

## Роль вируса папилломы человека в развитии эпителиальных опухолей молочной железы

А.В. Лагуева<sup>1,2</sup>, Н.Г. Плехова<sup>1</sup>, А.А. Цибулина<sup>1</sup>,  
Ю.И. Гаман<sup>1</sup>, А.А. Семенова<sup>1,3</sup>, В.И. Апанасевич<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО Тихоокеанский государственный медицинский университет Минздрава России, Владивосток, Россия

<sup>2</sup> ГБУЗ Приморский краевой онкологический диспансер, Владивосток, Россия

<sup>3</sup> КГАУЗ Владивостокская клиническая больница № 2, Владивосток, Россия

**Резюме.** *Введение.* Этиологическим фактором развития гиперпластических процессов в эпителии молочной железы с формированием доброкачественной и злокачественной опухоли считают вирусную инфекцию. Вирус папилломы человека (ВПЧ) называют предполагаемой причиной развития рака молочной железы. Цель исследования – определить наличие белков Е6 и L1 ВПЧ высокого онкогенного риска в опухолевых тканях молочной железы при доброкачественных и злокачественных процессах.

*Материалы и методы.* Выполнен ретроспективный анализ историй болезни 608 пациенток, оперированных по поводу внутрипротоковой папилломы (n=304) и по поводу других доброкачественных новообразований молочной железы (n=304), на сопряженность с последующим развитием рака молочной железы. Проведено иммуногистохимическое исследование на наличие белков раннего Е6 ВПЧ типов 16, 18 и позднего L1 ВПЧ типов 1, 6, 11, 16, 18, 31 и показателя пролиферации Ki-67 в тканях доброкачественных и злокачественных эпителиальных опухолей молочной железы.

*Результаты.* Установлено повышение риска развития рака молочной железы в 2,3 раза для пациенток с внутрипротоковой папилломой в анамнезе. Большинство образцов с позитивной реакцией на белок Е6 обнаружено в группе опухолей с наличием структур внутрипротоковой папилломы, реакция на белок L1 отмечалась примерно в равном числе образцов во всех группах доброкачественных опухолей. Определена прямая умеренная корреляция между показателями синтеза белков Ki-67 и L1 ( $R=0,54$ ;  $r=0,0057$ ) при внутрипротоковой папилломе, указывающая на продуктивную инфекцию и возможное участие белка L1 в пролиферации эпителия данного типа опухолей. В образцах злокачественных новообразований и при доброкачественной пролиферации установлена слабая корреляция ( $R=0,47$ ;  $r=0,0172$ ) между Ki-67 и показателями Е6, L1, что, вероятно, связано с отсутствием продуктивной инфекции в этих типах тканей.

*Заключение.* Исследование показало возможное участие белков Е6, L1 вируса папилломы человека в развитии пролиферативных процессов в молочной железе. Внутрипротоковая папиллома в анамнезе пациенток повышает риск развития рака молочной железы. Изучение синтеза белков Е6 и L1 в комплексе позволяет уточнить стадию жизненного цикла вируса папилломы человека, а сопряжение этих значений с показателем Ki-67 дает информацию о возможном риске прогрессирования доброкачественного процесса в злокачественный.

**Ключевые слова:** опухоль молочной железы, рак молочной железы, онковирусы, вирус папилломы человека (ВПЧ), внутрипротоковая папиллома

**Для корреспонденции:** Александра Викторовна Лагуева. E-mail: sandy767@mail.ru

**Для цитирования:** Лагуева А.В., Плехова Н.Г., Цибулина А.А., Гаман Ю.И., Семенова А.А., Апанасевич В.И. Роль вируса папилломы человека в развитии эпителиальных опухолей молочной железы. Клини. эксп. морфология. 2024;13(1):24–33. DOI: 10.31088/СЕМ2024.13.1.24-33.

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке внутривузовского гранта Тихоокеанского государственного медицинского университета Минздрава России (№ ААА-А17-117013050044-8).

Статья поступила 24.08.2023. Получена после рецензирования 06.09.2023. Принята в печать 20.11.2023.

# The role of human papillomavirus in the epithelial breast tumor formation

A.V. Lagureva<sup>1,2</sup>, N.G. Plekhova<sup>1</sup>, A.A. Tsiulina<sup>1</sup>, Yu.I. Gaman<sup>1</sup>, A.A. Semenova<sup>1,3</sup>, V.I. Apanasevich<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia

<sup>2</sup> Primorsky Regional Oncological Center, Vladivostok, Russia

<sup>3</sup> Vladivostok Clinical Hospital No. 2, Vladivostok, Russia

**Abstract. Introduction.** Viral infection is considered an etiological factor for the development of hyperplastic processes in the breast epithelium leading to the formation of benign and malignant tumors. Human papillomavirus (HPV) is suspected to cause breast cancer. The aim of the study was to determine the presence of proteins E6 and L1 in breast tumor tissues in benign and malignant lesions, since they are considered to be highly oncogenic in HPV.

**Materials and methods.** We conducted a retrospective analysis of 608 medical records of patients operated on intraductal papilloma (n=304) and other benign breast tumors to determine their association with subsequent breast cancer development. An immunohistochemical study was carried out to determine the presence of proteins of early E6 HPV types 16 and 18; late L1 HPV types 1, 6, 11, 16, 18, and 31; and the proliferation Ki-67 in the tissues of benign and malignant epithelial breast tumors.

**Results.** The patients with a history of intraductal papilloma were found to have a 2.3-fold increased risk of developing breast cancer. The majority of samples with a positive reaction to the E6 protein were detected in the group of tumors with the intraductal papilloma structures; the reaction to L1 protein was observed in approximately equal numbers of samples in all groups of benign tumors. A direct moderate correlation was determined between the parameters of protein synthesis Ki-67 and L1 ( $R=0.54$ ;  $p=0.0057$ ) in intraductal papilloma, indicating a productive infection and possible participation of the L1 protein in the epithelial proliferation of benign tumors. In cancer samples and benign proliferation, we determined a weak correlation ( $R=0.47$ ;  $p=0.0172$ ) between Ki-67 and E6 and L1 parameters, which is likely to be explained by the absence of productive infection in both benign and malignant tumors of the breast.

