно-папиллярными аденокарциномами. Частота выявления регионарных метастазов в общей когорте обследованных также не зависела от ВПЧ-статуса опухоли ( $p > 0,05$ ). Метастазы в лимфатических узлах или придатках матки регистрировались только у больных без плоскоклеточной дифференцировки, при этом нами установлена лишь тенденция к преобладанию частоты регионарного метастазирования ВПЧ-положительных опухолей над ВПЧ-отрицательными ( $p = 0,083$ ). При аденокарциномах с плоскоклеточной дифференцировкой были зарегистрированы только больные без метастазов, из них 83,3 % имели ВПЧ-положительный статус опухоли.

В общей когорте обследованных среди больных с I стадией преобладали ВПЧ-отрицательные (57,9 %), со II–IV стадиями – ВПЧ-положительные (100, 69,2 и 100 % соответственно). Нами установлены статистически

Таблица 1. Частота выявления ВПЧ в ткани опухоли при раке эндометрия в зависимости от клинико-морфологических характеристик

Table 1. Frequency of HPV detection in endometrial tumor tissue depending on clinical and morphological characteristics

Характеристика Characteristic	Всего Total			Эндометриальные без плоскоклеточной дифференцировки и серозно-папиллярные аденокарциномы Endometrial without squamous cell differentiation and serous papillary adenocarcinomas			Эндометриальные аденокарциномы с плоскоклеточной дифференцировкой Endometrial adenocarcinomas with squamous cell differentiation		
	n	ВПЧ (+), n (%) HPV (+), n (%)	ВПЧ (-), n (%) HPV (-), n (%)	n	ВПЧ (+), n (%) HPV (+), n (%)	ВПЧ (-), n (%) HPV (-), n (%)	n	ВПЧ (+), n (%) HPV (+), n (%)	ВПЧ (-), n (%) HPV (-), n (%)
Всего Total	57	31 (54,4)	26 (45,6)	45	21 (46,7)**	24 (53,3)	12	10 (83,3)**	2 (16,7)
Степень дифференцировки: Differentiation grade:									
G <sub>1</sub>	6	0	6 (100)	6	0	6 (100)	0	0	0
G <sub>2</sub>	36	20 (55,6)*	16 (44,4)	28	12 (42,9)*	16 (57,1)	8	8 (100)	0
G <sub>3</sub>	15	11 (73,3)*	4 (26,7)	11	9 (81,8)*	2 (18,2)	4	2 (50,0)	2 (50,0)
Наличие метастазов: Metastatic status:									
N0	49	25 (51,0)	24 (49,0)	37	15 (40,5)	22 (59,5)	12	10 (83,3)	2 (16,7)
Nx	8	6 (77,8)	2 (22,2)	8	6 (75,0)	2 (25,0)	0	0	0
M0	55	29 (52,7)	26 (47,3)	43	19 (44,2)	24 (55,8)	12	10 (83,3)	2 (16,7)
M1	2	2 (100)	0	2	2 (100)	0	0	0	0
Стадия: Stage:									
I, в том числе: I, including:	38	16 (42,0)*	22 (57,9)	32	10 (31,3)*, **	22 (68,7)	6	6 (100)**	0
IA	16	10 (62,5)*	6 (37,5)	14	8 (57,1)*	6 (42,9)	2	2 (100)	0
IB	22	6 (27,3)*	16 (72,7)	18	2 (11,1)*, **	16 (88,9)	4	4 (100)**	0
II	4	4 (100)*	0	2	2 (100)	0	2	2 (100)	0
III	13	9 (69,2)	4 (30,8)	9	7 (77,8)*	2 (22,2)	4	2 (50,0)	2 (50,0)
IV	2	2 (100)	0	2	2 (100)	0	0	0	0
Тип роста опухоли: Tumor growth type:									
экзофитный exophytic	12	6 (50,0)*	6 (50,0)	10	4 (40,0)*	6 (60,0)	2	2 (100)	0
инфильтративный infiltrative	15	13 (86,7)*	2 (13,3)	13	11 (84,6)*	2 (15,4)	2	2 (100)	0
смешанный mixed	30	12 (40,0)*	18 (60,0)	22	6 (27,3)*, **	16 (72,7)	8	6 (75,0)**	2 (25,0)
Глубина инвазии: Invasion depth:									
<1/2	18	12 (66,7)	6 (33,3)	16	10 (62,5)	6 (37,5)	2	2 (100)	0
>1/2	30	14 (46,7)	16 (53,3)	24	8 (33,3)**	16 (66,7)	6	6 (100)**	0
до серозы up to serosa	9	5 (55,6)	4 (44,4)	5	3 (60,0)	2 (40,0)	4	2 (50,0)	2 (50,0)

**Примечание.** Здесь и в табл. 2: ВПЧ – вирус папилломы человека; n – количество исследованных образцов.

Note. Here and in Table 2: HPV – human papillomavirus; n – number of examined samples.

