

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ПОЛИОМАВИРУСА КЛЕТОК МЕРКЕЛЯ И ЕГО КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ У ПАЦИЕНТОВ С КАРЦИНОМОЙ МЕРКЕЛЯ

К.В. Орлова, В.В. Делекторская, М.Г. Якубовская, Я.В. Вишневская, Т.Т. Кондратьева, Н.Ф. Орел, Л.В. Демидов

ФГБНУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина», г. Москва

Ключевые слова: карцинома Меркеля, нейроэндокринный рак кожи, полиомавирус, рак из клеток Меркеля, МСРyV
Карцинома Меркеля — редкая и часто агрессивная нейроэндокринная опухоль кожи, которая часто ассоциирована с полиомавирусом клеток Меркеля. Однако распространенность МСРyV и его влияние на прогноз до конца не изучены. Целью данного исследования явилось изучить распространенность полиомавируса клеток Меркеля и определить его клиническое значение среди популяции пациентов с карциномой Меркеля в России.

Карцинома Меркеля (КМ) по классификации ВООЗ — это редкая злокачественная первичная опухоль кожи с эпителиальной и нейроэндокринной дифференцировкой. Согласно современным эпидемиологическим данным, в США и некоторых странах Европейского союза заболеваемость КМ продолжает увеличиваться. Заболеваемость КМ, по данным Национального института рака США, составляет 0,6 случая на 100 000 в 2006 г. (0,15 случая на 100 000 в 1986 г.) с преобладанием мужчин (около 60%, по данным базы SEER) (рис. 1). Ежегодно в США регистрируется порядка 1500 новых случаев КМ [1].

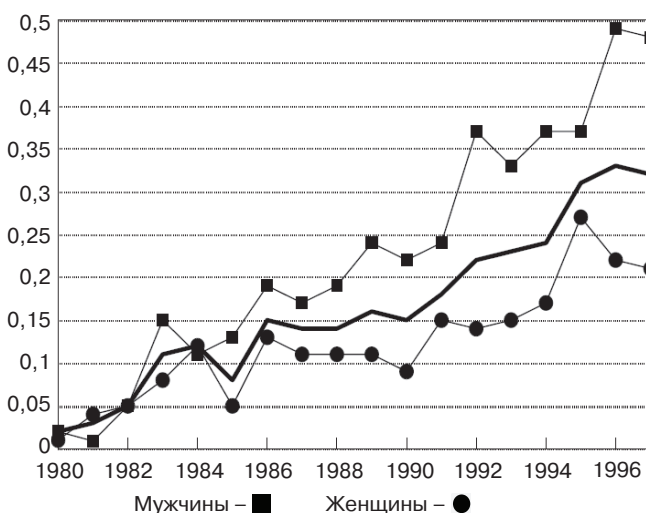


Рис. 1. Заболеваемость карциномой Меркеля по годам в США

Адрес для корреспонденции

Орлова К.В.

E-mail: krisman03@gmail.com

Для стран Европейского союза также существуют эпидемиологические данные; так, для Финляндии стандартизованный по возрасту показатель заболеваемости КМ на 100 000 населения увеличился с 0,17 в 1993–1997 гг. до 0,35 в 2003–2007 гг. Смертность от КМ, по данным разных авторов, варьирует от 33 до 46%. Эпидемиологических данных для России на сегодняшний день нет.

Существует несколько известных факторов риска развития КМ, что, вероятно, продолжает оказывать влияние на рост заболеваемости.

Возраст старше 65 лет (рис. 2). Средний возраст большинства (71,6%) пациентов на момент постановки диагноза составляет 69–70 лет [2], при этом наблюдается 5–10-кратное увеличение заболеваемости среди пациентов старше 70 лет по сравнению с пациентами, возраст которых менее 60 лет.