**Conclusion.** The study showed possible participation of HPV proteins E6 and L1 in the development of proliferative processes in the breast. A history of intraductal papilloma increases the risk of developing breast cancer. Studying the synthesis of proteins E6 and L1 combined makes it possible to determine the stage of the life cycle of HPV. Pairing these values with the Ki-67 index provides information about possible risks of a benign lesion development into a malignant one.

**Keywords:** breast tumor, breast cancer, oncoviruses, human papillomavirus (HPV), intraductal papilloma

**Corresponding author:** Alexandra V. Lagureva. E-mail: sandy767@mail.ru

**For citation:** Lagureva A.V., Plekhova N.G., Tsiulina A.A., Gaman Y.T., Semenova A.A., Apanasevich V.I. The role of human papillomavirus in the epithelial breast tumor formation. Clin. exp. morphology. 2024;13(1):24–33 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2024.13.1.24-33

**Funding.** The study was supported with the internal university grant of the Pacific State Medical University (No. AAA-A17-117013050044-8).

**Received** 24.08.2023. **Received in revised from** 06.09.2023. **Accepted** 20.11.2023.

## Введение

При злокачественных новообразованиях (ЗНО) молочной железы поражаются эпителиальные клетки протоков или долек [1, 2]. Согласно клиническим рекомендациям «Рак молочной железы» (2021), среди пролиферативных образований молочной железы выделяют доброкачественные эпителиальные пролиферации, папиллярные опухоли, неинвазивные и инвазивные карциномы. Проллиферативные поражения, в особенности атипичная протоковая гиперплазия, повышают риск развития ЗНО примерно на 1% в течение каждого года после постановки диагноза [3]. Такой тип поражения обнаруживают при фибroadеномах, фибroadеноматозах с наличием внутрипротоковых папиллом и склерозирующих аденозах, где пролиферация затрагивает

эпителиальные и миоэпителиальные клетки. Считаясь доброкачественным поражением, атипичная гиперплазия тем не менее рассматривается как заболевание, склонное к рецидивам и имеющее повышенный риск малигнизации [4].

Дисгормональные нарушения считаются причинами развития гиперпластических процессов в молочной железе, до 44% биопсий имеет положительный рецепторный статус к эстрогенам. В качестве триггеров малигнизации клеток также рассматривают онкогенные вирусы, тропные эпителиальным клеткам, – вирусы папилломы человека (ВПЧ) [5]. Установлено более 200 генотипов ВПЧ, сопровождающих развитие доброкачественных и злокачественных поражений. Доказано, что ВПЧ высокого

онкогенного риска типов 16, 18 и 31 инициируют развитие рака шейки матки, исследованы молекулярные механизмы трансформации белка p53 с участием вирусных белков E6/E7 в клетках этой опухоли [6, 7]. Приведены сведения, что в 86% случаев рака молочной железы (РМЖ) в опухолевой ткани определяется ДНК ВПЧ, в доброкачественных поражениях – до 74%, в нормальных тканях молочной железы – до 30% [1, 2]. При РМЖ определены типы ВПЧ (6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 45 и 52), из которых чаще встречается тип 16 (от 13 до 66% случаев) и тип 18 (от 20 до 55% случаев) [8, 9]. Показано, что белки E6/E7 ВПЧ выявлены в ткани опухоли у пациенток с РМЖ в 24–76% наблюдений, и приведены доказательства участия этих белков в малигнизации клеток на модели *in vitro*, что указывает на функциональную значимость вируса в развитии опухоли [10]. Так, белки E6/E7 усиливают клеточную пролиферацию, нарушая регуляцию генов *BRCA-1*, *TP53* и активность рецепторов к эпидермальному фактору роста 2-го типа HER2 [11]. Показано, что у пациенток выявлялся одинаковый тип ВПЧ как при доброкачественном опухолевом процессе, так и при последующем РМЖ [12]. Таким образом, ВПЧ вполне оправданно может рассматриваться в качестве этиологического фактора, вызывающего пролиферацию эпителия молочной железы и последующее развитие доброкачественной или злокачественной опухоли. С учетом изложенного выше целью нашего исследования стало определение наличия белков E6 и L1 ВПЧ в опухолевых тканях молочной железы.

## Материалы и методы

Выполнен анализ сопряженности наличия внутрипротоковой папилломы молочной железы в анамнезе и развившегося впоследствии РМЖ у 608 пациенток (возраст от 22 до 82 лет) с пролиферативным поражением молочных желез, обратившихся в маммологический центр Владивостока в период с 2014 по 2022 год. В группу наблюдения были включены 304 истории болезни пациенток, имевших в анамнезе операцию по удалению внутрипротоковой папилломы, группу сравнения составили 304 истории болезни без подобного анамнеза. Образцы для исследования были деидентифицированы, согласие пациенток не требовалось. Исследование одобрено этическим комитетом Тихоокеанского государственного медицинского университета (протокол № 3 от 16.11.2020).

Проведено иммуногистохимическое (ИГХ) исследование 134 образцов доброкачественных опухолей молочных желез, полученных у пациенток ООО «Инномед-Плюс» при хирургическом удалении, и 95 образцов тканей злокачественных эпителиальных опухолей, выбранных из архива Приморского краевого онкологического диспансера (Владивосток). Кусочки биопсий фиксировали в 10% нейтральном формалине, обезвоживали по стандартной методике в спиртовых

растворах возрастающей концентрации и ксилоле, заливку в парафин проводили с использованием заливочной станции Leica EG1150H (Leica Biosystems, Германия). Из парафиновых блоков на ротационном микротоме Leica RM 2245 (Leica Biosystems, Германия) готовили серийные срезы толщиной 5 мкм. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, гистологический тип опухоли молочных желез устанавливали согласно международной гистологической классификации ВОЗ (2019). Образцы были разделены на три группы: доброкачественная пролиферация эпителия (n=54), внутрипротоковая папиллома (n=80), ЗНО (n=95). В качестве контроля были использованы образцы здоровой ткани молочных желез, прилегающей к доброкачественным опухолям (n=36).