\*Достоверные различия между параметрами анализа. \*\*Достоверные различия между гистологическими типами.

\*Significant differences between the analytic parameters. \*\*Significant differences between histological types.

значимое увеличение ВПЧ-положительных опухолей со II стадией по сравнению с I (100 % против 42,1 %;  $p = 0,043$ ) и тенденция к росту в III стадии по сравнению с I (69,2 % против 42,1 %;  $p = 0,085$ ). Интересно, что

при сравнении частоты выявления ВПЧ-положительных опухолей при стадиях IA и IB обнаружена статистически значимая, но обратная закономерность: при стадии IA ВПЧ-положительные опухоли регистрировались

достоверно чаще, чем при IB (62,5 % против 27,3 %;  $p = 0,032$ ).

В группе опухолей без плоскоклеточной дифференцировки также наименьший удельный вес ВПЧ-положительных образцов был при I стадии заболевания, однако статистически значимыми были различия только между I и III стадиями ( $p = 0,017$ ). Как и в об-

щей группе, частота выявления ВПЧ-положительных образцов при стадии IA (57,1 %) достоверно превышала тот же показатель при стадии IB (11,1 %) при уровне значимости  $p = 0,032$ . Однако при анализе отдельных гистологических подтипов аденокарцином эндометрия без плоскоклеточной дифференцировки мы не смогли установить статистически значимой взаимосвязи ВПЧ-

**Таблица 2.** Частота выявления ВПЧ в ткани эндометриальных без плоскоклеточной дифференцировки и серозно-папиллярных аденокарцином в зависимости от морфологических и клинических характеристик опухоли

**Table 2.** Frequency of HPV detection in endometrial adenocarcinomas without squamous cell differentiation and serous papillary adenocarcinomas depending on morphological and clinical characteristics of the tumor

Характеристика Characteristic	Всего Total			Серозно-папиллярная аденокарцинома Serous papillary adenocarcinoma			Эндометриальная аденокарцинома без плоскоклеточной дифференцировки Endometrial adenocarcinoma without squamous cell differentiation		
	n	ВПЧ (+), n (%)	ВПЧ (-), n (%)	n	ВПЧ (+), n (%)	ВПЧ (-), n (%)	n	ВПЧ (+), n (%)	ВПЧ (-), n (%)
		HPV (+), n (%)	HPV (-), n (%)		HPV (+), n (%)	HPV (-), n (%)		HPV (+), n (%)	HPV (-), n (%)
Всего Total	45	21 (46,7)	24 (53,3)	13	7 (53,8)	6 (46,2)	32	14 (43,7)	18 (56,3)
Степень дифференцировки: Differentiation grade:									
G <sub>1</sub>	6	0	6 (100)	2	0*	2 (100)	4	0	4 (100)
G <sub>2</sub>	28	12 (42,9)*	16 (57,1)	4	0* **	4 (100)	24	12 (50,0)**	12 (50,0)
G <sub>3</sub>	11	9 (81,8)*	2 (18,2)	7	7 (100)*	0	4	2 (50,0)	2 (50,0)
Наличие метастазов: Metastatic status:									
N0	37	15 (40,5)	22 (59,5)	7	3 (42,9)	4 (57,1)	30	12 (40,0)	18 (60,0)
Nx	8	6 (75,0)	2 (25,0)	6	4 (66,7)	2 (33,3)	2	2 (100)	0
M0	43	19 (44,2)	24 (55,8)	11	5 (45,5)	6 (54,5)	32	14 (43,7)	18 (56,3)
M1	2	2 (100)	0	2	2 (100)	0	0	0	0
Стадия: Stage:									
I, в том числе: I, including:	32	10 (31,3)*	22 (68,7)	6	2 (33,3)	4 (66,7)	26	8 (30,8)	18 (69,2)
IA	14	8 (57,1)*	6 (42,9)	0	0	0	14	8 (57,1)	6 (42,9)
IB	18	2 (11,1)*	16 (88,9)	6	2 (33,3)	4 (100)	12	0	12 (100)
II	2	2 (100)	0	0	0	0	2	2 (100)	0
III	9	7 (77,8)*	2 (22,2)	5	3 (60,0)	2 (40,0)	4	4 (100)	0
IV	2	2 (100)	0	2	2 (100)	0	0	0	0
Тип роста опухоли: Tumor growth type:									
экзофитный exophytic	10	4 (40,0)*	6 (60,0)	0	0	0	10	4 (40,0)	6 (60,0)
инфильтративный infiltrative	13	11 (84,6)*	2 (15,4)	5	5 (100)**	0	8	6 (75,0)**	2 (25,0)
смешанный mixed	22	6 (27,3)*	16 (72,7)	8	2 (25,0)**	6 (75,0)	14	4 (28,6)**	10 (71,4)
Глубина инвазии: Invasion depth:									
<1/2	16	10 (62,5)	6 (37,5)	0	0	0	16	10 (62,5)	6 (37,5)
>1/2	24	8 (33,3)	16 (66,7)	10	6 (60,0)**	4 (40,0)	14	2 (14,3)**	12 (85,7)
до серозы up to serosa	5	3 (60,0)	2 (40,0)	3	0	3 (100)	2	2 (100)	0