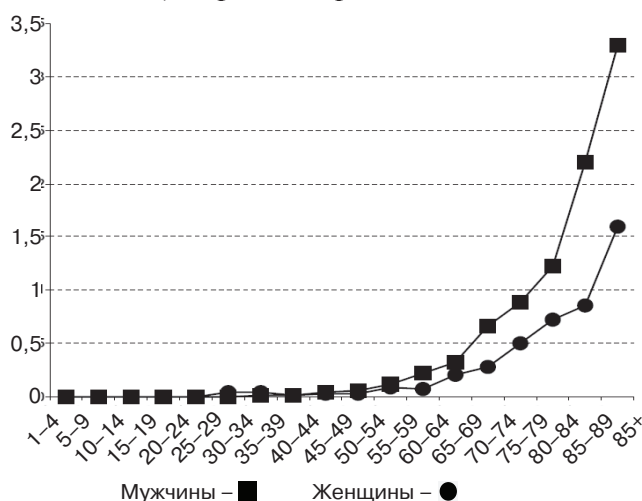


Рис. 2. Заболеваемость карциномой Меркеля в зависимости от возраста (Agelli и Clegg, 2003)

Воздействие солнца. Солнечный свет и длительное воздействие УФ связаны с увеличением риска развития КМ. Это еще подтверждает и тот факт, что КМ наиболее часто располагается на подверженных солнцу участках кожи (голова и шея, конечности).

Состояние иммуносупрессии. Наблюдается 2,3-кратное увеличение риска развития КМ среди пациентов, страдающих СПИД; ~5-кратное увеличение среди пациентов после трансплантации органа; 15,7-кратное увеличение риска развития карциномы Меркеля у пациентов с В-клеточными неоплазиями; чаще встречается у пациентов после трансплантации органа и с ВИЧ-инфекцией (12/100 000/год) и возраст их значительно моложе (около 50% <50 лет). Пациенты, которые получают лечение метоксаленом и PUVA по поводу псориаза, имеют 100-кратное увеличение риска заболеть КМ [3]. Интересно, что описано несколько клинических случаев спонтанной регрессии КМ после нормализации иммунной системы [4, 5]. Также в литературе описаны случаи спонтанной регрессии опухоли, которые чаще встречаются среди лиц женского пола.

Патогенез КМ полностью еще не изучен, но в настоящее время в литературе все чаще появляются работы, посвященные этой проблеме.

В январе 2008 г. Н. Feng и соавторы представили доказательства о возможном вирусном онкогенезе. Они исследовали образцы опухоли КМ и обнаружили новый полиомавирус, который был назван полиомавирусом клеток Меркеля (MCPyV или MCPyV). С открытием мышинного полиомавируса L. Gross в 1953 г. предполагалось, что полиомавирусы вызывают развитие рака у человека [6]. Хотя полиомавирусы могли вызывать развитие опухоли у животных, это еще не говорило о том, что они участвуют в канцерогенезе опухолей человека. Полиомавирусы часто вызывают латентные инфекции без манифестации болезни, но, например, на фоне иммуносупрессии могут вызывать развитие опухоли. На моделях животных возникновению опухоли обычно предшествует интеграция ДНК полиомавируса в геном клетки хозяина. Интересно, что Н. Feng и соавторы при изучении образцов КМ обнаружили слияние между Т-антигеном ранее не описанного вируса человека и протеиновой тирозинфосфатазой, рецепторный тип G. Дальнейшее исследование привело к идентификации и анализу последовательности 5387 пар оснований генома ранее неизвестного полиомавируса, который авторы работы назвали полиомавирусом клеток Меркеля. MCPyV последовательности были обнаружены у 8 из 10 (80%) образцов КМ, но только у 5 из 59 (8%) контрольных образцов из различных участков тела и у 4 из 25 (16%) контрольных образцов кожи.

Авторы описали, что в 6 из 8 MCPyV-положительных образцов КМ вирусная ДНК была найдена встроенной в геном опухоли [7]. Таким образом, авторы

делают вывод о том, что MCPyV может быть фактором в патогенезе КМ.

Изучение MCPyV представляет особый интерес: каким образом эта обычная инфекция приводит к появлению достаточно редких опухолей, ассоциированных с солнечным воздействием? Первичным процессом в MCPyV-индуцированном канцерогенезе является потеря иммунологического надзора. Карцинома Меркеля развивается в основном у пожилых людей и лиц со сниженным иммунитетом [8].