Иммуногистохимическое исследование проводили с использованием поликлональных антител мыши против белка E6 ВПЧ типов 16, 18 (1:100, клон PA5-12038, Invitrogen, США), моноклональных антител мыши против капсидного белка L1 ВПЧ типов 1, 6, 11, 16, 18, 31 (1:30, BPV-1/1H8 + CAMVIR, Abcam, США), маркера пролиферации Ki-67 (1:20; клон MIB-1, изотип IgG1, Dako, Дания). Положительным контролем служили образцы тканей рака шейки матки человека, позитивные на ВПЧ типов 16, 18, негативным – образцы исследуемой ткани без нанесения первичных антител. Препараты анализировали с помощью светового микроскопа Olympus CX41, оснащенного цифровой камерой U-TV0.35XC-2 (Olympus, Япония).

Морфометрический анализ проводили, применяя программу NIS-Elements BR (Nikon, Япония) и оценивая количество продуктов ИГХ реакции по 10 изображениям при 200-кратном увеличении. Пороговые значения настраивали по областям высокой оптической плотности и контрастности с формированием бинара. Для каждого образца проводилось измерение бинаров, высчитывалось среднее значение интенсивности позитивного окрашивания, количества, площади и периметра бинаров, результат выражали в пикселях.

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения Statistica 12 (StatSoft, Inc., США) и Microsoft Excel (Microsoft Office 2016). Для проверки нормальности распределения использовали критерии Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка. Данные измерений с нормальным распределением представляли как значение среднего и стандартного отклонения ( $m \pm SD$ ), в случаях несоответствия нормальному – как значение медианы (Me) и квартилей (Q1; Q3). Достоверность различий при сравнении двух групп независимых данных при нормальном распределении оценивали с помощью t-критерия Стьюдента, в иных случаях использовали непараметрический H-критерий Краскела–Уоллиса. Коэффициент корреляции Пирсона применяли для оценки линейной зависимости между показателями. Показатели считались достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## Результаты

Когортное ретроспективное исследование включало данные историй болезни 608 пациенток из базы канцер-регистра Приморского краевого онкологического диспансера, у которых были выявлены ЗНО различных локализаций, в том числе РМЖ [13]. Установлено, что в группе наблюдения у семи из 304 пациенток (2,3%) с внутрипротоковой папилломой в анамнезе впоследствии развился РМЖ. В группе сравнения у трех из 304 пациенток (1,0%) впоследствии зарегистрировали РМЖ. Выявлены ЗНО других локализаций у шести из 304 пациенток (2,0%) в каждой группе. Общее количество ЗНО в группе наблюдения составило 13 случаев из 304 (4,3%) и девять из 304 (3,0%) в сравнительной группе пациенток. Таким образом, определено повышение риска развития РМЖ в 2,3 раза для пациенток с внутрипротоковой папилломой молочных желез в анамнезе.

Синтез онкобелка Е6 внутри клетки-мишени осуществляется на ранней стадии жизненного цикла вируса, нарушает функционирование белка апоптоза p53, что приводит к трансформации клетки. Капсидный белок L1 синтезируется в созревающих клетках эпителия на последней стадии развития вириона. Обнаружение белка L1 в клетках свидетельствует о продуктивной фазе вирусной инфекции с образованием эписомы. Экспрессия белка пролиферативной активности Ki-67 является клинически значимой величиной для определения молекулярного подтипа опухоли, а также сильным прогностическим фактором эффективности лечения РМЖ [14].

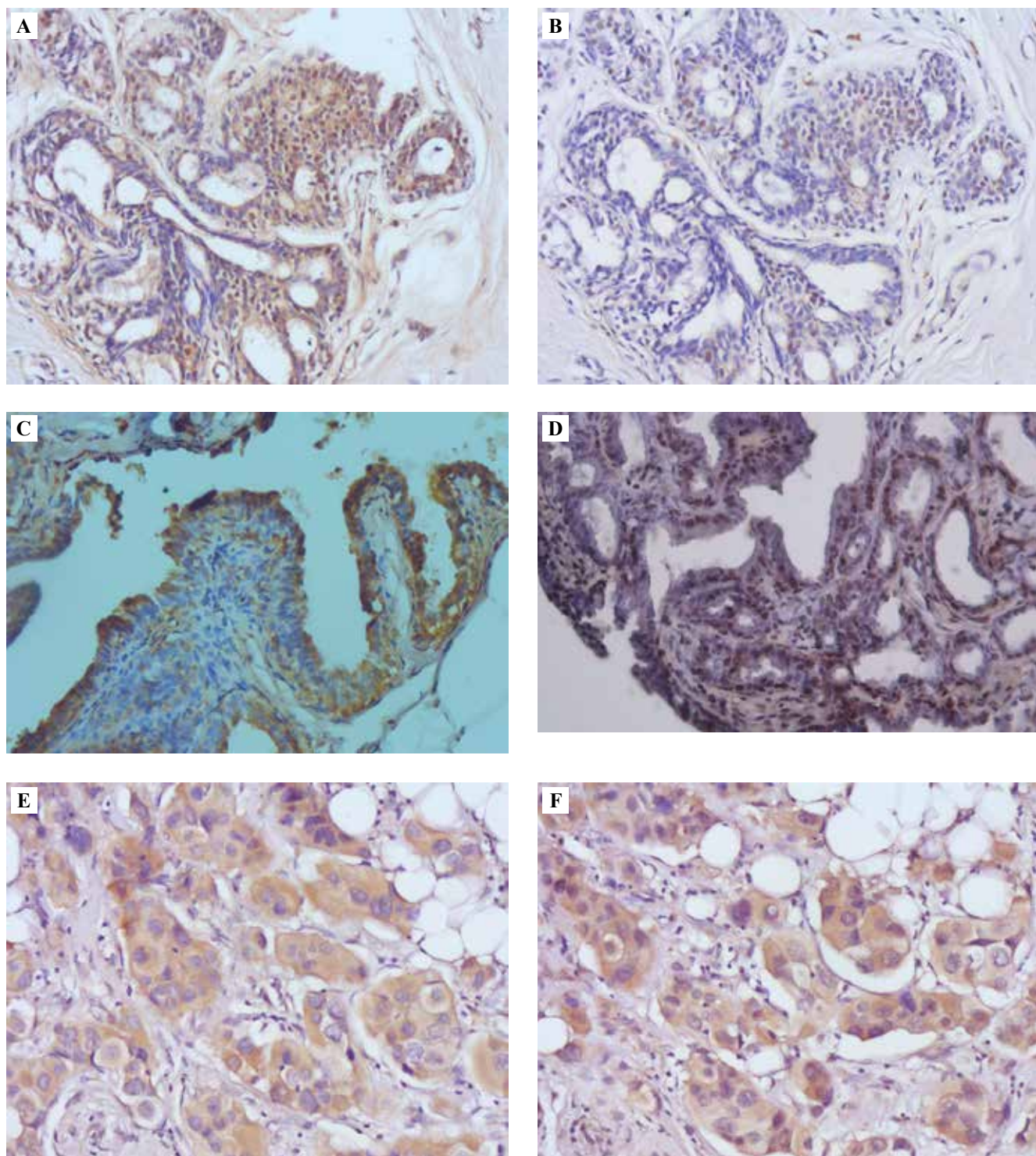
Позитивная реакция на белки Е6, L1 обнаруживалась в цитоплазме и ядрах клеток эпителия молочной железы (рис. 1). При доброкачественной пролиферации эпителия в тканях молочной железы белок Е6 отмечался в 56% образцов (30 из 54) (рис. 1 А), белок L1 – в 41% образцов (22 из 54) (рис. 1 В). При внутрипротоковой папилломе позитивная реакция на белок Е6 отмечена в 70% случаев (56 из 80) (рис. 1 С), на L1 – в 44% образцов (35 из 80) (рис. 1 D). Наличие белков Е6 и L1 в одних и тех же образцах обнаруживалось в 40% случаев (32 из 80). В 21% случаев ЗНО (20 из 95) мы наблюдали позитивную реакцию различной интенсивности на белок Е6 и в 33% образцов (31 из 95) – на белок L1 (рис. 1 Е, F). Одновременное наличие Е6 и L1 зарегистрировано в 19% случаев ЗНО (18 из 95). В контрольных образцах отмечено 25% случаев (девять из 36) положительных реакций на белок Е6, и 28% (10 из 36) на белок L1. Таким образом, наибольшее количество образцов с позитивной реакцией на белок Е6 (70%) обнаружено в тканях молочной железы с наличием структур внутрипротоковой папилломы. Позитивная реакция на белок L1 регистрировалась во всех группах доброкачественных опухолей примерно одинаково – 41% в группе с доброкачественной пролиферацией и 44% с внутрипротоковой папилломой. Необходимо отметить, что количество Е6- и L1-позитивных образ-