\*Достоверные различия между параметрами анализа. \*\*Достоверные различия между гистологическими типами.

\*Significant differences between analytic parameters. \*\*Significant differences between histological types.

статуса опухоли со стадией заболевания. Указанные закономерности формировались только при объединении образцов разных гистологических подтипов в группы. Попытка выявить различия в частоте регистрации ВПЧ-положительных опухолей разного гистогенеза в пределах одной стадии заболевания также не выявила четких закономерностей. Установлено лишь статистически значимое преобладание ВПЧ-положительных опухолей среди аденокарцином с плоскоклеточной дифференцировкой (100 %) по сравнению с аденокарциномами без нее (31,3 %) в I стадии заболевания ( $p = 0,0029$ ), в том числе в стадии IV (100 и 11,1 %;  $p = 0,0021$ ).

Стадия заболевания при РЭ в первую очередь определяется глубиной инвазии. В ходе проведенного исследования в общей группе и среди аденокарцином без плоскоклеточной метаплазии нам не удалось установить достоверную зависимость частоты выявления ДНК ВПЧ от глубины инвазии опухоли ( $p > 0,05$ ). Среди больных с плоскоклеточной дифференцировкой опухоли определена тенденция к достоверному снижению частоты ВПЧ-положительных опухолей в зависимости от глубины инвазии ( $p = 0,091$ ). Также мы установили, что при глубине инвазии  $> 1/2$  миометрия ВПЧ-положительными достоверно чаще были опухоли с плоскоклеточной дифференцировкой (100 %) по сравнению с опухолями без нее (33,3 %), а серозно-папиллярные (60,0 %) по сравнению с эндометриальными (14,3 %) при уровнях значимости  $p = 0,0051$  и  $0,0283$  соответственно.

Большая часть опухолей характеризовалась смешанным типом роста. В общей группе исследуемых образцов к смешанному типу относились 30 (52,6 %) образцов, к инфильтративному – 15 (26,3 %), к экзофитному – 12 (21,1 %). Аденокарциномы без плоскоклеточной дифференцировки со смешанным типом роста встречались в 22 (48,8 %) наблюдениях, в том числе серозно-папиллярные – в 8 (61,5 %), эндометриальные – в 14 (43,7 %), с инфильтративным типом роста – в 13 (28,9 %), 5 (38,5 %) и 8 (25,0 %), с экзофитным – в 10 (22,2 %), 0 % и 10 (31,3 %) соответственно. В опухолях с плоскоклеточной дифференцировкой смешанный тип роста встречался в 8 (66,6 %) наблюдениях, инфильтративный – в 2 (16,7 %) и экзофитный – в 2 (16,7 %).