Геном MCPyV состоит из раннего и позднего регионов. Ранний регион представлен регионами большого Т-антигена (LT) и малого Т-антигена, которые кодируют белки, необходимые для репликации вируса. Поздний регион кодирует вирусные белки (VPS), ответственные за сборку капсида. LT-антиген содержит 3 разных домена: сайт связывания для белка ретинобластомы (опухолевый супрессор), сайт связывания белков теплового шока и хеликазного домена.

Цель работы: изучить распространенность полиомавируса клеток Меркеля и определить его клиническое значение среди популяции пациентов с карциномой Меркеля в России.

Материалы и методы. В исследование включены 32 пациента с морфологически подтвержденным диагнозом «карцинома Меркеля». Морфологическое исследование материала проводилось в соответствии с Международной гистологической классификацией опухолей кожи ВОЗ. Изучение MCPyV проводилось двумя методиками:

1) иммуногистохимическое (ИГХ) исследование с использованием моноклонального антитела против MCPyV Large T-ag, клон CM2B4, фирма «Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA»;

2) молекулярно-генетическое исследование — определение наличия ДНК полиомавируса клеток Меркеля в опухоли по фрагменту 3-го экзона большого Т-антигена (LT3), по фрагменту ДНК 1-го экзона большого Т-антигена (LT1), по фрагменту ДНК вирусного капсида (VP1).

Методы ИГХ оценки экспрессии MCPyV. При проведении оценки учитывалось только ядерное окрашивание. Цитоплазматическая экспрессия маркера не принималась во внимание. Экспрессия считалась позитивной при выявлении окрашенных ядер опухолевых клеток различной интенсивности и оценивалась с учетом количества антиген-позитивных клеток.

Позитивная иммунореактивность оценивалась от 1 до 3 баллов:

Критерии оценки иммунореактивности

1. Только ядерное окрашивание.
2. Процент окрашенных ядер клеток опухоли.
3. Интенсивность окрашивания.
4. Тип окрашивания ядер: равномерно диффузный или гетерогенный.

Система оценки ядерной экспрессии вируса представлена в табл. 1.

Таблица 1. Система оценки экспрессии МСРyV LT

Балл	Интенсивность и процент окрашенных ядер опухолевых клеток
0	Нет окрашенных ядер, полностью негативность реакции
1+	Окрашивание ядер <30% опухолевых клеток, низкая интенсивность, гетерогенная реакция
2+	Окрашивание ядер 30–75% опухолевых клеток, умеренная интенсивность, диффузная или гетерогенная реакция
3+	Окрашивание ядер большинства (>75%) опухолевых клеток, высокая интенсивность, диффузная позитивность

При дальнейшем анализе уровень позитивной иммунореактивности к МСРyV LT рассматривали в зависимости от полученного балла как высокий (3+), умеренный (2+) и низкий (1+).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Реакция проводилась в тонкостенных пробирках для ПЦР на амплификаторе «Терцик 1» (НПФ ДНК-Технология, Россия) и MJ Mini (BioRad, США). В качестве отрицательного контроля использовали бидистиллированную воду; в качестве положительного контроля для анализа наличия/отсутствия полиомавируса карциномы Меркеля использовали ДНК, выделенную из клеток мегакариобластного лейкоза линии MKL-1, положительных по полиомавирусу. Последовательности праймеров, которые были использованы в работе, представлены в табл. 2.