цов в группе ЗНО и в контрольной группе определялось приблизительно в равном количестве.

Проведен морфометрический анализ интенсивности ИГХ реакции, алгоритм которого представлен на рисунках 2 А, В. Установлены количественные показатели выявления белка в образцах с внутрипротоковой папилломой, которые составили для белка Е6 122,53 пикселя (82,91; 182,81), для L1 – 86,79 (57,59; 125,80). При доброкачественной пролиферации эпителия значения были равны 102,11 пикселя (72,05; 123,13) и 78,90 (65,22; 104,32), при ЗНО – 86,55 (72,93; 105,47) и 60,16 (44,26; 75,32), соответственно (рис. 3 А, В). В реальной практике количественную оценку интенсивности ИГХ реакции с привлечением морфометрического анализа проводят редко, обычно используют визуальный метод определения интенсивности реакции либо подсчитывают количество окрашенных клеток в процентах. Подобный метод субъективен, и зачастую данные расходятся при повторных оценках экспрессии маркеров. Мы разработали собственную шкалу референсных значений для установки соответствия между качественными и количественными морфометрическими показателями. Так, в качестве отрицательной реакции (–) было принято значение до 49 пикселей, слабая положительная реакция (+) составила от 50 до 65 пикселей, умеренная положительная (++) от 66 до 150 пикселей и сильная положительная (+++) от 151 пикселя и выше. С учетом принятых референсных значений определяли степень интенсивности ИГХ реакции белков в эксперименте (табл.).

Наибольший размах значений и максимальную интенсивность реакции на белки Е6 и L1 ВПЧ показали образцы с внутрипротоковой папилломой, что подтверждает мнение о данном поражении как о склонном к прогрессированию и малигнизации. Показатели интенсивности реакции на белки Е6 и L1 в образцах доброкачественных пролиферативных опухолей и при внутрипротоковой папилломе не имели существенных различий, однако размах крайних значений был меньше. Образцы ЗНО показали умеренную интенсивность синтеза белков, а количественные значения интенсивности реакции на белок L1 статистически не различались с показателями контрольной группы. Необходимо отметить, что количественные показатели интенсивности часто перекрываются между группами, не позволяя четко разграничить их соответственно гистологическому типу опухоли.

Определяли связь между наличием в тканях вирусных белков и маркером пролиферации Ki-67. Производился подсчет не менее 500 клеток в трех полях зрения при увеличении объектива  $\times 40$ , индекс Ki-67 определялся как отношение среднего количества положительно окрашенных клеток к общему количеству клеток. В образцах с доброкачественной пролиферацией определялись низкие значения индекса Ki-67, от 0 до 5%, что соответствует уровню пролиферации клеток нормальных тканей. Индекс Ki-67 в образцах



*Рис. 1.* Позитивная реакция на наличие белков ВПЧ Е6 (А, С, Е) и L1 (В, D, F) в клетках протоков молочной железы. А, В – доброкачественная пролиферация эпителия, С, D – внутрипротоковая папиллома, Е, F – рак молочной железы. ИГХ окрашивание,  $\times 200$

*Fig. 1.* Positive reaction to the presence of HPV E6 (A, C, E) and L1 (B, D, F) in the cells of breast ducts. A, B – benign epithelial proliferation, C, D – intraductal papilloma, E, F – breast cancer. IHC stain,  $\times 200$