ВПЧ-положительными чаще были опухоли с инфильтративным типом роста (см. табл. 1, 2). В общей группе исследованных образцов среди опухолей с этим типом роста ДНК ВПЧ обнаружена у 86,7 %, с экзофитным – у 50,0 %, со смешанным – у 40,0 %, т. е. среди опухолей с инфильтративным ростом ВПЧ-положительные встречались в 1,7 раза чаще, чем с экзофитным, и в 2,2 раза чаще, чем со смешанным. Разница была достоверна при уровне значимости  $p = 0,049$  для соотношения инфильтративный/экзофитный и  $p = 0,003$  для соотношения инфильтративный/смешанный. Для аденокарцином без плоскоклеточной дифференциров-

ки установлены аналогичные закономерности. ДНК ВПЧ достоверно чаще была выявлена в опухолях с инфильтративным типом роста, чем с экзофитным (84,6 % против 40,0 %;  $p = 0,036$ ) и смешанным (84,6 % против 27,3 %;  $p = 0,014$ ) типами роста. При раздельном анализе по гистологическим подтипам мы определили достоверное преобладание ВПЧ-положительных над ВПЧ-отрицательными только для соотношения инфильтративный/смешанный рост при серозно-папиллярных (100 % против 25,0 %;  $p = 0,016$ ) и эндометриальных (75,0 % против 28,6 %;  $p = 0,048$ ) аденокарциномах без плоскоклеточной дифференцировки. Для опухолей с плоскоклеточной дифференцировкой подобные закономерности не выявлены ( $p > 0,05$ ). При смешанном типе роста ВПЧ-положительный статус достоверно чаще был отмечен у опухолей с плоскоклеточной дифференцировкой (75,0 %), чем без нее (27,3 %) ( $p = 0,026$ ). При других типах роста достоверных различий между статусом ВПЧ-инфицирования опухолей различной гистологической структуры не выявлено ( $p > 0,05$ ).

При анализе типовой принадлежности ВПЧ-положительных образцов было установлено, что 16-й тип вируса составил 38,7 %, 18-й – 51,6 %, 35-й – 3,2 %, а сочетание 16-го и 18-го – 6,5 % в общей структуре образцов. Среди пациентов с эндометриальной без плоскоклеточной дифференцировки и серозно-папиллярной аденокарциномами эти показатели составили 19,0; 66,7; 4,8 и 9,5 % соответственно. При аденокарциноме с плоскоклеточной дифференцировкой обнаружены только 16-й и 18-й типы и они составили 80,0 и 20,0 % соответственно, т. е. в образцах с плоскоклеточной дифференцировкой достоверно чаще встречался 16-й тип, а без нее – 18-й тип ВПЧ ( $p = 0,005$ ). Серозно-папиллярные аденокарциномы отличались от эндометриальных наличием сочетанных вариантов и 35-го типа вируса. ДНК ни одного из других определяемых типов ВПЧ высокого канцерогенного риска, а также низкого риска 6-го/11-го типов ни в одном случае не обнаружена.

Интеграция генома ВПЧ в геном инфицированной клетки является важным событием в процессе ее злокачественной трансформации и ведет к потере большей части вирусного генома, но при этом не сопровождается потерей генов *E6* и *E7* [9]. При анализе физической формы вируса, выявленного в моноварианте, мы установили, что 16-й тип ВПЧ был обнаружен только в тест-системах с мишенью в области гена *E6*, т. е. во всех случаях произошла 100 % интеграция вируса в геном клетки. Для 18-го типа ВПЧ 100 % интеграция была выявлена только в 87,5 % образцов, в 2 (12,5 %) образцах положительный сигнал был получен в тест-системах с мишенью в области генов *E6* и *E2*, уровень интеграции ВПЧ в этих образцах составил 72 и 75 % соответственно. Только в эписомальной форме ни один генотип ВПЧ не обнаружен. Уровень вирусной нагрузки был вариабелен и в среднем составил для 16-го типа 1,6 lg копий/ $10^5$  клеток, для 18-го типа – 2,4 lg копий/ $10^5$  клеток.

Таким образом, в ходе исследования отмечено, что в зависимости от гистологической структуры отличалась не только частота ВПЧ-инфицирования тканей опухоли, различными были и преобладающие генотипы вируса. Так, при аденокарциноме с плоскоклеточной дифференцировкой ткань опухоли чаще была инфицирована 16-м типом, а без нее — 18-м; вирусная нагрузка не была высокой.