Таблица 2. Последовательности праймеров

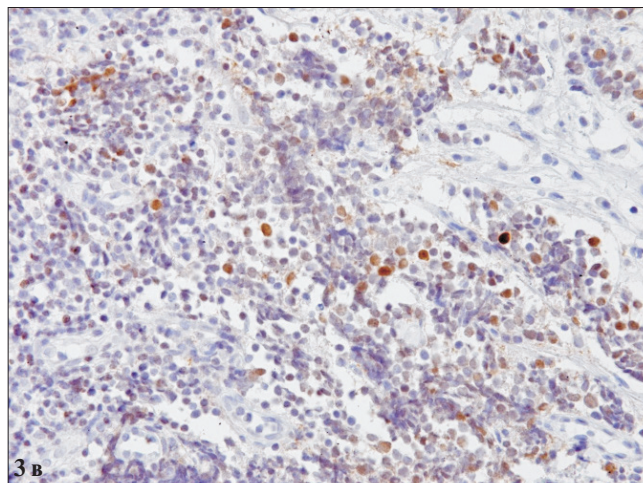
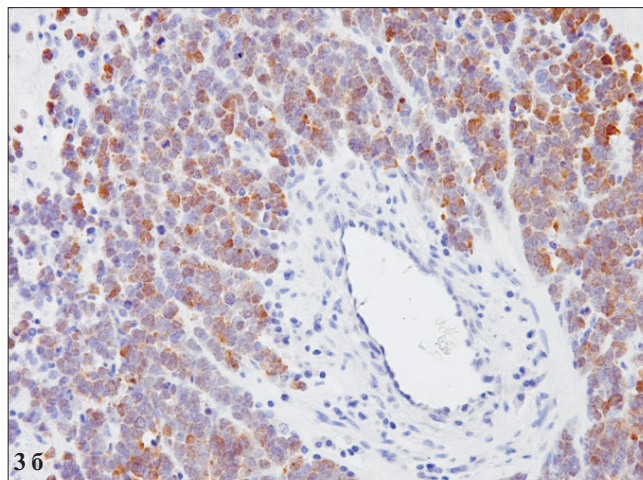
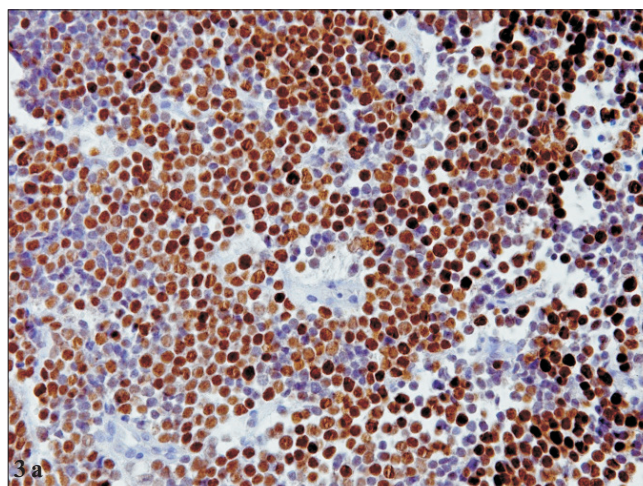
1. LT1-F	5'-TACAAGCACTCCACCAAAGC-3'
2. LT1-R	5'-TCCAATTACAGCTGGCCTCT-3'
3. LT3-F	5'-TTGTCTCGCCAGCATTTGTAG-3'
4. LT3-R	5'-ATATAGGGGCGCTCGTCAACC-3'
5. VP1-F	5'-TTTGCCAGCTTACAGTGTGG-3'
6. VP1-R	5'-TGGATCTAGGCCCTGATTTT-3'

Основные оцениваемые показатели: выживаемость без прогрессирования (ВБП) — время от начала терапии до прогрессирования болезни или летального исхода по любой причине; общая выживаемость (ОВ) — время от момента постановки диагноза до летального исхода по любой причине и опухоль-специфической выживаемости (ОСВ) — время от момента постановки диагноза до летального исхода на фоне прогрессирования КМ. Показатель ОСВ был введен по причине того, что в наш анализ вошли пациенты пожилого возраста, у которых при длительном сроке наблюдения летальный исход наступал не по причине прогрессирования КМ (а на фоне других сопутствующих заболеваний); а также

в анализ вошли пациенты с другими ЗНО (у двух пациентов летальный исход наступил по причине прогрессирования другого ЗНО).

Результаты

Впервые в России была определена ИГХ экспрессия **большого T-антигена МСРyV** в опухоли с использованием антител CM2B4 (Santa Cruz) (рис. 3).



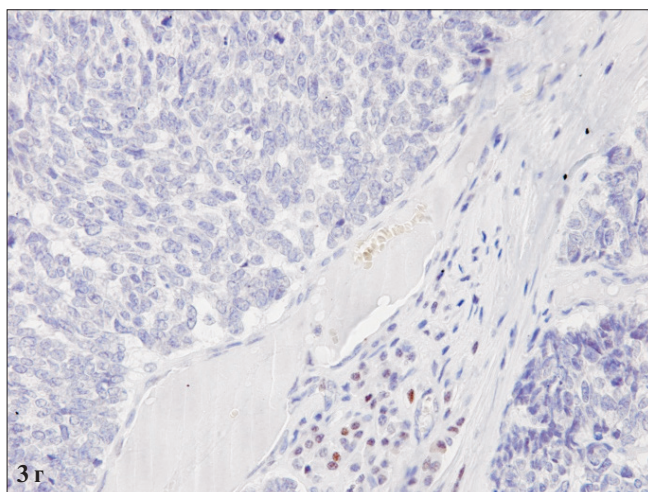


Рис. 3. Экспрессия большого Т-антигена MCPyV в клетках опухоли.