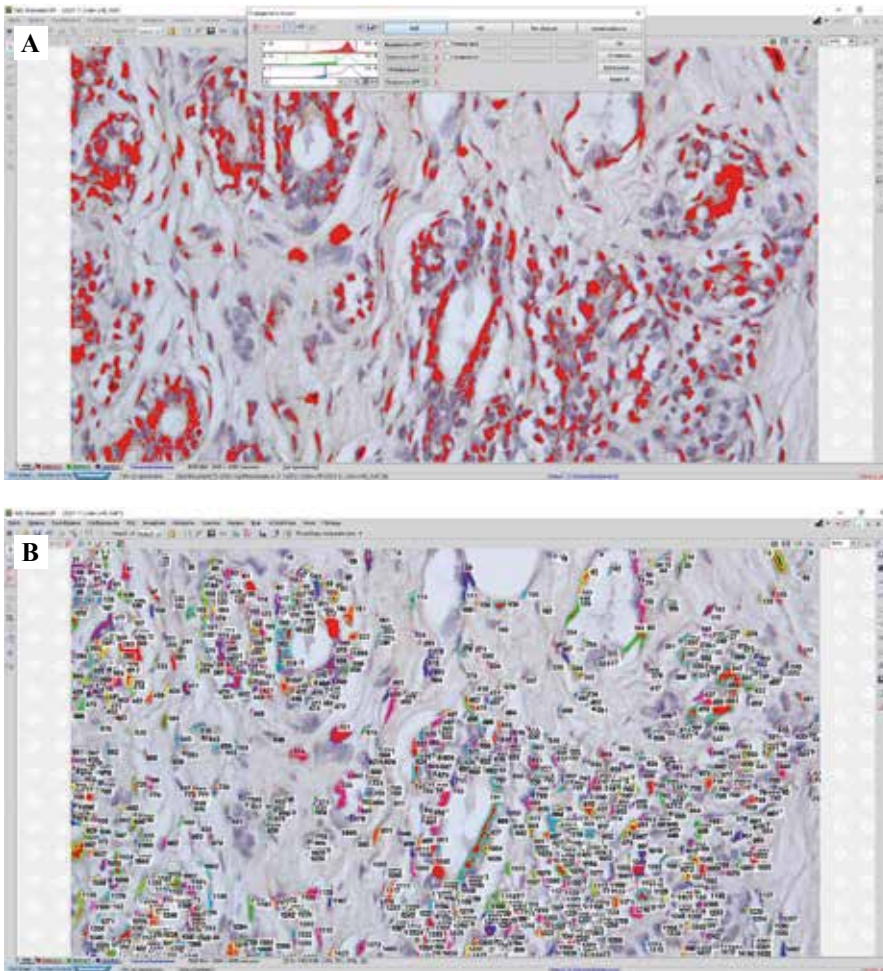


Рис. 2. Алгоритм морфометрического анализа степени интенсивности ИГХ окрашивания. А – выделение бинарной площади ROI по цветовым характеристикам, В – измерение выделенных бинаров

Fig. 2. The algorithm of morphometric analysis of IHC stain intensity degree. А – allocation of the binary area of the ROI by color characteristics, В – binary image: measurement of the selected intensity values

Таблица | Table

**Качественная и количественная характеристика наличия белков Е6 и L1 ВПЧ в тканях молочной железы |  
Qualitative and quantitative characteristics of HPV proteins E6 and L1 in the breast tissue**

Гистологический тип опухоли   Tumor histology	Показатели интенсивности и качественные характеристики позитивной реакции   Intensity indicators and qualitative characteristics of a positive reaction	
	белок Е6 ВПЧ типа 16,18   HPV E6 protein 16 and 18	капсидный белок L1 ВПЧ типа 1, 6, 11, 16, 18, 31   HPV capsid protein L1 1, 6, 11, 16, 18, and 31
Ткань, прилегающая к опухоли   Tissue adjacent to the tumor	50,47 (35,33; 74,52) положительная от слабой до умеренной (+/++)   positive from mild to moderate (+/++)	46,14 (37,12; 64,54) от отрицательной до слабой положительной (-/+)   from negative to weak positive (-/+)
Доброкачественная пролиферация эпителия   Benign epithelial proliferation	102,11 (72,05; 123,13)* положительная умеренная (++)   positive moderate (++)	78,90 (65,22; 104,32)* положительная умеренная (++)   positive moderate (++)
Внутрипротоковая папиллома   Intraductal papilloma	122,53 (82,91; 182,81)* положительная, от умеренной до сильной (++)   positive, moderate to strong (++)	86,79 (57,89; 127,54)* положительная умеренная (++)   positive moderate (++)
Рак молочной железы   Breast cancer	86,55 (72,93; 105,47)* положительная умеренная (++)   positive moderate (++)	60,16 (44,26; 75,32) от отрицательной до слабой положительной (-/+)   from negative to weak positive (-/+)

\*различия между показателями контрольных и патологических образцов достоверны при  $p < 0,05$

\*differences between the indicators of control and pathological samples are significant at  $p < 0.05$

ЗНО имел различные значения в соответствии с молекулярно-биологическим подтипом опухоли.

Количественные показатели интенсивности реакции на белок Ki-67 составили в пикселях 37,10 (13,10; 55,53) в образцах с доброкачественной пролиферацией, 10,17 (7,59; 24,91) в образцах с внутрипротоковой папилломой и 56,01 (23,85; 148,85) в образцах ЗНО (рис. 3 С). Обнаружена слабая корреляция между показателями E6, L1 и маркером Ki-67 при доброкачественной пролиферации и ЗНО ( $R=0,47$ ;  $p=0,0172$ ), указывающая на отсутствие продуктивной инфекции. При внутрипротоковой папилломе отмечена прямая умеренная корреляция ( $R=0,54$ ;  $p=0,0057$ ) между Ki-67 и L1, свидетельствующая о возможном участии белка L1 в пролиферации эпителия, а также о нахождении вируса в форме капсида.