### Обсуждение

В нашем исследовании был установлен высокий уровень (54,4 %) ВПЧ-инфицирования ткани опухоли при РЭ. Наиболее значительным международным исследованием в этом направлении является работа группы ученых, в которой были проведены систематический обзор и метаанализ распространенности ВПЧ при РЭ [7]. Авторы показали, что распространенность ВПЧ при РЭ значительно варьировала — от 0 до 61,1 %. Показатель распространенности ВПЧ статистически значимо ( $p = 0,0016$ ) был связан с методом исследования: значительно ниже он был при использовании методов, не основанных на ПЦР. При использовании методов на основе ПЦР распространенность ВПЧ при РЭ достоверно ниже была в случаях применения общих праймеров по сравнению с типоспецифическими. Ни один из других анализируемых факторов (географический регион, тип ткани, год публикации) статистически значимо не ассоциировался с распространенностью ВПЧ. Объединенный относительный риск составил 1,43 (95 % доверительный интервал 0,68–3,00), т. е. вероятность инфекции ВПЧ не увеличивалась по сравнению с контролем [7]. В работе Н.А. Бабаевой отмечено лишь 11,7 % ВПЧ-положительных тканей опухоли при РЭ и для выявления ДНК ВПЧ использован метод Digene Hybrid Capture II [6]. По результатам многочисленных международных исследований этот метод признан «золотым стандартом» для выявления ВПЧ при проведении цервикального скрининга, так как позволяет обнаружить лишь клинически значимую концентрацию вируса (более  $10^5$  копий/мл). В нашем исследовании для выявления ДНК ВПЧ высокого канцерогенного риска был применен метод ПЦР в реальном времени, позволяющий определить любое количество вируса. Уровень вирусной нагрузки в нашем исследовании не превышал  $3,0 \lg$  копий/ $10^5$  клеток. Если использовать критерии оценки клинической значимости, разработанные для цервикального скрининга в целях определения прогноза развития РШМ, эту величину можно считать клинически малозначимой. Однако правомерность механического переноса критериев оценки клинической значимости результатов исследований цервикальных мазков на данные, полученные при исследовании FFPE ткани, при РЭ остается под вопросом.

В настоящей работе основной акцент сделан на изучении взаимосвязи ВПЧ-статуса опухоли с ее морфо-

логическими характеристиками. Аналогичный подход был использован и другими исследователями, однако авторы не выявили корреляции статуса ВПЧ-инфицирования с наличием плоскоклеточной дифференцировки, глубиной инвазии миометрия, поражением лимфатической системы, лимфоцитарным ответом, возрастом пациентов или прогнозом [4, 5]. Нам также не удалось установить ассоциации ВПЧ-статуса опухоли с возрастом и наличием регионарных или отдаленных метастазов. Что касается таких во многом взаимосвязанных параметров, как стадия заболевания и глубина инвазии, мы получили неоднозначные результаты. С одной стороны, в общей когорте обследованных женщин ВПЧ-положительные опухоли статистически значимо чаще были выявлены во II стадии по сравнению с I, а среди больных с наличием плоскоклеточной дифференцировки — в III стадии по сравнению с I. С другой стороны, в обеих группах ВПЧ-положительными статистически значимо чаще были более поверхностные опухоли (чаще в стадии IA, чем в IB). В отношении глубины инвазии статистически значимые закономерности были определены лишь при инвазии  $>1/2$  миометрия.

В то же время в нашем исследовании установлена достоверная взаимосвязь статуса ВПЧ-инфицирования с рядом морфологических характеристик опухоли: гистологическим типом (аденокарциномы с плоскоклеточной дифференцировкой в 1,8 раза чаще были ВПЧ-положительными, чем без нее, в первом случае ткани опухоли чаще были инфицированы 16-м типом ВПЧ, во втором — 18-м), степенью дифференцировки (в общей когорте и при серозно-папиллярных аденокарциномах со снижением степени дифференцировки опухоли достоверно увеличивалась частота ВПЧ-инфицированных образцов), типом роста опухоли (среди опухолей с инфильтративным ростом ВПЧ-положительные встречались в 1,7 раза чаще, чем с экзофитным, и в 2,2 раза чаще, чем со смешанным).

С учетом того, что аденокарциномы эндометриального происхождения являются преимущественно ВПЧ-отрицательными, а эндоцервикального, напротив, ВПЧ-положительными, ряд авторов считают полезным использование теста на ВПЧ в случаях, когда сложно определить происхождение опухоли [10–12].