а. Выраженная ядерная экспрессия высокой интенсивности (3+) в большинстве опухолевых клеток. Ув. $\times 400$; б. Гетерогенная ядерная экспрессия (2+) в части опухолевых клеток. Ув. $\times 400$; в. Ядерная экспрессия (1+) умеренной интенсивности в отдельных опухолевых клетках. Ув. $\times 400$; г. Отсутствие ядерной экспрессии (0) в клетках опухоли. Ядра клеток докрашены гематоксилином Майера

При статистической обработке данных пациенты были распределены на две группы в зависимости от уровня экспрессии. Первая группа ($n=10$, 31%) соответствовала отсутствию / низкому уровню экспрессии, пациенты, имевшие значение экспрессии 0/1+; вторая группа ($n=22$, 69%) — соответствовала высокому уровню экспрессии и оценки реакции 2+/3+. При дальнейшей оценке влияния MCPyV на выживаемость пациенты с отдаленными метастазами на момент постановки диагноза исключены из анализа.

При статистической обработке данных и оценке влияния экспрессии Т-антигена MCPyV на медиану ВБП отмечена тенденция к статистическим различиям между группами (пациенты без отдаленных метастазов на момент постановки диагноза, $n=29$) (рис. 4). Так, медиана ВБП для первой группы ($n=8$) составила 12 мес, для второй ($n=21$) — 29 мес, $p=0,05$.

При оценке влияния на ОСВ (пациенты без отдаленных и регионарных метастазов на момент постановки диагноза, $n=22$) (рис. 5) также наблюдается тенденция к различию между первой ($n=8$) и второй ($n=14$) группами в сторону более лучшей ОСВ у пациентов второй группы ($p=0,06$).

В отделе химического канцерогенеза было проведено изучение 25 образцов ДНК, выделенных из срезов тканей, залитых в парафиновые блоки. В 19 образцах из 25 было продемонстрировано наличие ДНК полиомавируса Меркеля, причем 18 образцов (72%) были положительными по фрагменту 3-го экзона большого Т-антигена (LT3), 3 образца (12%) были положительны по фрагменту ДНК 1-го экзона большого Т-антигена (LT1), 12 образцов (48%) были положительны по фрагменту ДНК вирусного капсида (VP1). Необходимо отметить, что во всех образцах, положительных по VP1, было продемон-