### Обсуждение

Внутрипротоковая папиллома относится к поражению, имеющему повышенный риск развития ЗНО, и характеризуется частым бессимптомным течением [15, 16]. Нами установлено повышение риска

развития РМЖ в 2,3 раза у пациенток с наличием в анамнезе внутрипротоковой папилломы. Развившиеся впоследствии у этих пациенток злокачественные новообразования других локализаций были выявлены в одинаковом количестве с группой сравнения. В качестве этиологической причины пролиферативных изменений эпителия молочных желез указывается ВПЧ, который определяется в образцах доброкачественных (до 74%) и злокачественных (до 84%) опухолей молочных желез. Тем не менее приведенные разными авторами данные по распространенности вирусного поражения молочной железы существенно разнятся, что связано с рядом причин: различные методические подходы к выявлению ДНК в опухолевых тканях, их состояние (замороженные или залитые в парафин), малое количество инфицированных клеток и многообразие возможных типов ВПЧ [1, 2, 9–12, 17]. Показано, что белки ВПЧ обнаруживаются в 72% ядер клеток при доброкачественных опухолях и в 62,5% при последующем РМЖ у тех же пациенток [18]. Позитивная реакция на белки E6 (до 70%) и L1 (до 44%) в нашем исследовании отмечена преимущественно в образцах

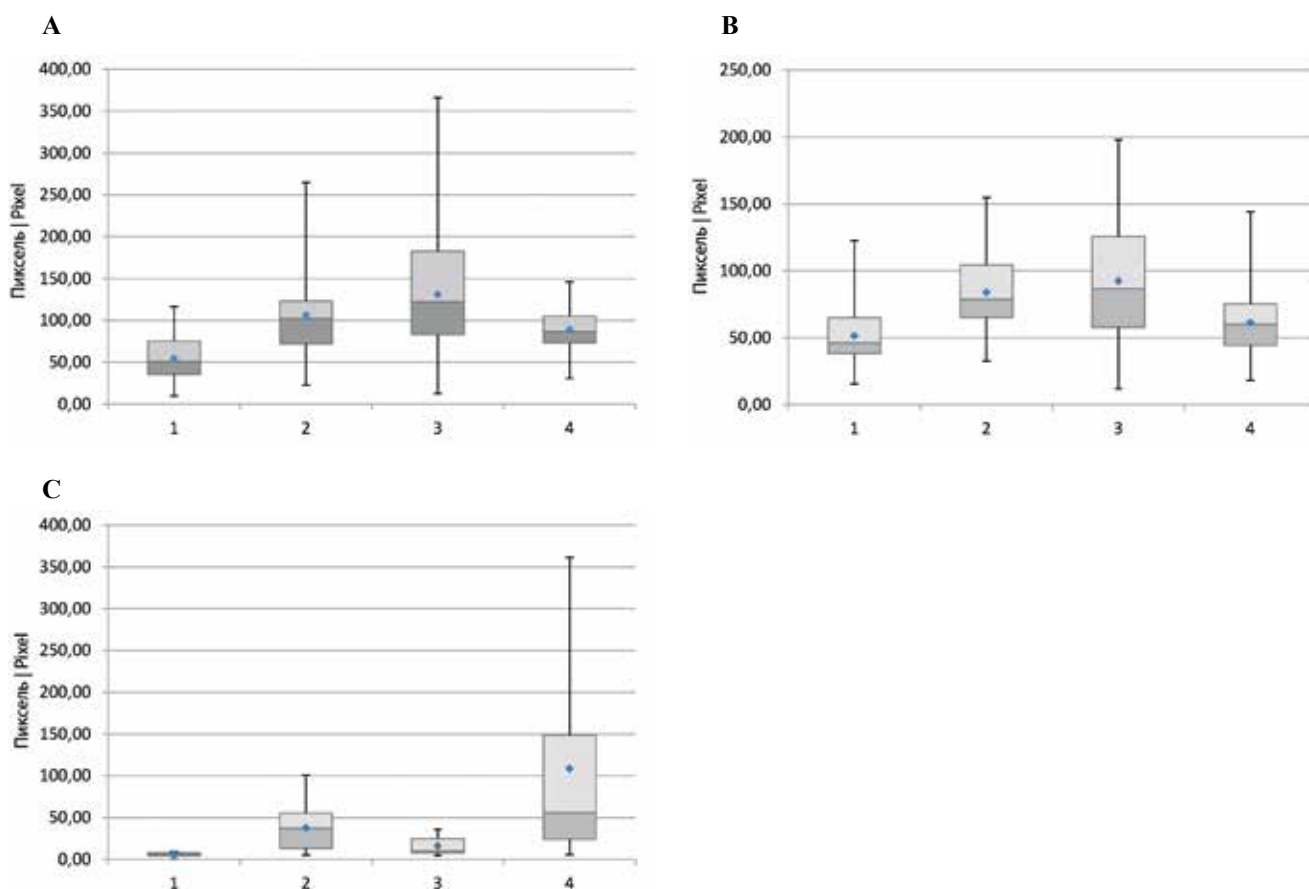


Рис. 3. Показатели интенсивности ИГХ окрашивания на наличие белков в клетках эпителия молочной железы: А – вирусных антигенов E6, В – капсидного белка L1, С – ядерного белка пролиферации Ki-67. 1 – ткань, прилегающая к опухоли, 2 – доброкачественная пролиферация эпителия, 3 – внутрипротоковая папиллома; 4 – рак молочной железы

Fig. 3. Intensity indicators of the IHC staining of protein presence in the cells of the breast: А – viral antigens E6, В – capsid protein L1, С – nuclear proliferation protein Ki-67. 1 – tissue adjacent to the tumor, 2 – benign epithelial proliferation, 3 – intraductal papilloma. 4 – breast cancer

с внутрипротоковой папилломой. При доброкачественных пролиферативных процессах их количество определялось как 56% и 41%, соответственно, а при ЗНО – 21% и 33%, что было сравнимо с показателями группы контроля. В образцах с доброкачественной пролиферацией отмечалась умеренная интенсивность позитивной реакции (++) на вирусные белки E6 и L1, а совместное наличие этих белков в клетках указывало на присутствие в них вирусов одновременно в интегрированной и эписомальной форме. На наш взгляд, широкий разброс крайних значений экспрессии белков E6 и L1 в группе контроля (от отрицательной до умеренной положительной реакции) свидетельствует о возможном влиянии вируса и на эпителий опухоли, и на прилегающие к ней клетки нормальных тканей. Такой вывод соответствует данным литературы, где авторы указывают на 22% распространенность белка E6 в нормальных тканях молочной железы [1, 2]. В нашем эксперименте показатели интенсивности синтеза белков в тканях контрольной группы составили 25% и 28% для E6 и L1, соответственно.