### Заключение

В ходе проведенного исследования установлен значительный уровень (54,4 %) распространенности 16-го и 18-го типов ВПЧ при РЭ у больных, проживающих на Юге России. Нами определена статистически значимая взаимосвязь статуса ВПЧ-инфицирования с отдельными клинико-морфологическими характеристиками опухоли (наличием плоскоклеточной метаплазии, степенью дифференцировки, типом роста опухоли). Это дает основание для более глубокого изучения вопроса о роли ВПЧ в развитии РЭ.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ferlay J., Soerjomataram I., Ervik M. et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Available at: <http://globocan.iarc.fr>.
2. Костин А.А., Старинский В.В., Самсонов Ю.В., Асратов А.Т. Анализ статистических данных о злокачественных новообразованиях, ассоциированных с вирусом папилломы человека. Исследования и практика в медицине 2016;3(1):66–78. [Kostin A.A., Starinskiy V.V., Samsonov Yu.V., Asratov A.T. The analysis of statistical data on malignant neoplasms associated with human papillomavirus. *Issledovaniya i praktika v meditsine = Research and Practice in Medicine* 2016;3(1):66–78. (In Russ.)].
3. A review of human carcinogens. B. Biological agents. IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Vol. 100(B). 2012. 485 p.
4. Giatromanolaki A., Sivridis E., Papazoglou D. et al. Human papillomavirus in endometrial adenocarcinomas: infectious agent or a mere “passenger”? *Infect Dis Obstet Gynecol* 2007;2007:60549. DOI: 10.1155/2007/60549. PMID: 18274613.
5. Fedrizzi E.N., Villa L.L., de Souza I.V. et al. Does human papillomavirus play a role in endometrial carcinogenesis? *Int J Gynecol Pathol* 2009;28(4):322–7. DOI: 10.1097/PGP.0b013e318199943b. PMID: 19483634.
6. Бабаева Н.А. Гормональный и инфекционный факторы канцерогенеза органов женской репродуктивной системы. Дис. ... д-ра мед. наук. М., 2013 [Babaeva N.A. Hormonal and infectious factors of carcinogenesis of organs of the female reproductive system. Thesis ... of doctor of medical sciences. Moscow, 2013. (In Russ.)].
7. Olesen T.B., Svahn M.F., Faber M.T. et al. Prevalence of Human Papillomavirus in endometrial cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gynecol Oncol* 2014;134(1):206–15. DOI: 10.1016/j.ygyno.2014.02.040. PMID: 24607284.
8. Гланц С. Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. М.: Практика, 1999. 459 с. [Glantz S. Primer of biostatistics. Moscow: Praktika, 1999. 459 p. (In Russ.)].
9. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002;2(5):342–50. DOI: 10.1038/nrc798. PMID: 12044010.
10. Jiang L., Malpica A., Deavers M.T. et al. Endometrial endometrioid adenocarcinoma of the uterine corpus involving the cervix: some cases probably represent independent primaries. *Int J Gynecol Pathol* 2010;29(2):146–56. DOI: 10.1097/PGP.0b013e3181b8e951. PMID: 20173500.
11. Jones M.W., Onisko A., Dabbs D.J. et al. Immunohistochemistry and HPV in situ hybridization in pathologic distinction between endocervical and endometrial adenocarcinoma: a comparative tissue microarray study of 76 tumors. *Int J Gynecol Cancer* 2013;23(2):380–4. DOI: 10.1097/IGC.0b013e31825cc8ee. PMID: 23318908.
12. Malpica A. How to approach the many faces of endometrioid carcinoma. *Mod Pathol* 2016;29 Suppl 1: S29–44. DOI: 10.1038/modpathol.2015.142. PMID: 26715172.

**Вклад авторов**

Т.А. Зыкова: обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи;  
 Т.И. Моисеенко: анализ данных, редактирование рукописи;  
 Е.М. Франциянц: разработка дизайна исследования;  
 М.А. Вовкочина: сбор данных для исследования, первичный анализ.

**Authors' contributions**

T.A. Zyкова: reviewing of publications of the article's theme, article writing;  
 T.I. Moiseenko T.I.: analysis of the data, article editing;  
 E.M. Frantsiyants: developing the research design;  
 M.A. Vovkochina: data accumulation for the study.

**ORCID авторов/ORCID of authors**

Т.А. Зыкова/T.A. Zyкова: <http://orcid.org/0000-0001-5345-4872>  
 Т.И. Моисеенко/T.I. Moiseenko: <http://orcid.org/0000-0003-4037-7649>  
 Е.М. Франциянц/E.M. Frantsiyants: <http://orcid.org/0000-0003-3618-6890>  
 М.А. Вовкочина/M.A. Vovkochina: <http://orcid.org/0000-0002-4901-250X>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Исследование проведено без спонсорской поддержки.

**Financing.** The study was performed without external funding.

**Статья поступила:** 21.05.2018. **Принята к публикации:** 14.08.2018.

**Article received:** 21.05.2018. **Accepted for publication:** 14.08.2018.