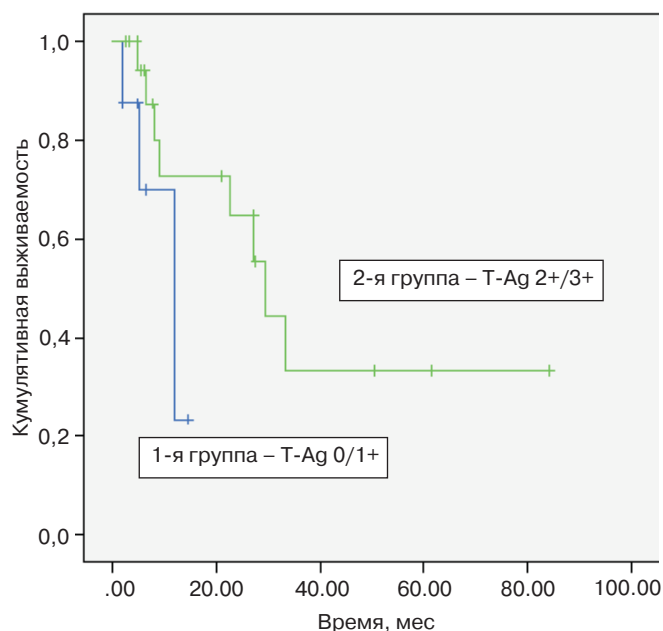


Рис. 4. ВБП в зависимости от уровня экспрессии Т-антигена MCPyV

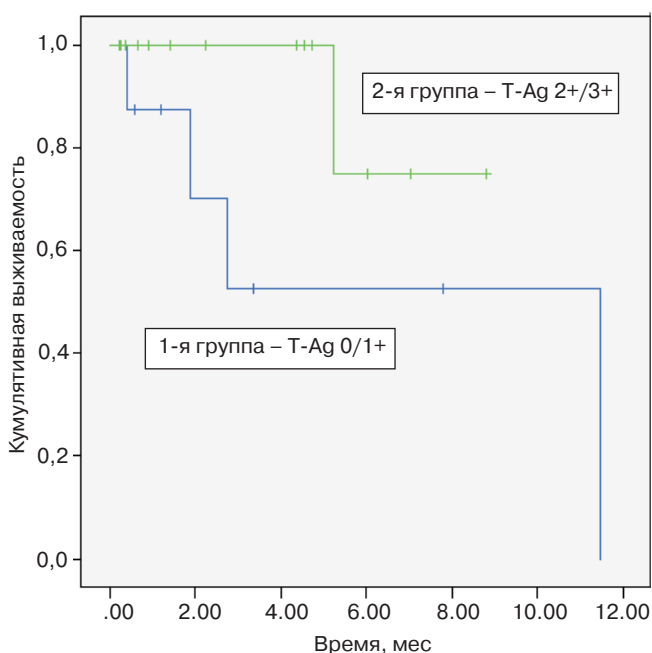


Рис. 5. ОСВ в зависимости от экспрессии Т-антигена MCPyV

стрировано наличие фрагмента LT3. В двух образцах ИГХ окрашивание на полиомавирус Меркеля дало отрицательный результат, в то время как ПЦР-анализ показал наличие вирусной ДНК в ткани. Это можно объяснить низким уровнем трансляции вирусной РНК в данных образцах, что ведет к низкому содержанию белка.

На рис. 6 представлены данные характеристического электрофореза ПЦР-продуктов из образцов, положительных по наличию вирусной ДНК (Дорожки 2–4: 2 – VP1+, LT33–VP+, 4 – VP1+, LT3+, LT1+, а также отрицательных по наличию вирусной ДНК (Дорожки 5–7). В качестве положительного

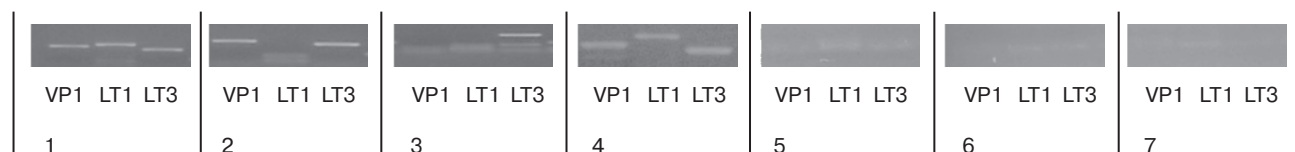


Рис. 6. Определение полиомавируса Меркеля в образцах ДНК, полученных от пациентов

контроля использовали ДНК клеток мегакариобластного лейкоза линии MKL1, присутствие вирусной ДНК в геноме которой ранее было показано [9]. Положительный контроль — ДНК клеток мегакариобластного лейкоза линии MKL1 любезно предоставлен Paul Nghiem (University of Washington, Skin Oncology Clinical Program, Seattle Cancer Care Alliance, Сиэтл, Вашингтон).

Заключение. Карцинома Меркеля (синонимы: рак из клеток Меркеля, нейроэндокринный рак кожи, мелкоклеточный рак кожи) — это опухоль, которая долгое время оставалась «опухолью-загадкой» для клиницистов. Это можно объяснить как редкой встречаемостью данной опухоли, так и отсутствием понимания механизмов канцерогенеза и молекулярно-биологических свойств данной опухоли. Интерес к изучению КМ в мире увеличился после идентификации полиомавируса клеток Меркеля в 2008 г. и появлении сведений о его возможной роли в канцерогенезе данной опухоли, с одной стороны [7]. А с другой стороны — в связи с ростом заболеваемости. На протяжении последних 5–6 лет представления о возможных механизмах канцерогенеза КМ стали наполняться реальным смыслом.