Низкая распространенность онкобелков (21% для E6 и 33% для L1) и невысокие показатели интенсивности их синтеза (86,55 и 60,16 пикселя) в клетках РМЖ также соотносятся с данными литературы. Известно о распространенности белка E6 при РМЖ от 24 до 74%, при доброкачественных опухолях – до 72%. Опубликована информация о массивном параллельном NGS секвенировании 855 биопсий молочных желез, где обнаружены последовательности ДНК ВПЧ, соответствующие атласу генома рака TCGA (The Cancer Genome Atlas) [12]. Таким образом, методом сравнения фрагментированных последовательностей генов была доказана распространенность ВПЧ-позитивного РМЖ около 2,3%. Означает ли это, что случаи выявления белков ВПЧ в тканях РМЖ случайны или наличие вируса свидетельствует о сопутствующей инфекции при данной патологии? Для ответа на этот вопрос необходимы более массовые исследования. Установленное нами наличие белков E6 и L1 в клетках эпителиальных опухолей молочных желез указывает на некоторое участие вируса папилломы человека в развитии патологических процессов. Мы считаем, что комплексное изучение синтеза белков ВПЧ (раннего E6 и позднего L1) в клетках опухоли позволит установить стадию жизненного цикла вируса, а сопряжение этих значений с показателем пролиферации Ki-67 сможет дать информацию о возможном риске прогрессирования доброкачественного процесса в злокачественный. Учитывая тот факт, что в структуре онкологической смертности ЗНО молочной железы находятся на первом месте (16,2% от общего числа по данным за 2018 год [19]), такая информация заставит женщин задуматься о необходимости регулярного прохождения скрининга молочных желез, что, в свою очередь, позволит снизить число выявляемых запущенных случаев РМЖ. Мы предлагаем внедрить морфометрический метод

определения количественных показателей ИГХ исследования для исключения субъективности оценки интенсивности синтеза этих белков.

### Заключение

Установлен повышенный риск развития рака молочной железы (в 2,3 раза) у пациенток с внутрипротоковой папилломой молочных желез в анамнезе. Наличие позитивной иммуногистохимической реакции на белки E6 и L1 вируса папилломы человека в образцах доброкачественных и злокачественных опухолей молочных желез указывает на его возможное участие в пролиферации эпителия. Наибольшая встречаемость и максимальная интенсивность синтеза белков вируса папилломы человека обнаруживались нами в тканях молочных желез с наличием структур внутрипротоковой папилломы, что косвенно свидетельствует о повышенном риске прогрессирования и высокой вероятности последующего развития инфильтративного процесса в опухолях этого типа. Результаты исследования указывают на необходимость дальнейших разработок в данном направлении и продолжения изучения роли подтипов вируса папилломы человека в развитии пролиферативных процессов в молочной железе. Возможность вакцинации против папилломавирусной инфекции может занять важное место в первичной профилактике рака молочной железы, если найдутся убедительные доказательства иницирующей роли вируса в развитии и прогрессировании данного заболевания.

### Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – А.В. Лагурева, Н.Г. Плехова, В.И. Апанасевич.

Сбор и обработка материала – А.В. Лагурева, А.А. Цибулина, А.А. Семенова, Ю.И. Гаман.

Написание текста – А.В. Лагурева, Н.Г. Плехова.

Редактирование – А.В. Лагурева.

### Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – A.V. Lagureva, N.G. Plekhova, V.I. Apanasevich.

Collected the data and performed the analysis – A.V. Lagureva, A.A. Tsibulina, A.A. Semenova, Yu.I. Gaman.

Wrote the paper – A.V. Lagureva, N.G. Plekhova.

Edited the manuscript – A.V. Lagureva.

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

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

### Литература/References

1. *Salman NA, Davies G, Majidy F, Shakir F, Akinrinade H, Perumal D et al.* Association of high risk human papillomavirus and breast cancer: a UK based study. *Sci Rep.* 2017;7:43591. DOI: 10.1038/srep43591.
2. *Лагурева А.В., Плехова Н.Г., Апанасевич В.И.* Оценка роли вирусов папилломы человека и Эпштейна–Барр в развитии эпителиальных опухолей молочной железы. *Клиническая и экспериментальная морфология.* 2023;12(1):5–14. DOI: 10.31088/CEM2023.12.1.5-14.