Целью данной работы явилось изучение распространенности MCPyV и определение его клинического значения среди популяции пациентов с карциномой Меркеля в России для более четкого понимания механизмов канцерогенеза, а также попытки выявления фактора прогноза заболевания. Как видно из результатов работы, данные ИГХ-метода и ПЦР сопоставимы с точки зрения определения наличия MCPyV. Использование ИГХ-метода для определения экспрессии Т-Ag MCPyV возможно с использованием антител клон CM2B4, фирма «Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA». В литературе важность Т-Ag была продемонстрирована Houben и соавторами, где было показано, что экспрессия необходима для поддержания MCPyV-позитивных

опухолей. Наличие или отсутствие MCPyV в опухоли может рассматриваться как прогностический фактор. Данные нашего исследования демонстрируют лучшую выживаемость пациентов при наличии MCPyV. Для определения мутаций в Т-Ag, которые, возможно, приводят к злокачественному росту, необходимо использование молекулярно-генетического исследования (определение мутаций в Т-Ag MCPyV не входило в задачи данного исследования).

С открытием MCPyV и вирусного онкогенеза КМ, возможно, открылись новые терапевтические пути, такие как использование интерферонов, а также препаратов, восстанавливающих иммунный контроль над опухолью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Schrama D., Peitsch W. et al. Merkel cell polyomavirus status is not associated with clinical course of Merkel cell carcinoma. *J. Invest. Dermatol.* 2011, v. 131, p. 1631-1638.
2. Albores-Saavedra J., Batich K., Chable-Montero F. Merkel cell carcinoma demographics, morphology, and survival based on 3870 cases: a population based study. *J. Cutan. Pathol.* 2010, v. 37 (1), p. 20-27.
3. Lunder E.J., Stern R.S. Merkel-cell carcinomas in patients treated with methoxsalen and ultraviolet A radiation. *N. Engl. J. Med.* 1998, v. 339, p. 1247-1248.
4. Houben R., Michel B., Vetter-Kauczok C.S. Absence of classical MAP kinase pathway signalling in Merkel cell carcinoma. *J. Invest. Dermatol.* 2006, v. 126, p. 1135-1142.
5. Turk T., Crncevic Z. et al. Spontaneous regression of Merkel cell carcinoma in a patient with chronic lymphocytic leukemia: a case report. *Journal of Medical Case Reports.* 2009, No. 3, p. 7270.
6. Gross L. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1953, v. 83, p. 414. [PubMed: 13064287].
7. Feng H., Shuda M., Chang Y., Moore P. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science.* 2008, v. 319, p. 1096-1100.
8. Киселев Ф.Л., Имянитов Е.Н., Киселева Н.П., Левина Е.С. Молекулярная онкология: от вирусной теории к лечению рака. М.: ГЕОС. 2013, с. 38-40.
9. Rodig S.J., Cheng J., Wardzala J. et al. Improved detection suggests all Merkel cell carcinomas harbor Merkel polyomavirus. *J. Clin. Invest.* 2012, v. 122, p. 4645-4653.

Статья поступила 12.11.2014 г., принята к печати 10.12.2014 г.

Рекомендована к публикации Б.Ю. Бояном

PREVALENCE AND CLINICAL SIGNIFICANCE OF MERKEL CELL POLYOMAVIRUS IN MERKEL CELL CARCINOMA

Orlova K.V., Delektorskaya V.V., Yakubovskaya M.G., Vishnevskaya Y.V., Kondratieva T.T., Orel N.F., Demidov L.V.

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow, Russian Federation

Key words: Merkel cell carcinoma, neuroendocrine skin cancer, polyomavirus, MCPyV

Merkel cell carcinoma (MCC) is a rare and aggressive neuroendocrine skin cancer that is often associated with Merkel cell polyomavirus (MCPyV) infection. MCPyV prevalence and its relationship with clinical features and prognosis in MCC remain unclear. The aim of the study was to investigate the frequency and pattern of the MCPyV expression in primary and metastatic tumors from patients with MCC and evaluate the role of MCPyV in prognosis of patients with MCC in Russia.