- Lagureva AV, Plekhova NG, Apanasevich VI.* Role of human papilloma virus and Epstein-Barr virus in the development of epithelial breast tumors. *Clinical and experimental morphology.* 2023;12(1):5–14 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.1.5-14.
3. *Высоцкая И.В., Летагин В.П.* Атипичные гиперплазии молочной железы. Опухоли женской репродуктивной системы. 2015;11(4):10–17. DOI: 10.17650/1994-4098-2015-11-4-10-17. *Высотская И.В., Летагин В.П.* Atypical hyperplasias of the breast. Tumors of female reproductive system. 2015;11(4):10–17 (In Russ.). DOI: 10.17650/1994-4098-2015-11-4-10-17.
  4. *Kulka J, Madaras L, Floris G, Lax SF.* Papillary lesions of the breast. *Virchows Arch.* 2022;480(1):65–84. DOI: 10.1007/s00428-021-03182-7.
  5. *Krump NA, You J.* Molecular mechanisms of viral oncogenesis in humans. *Nat Rev Microbiol.* 2018;16(11):684–98. DOI: 10.1038/s41579-018-0064-6.
  6. *Onyango CG, Ogonda L, Guyah B, Shiluli C, Ganda G, Orang'o OE et al.* Novel biomarkers with promising benefits for diagnosis of cervical neoplasia: a systematic review. *Infect Agents Cancer.* 2020;15(1):68. DOI: 10.1186/s13027-020-00335-2.
  7. *Altamura G, Power K, Martano M, Degli Uberti B, Galiero G, De Luca G et al.* Feliscatus papillomavirus type-2 E6 binds to E6AP, promotes E6AP/p53 binding and enhances p53 proteasomal degradation. *Sci Rep.* 2018;8(1):17529. DOI: 10.1038/s41598-018-35723-7.
  8. *Boufelli G, Giannotti MA, Ruiz CA, Barros N, Chala LF, Maesaka JY et al.* Papillomas of the breast: factors associated with underestimation. *Eur J Cancer Prev.* 2018;27(4):310–4. DOI: 10.1097/CEJ.0000000000000343.
  9. *Figuerola JD, Gierach GL, Duggan MA, Fan S, Pfeiffer RM, Wang Y et al.* Risk factors for breast cancer development by tumor characteristics among women with benign breast disease. *Breast Cancer Res.* 2021;23(1):34. DOI: 10.1186/s13058-021-01410-1.
  10. *Elagali AM, Suliman AA, Altayeb M, Dannoun AI, Parine NR, Sakr HI et al.* Human papillomavirus, gene mutation and estrogen and progesterone receptors in breast cancer: a cross-sectional study. *Pan Afr Med J.* 2021;38:43. DOI: 10.11604/pamj.2021.38.43.22013.
  11. *Islam MS, Chakraborty B, Panda CK.* Human papilloma virus (HPV) profiles in breast cancer: future management. *Ann Transl Med.* 2020;8(10):650. DOI: 10.21037/atm-19-2756.
  12. *Lawson JS, Glenn WK, Salyakina D, Delprado W, Clay R, Antonsson A et al.* Human papilloma viruses and breast cancer. *Front Oncol.* 2015;5:277. DOI: 10.3389/fonc.2015.00277.
  13. *Гаман Ю.И., Апанасевич В.И., Лагурева А.В., Загруднинова О.М., Плехова Н.Г., Аргисhev О.А. и др.* Рак молочной железы, ассоциированный с внутритротоковым папилломатозом. Опухоли женской репродуктивной системы. 2023;19(3):25–29. DOI: 10.17650/1994-4098-2023-19-3-25-29.
  14. *Тележникова И.М., Жукова Л.Г., Кометова В.В., Хомерики С.Г., Карнаухов Н.С., Хатькова Е.И. и др.* Оценка индекса Ki67 при раке молочной железы с применением визуальной методики global. Клиническая и экспериментальная морфология. 2023;12(2):36–43. DOI: 10.31088/CEM2023.12.2.36-43.
  15. *Telezhnikova IM, Zhukova LG, Kometova VV, Khomeriki SG, Karnaukhov NS, Khatkova EI et al.* Visual assessment of the Ki67 index in breast cancer using the global scoring. *Clinical and experimental morphology.* 2023;12(2):36–43 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.2.36-43.
  16. *Li X, Wang H, Sun Z, Fan C, Jin F, Mao X.* A retrospective observational study of intraductal breast papilloma and its coexisting lesions: a real-world experience. *Cancer Med.* 2020;9(20):7751–62. DOI: 10.1002/cam4.3308.
  17. *de Villiers EM, Sandstrom RE, zur Hausen H, Buck CE.* Presence of papillomavirus sequences in condylomatous lesions of the mamillae and in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res.* 2005;7(1):R1–11. DOI: 10.1186/bcr940.
  18. *Maldonado-Rodríguez E, Hernández-Barrales M, Reyes-López A, Godina-González S, Gallegos-Flores PI, Esparza-Ibarra EL et al.* Presence of human papillomavirus DNA in malignant neoplasia and non-malignant breast disease. *Curr Issues Mol Biol.* 2022;44(8):3648–65. DOI: 10.3390/cimb44080250.
  19. *Ngan C, Lawson JS, Clay R, Delprado W, Whitaker NJ, Glenn WK.* Early Human papilloma virus (HPV) oncogenic influences in breast cancer. *Breast Cancer (Auckl).* 2015;9:93–97. DOI: 10.4137/BCBCR.S35692.
  20. *Будаев Б.С., Банзарова Л.П., Богданова О.Г., Тармаева И.Ю.* Анализ смертности населения от злокачественных новообразований на региональном уровне. Тихоокеанский медицинский журнал. 2021;(3):71–76. DOI: 10.34215/1609-1175-2021-3-71-76.
  21. *Budaev BS, Banzarova LP, Bogdanova OG, Tarmaeva IYu.* Analysis of malignant neoplasms mortality rate of the population at the regional level. *Pacific Medical Journal.* 2021;(3):71–76 (In Russ.). DOI: 10.34215/1609-1175-2021-3-71-76.

### Информация об авторах

Александра Викторовна Лагурева – врач клинко-диагностической лаборатории Приморского краевого онкологического диспансера, аспирантка центральной научно-исследовательской лаборатории Тихоокеанского государственного медицинского университета.

Наталья Геннадьевна Плехова – доктор биологических наук, заведующая центральной научно-исследовательской лабораторией Тихоокеанского государственного медицинского университета.

Анастасия Андреевна Цибулина – врач клинко-диагностической лаборатории Приморского краевого онкологического диспансера, лаборантка центральной научно-исследовательской лаборатории Тихоокеанского государственного медицинского университета.

Юлия Ивановна Гаман – студентка 6-го курса лечебного факультета Тихоокеанского государственного медицинского университета.

Алина Александровна Семенова – врач клинико-диагностической лаборатории Владивостокской клинической больницы № 2, лаборантка Центральной научно-исследовательской лаборатории Тихоокеанского государственного медицинского университета.  
Владимир Иосифович Апанасевич – доктор медицинских наук, профессор института хирургии Тихоокеанского государственного медицинского университета.

#### Authors information

Alexandra V. Lagureva – Clinical Pathologist, Clinical Diagnostic Laboratory, Primorsky Regional Oncological Center; Postgraduate Student, Central Research Laboratory, Pacific State Medical University.  
<https://orcid.org/0000-0002-4195-9184>

Natalia G. Plekhova – Dr. Sci. (Biol.), Head of the Central Research Laboratory, Pacific State Medical University.  
<https://orcid.org/0000-0002-8701-7213>

Anastasia A. Tsiulina – Clinical Pathologist, Clinical Diagnostic Laboratory, Primorsky Regional Oncological Center; Laboratory Assistant, Central Research Laboratory, Pacific State Medical University.  
<https://orcid.org/0009-0003-2052-9569>

Yulia I. Gaman – 6<sup>th</sup>-year Student, Faculty of Medicine, Pacific State Medical University.  
<https://orcid.org/0009-0006-1163-2953>

Alina A. Semenova – Clinical Pathologist, Clinical Diagnostic Laboratory, Vladivostok Clinical Hospital No. 2; Laboratory Assistant, Central Research Laboratory, Pacific State Medical University.  
<https://orcid.org/0009-0007-2221-4543>

Vladimir I. Apanasevich – Dr. Sci. (Med.), Professor, Institute of Surgery, Pacific State Medical University.  
<https://orcid.org/0000-0003-0808-5283>