

Генодиагностика ассоциации ДНК вирусов папилломы человека рода *beta* с себорейным кератозом у иммуносупрессивных и иммунокомпетентных больных

Корнева Л.В.¹, Снарская Е.С.², Молочков В.А.¹, Полянская А.А.³

¹Отделение дерматовенерологии и дерматоонкологии (руководитель – проф. В.А. Молочков) ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, 129991, г. Москва; ²Кафедра кожных и венерических болезней (зав. – проф. В.А. Молочков) ГОУ ВПО ИПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, 119991, г. Москва; ³Клиника «Премиум Эстетикс», 109028, г. Москва

Многочисленные данные указывают на роль вируса папилломы человека (ВПЧ) рода *beta* в развитии эпителиальных опухолей кожи. Цель нашего исследования – изучить ассоциацию себорейного кератоза (СК) с ВПЧ на основе анализа ДНК ВПЧ рода *beta*, в том числе у иммуносупрессивных лиц. Обследовано 20 реципиентов почечного трансплантата (РПТ) и 20 иммунокомпетентных больных СК. Контрольная группа представлена 49 добровольцами без эпителиальных новообразований кожи. Генодиагностику ДНК ВПЧ рода *beta* в биоптатах осуществляли методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени. Амплификацию и детекцию проводили на приборе Rotor-Gene 3000 («Corbett Research», Австралия). Показан высокий уровень детекции ДНК ВПЧ у РПТ как в очагах СК, так и в видимо здоровой коже (85% и 55% случаев соответственно), что превышало встречаемость вируса в здоровой коже доноров (47% случаев). Вирусная нагрузка в очагах СК была статистически значимо выше, чем в контрольной группе.

Ключевые слова: вирус папилломы человека рода *beta*; генодиагностика ДНК вируса папилломы человека; эпителиальные опухоли кожи; себорейный кератоз; реципиенты почечного трансплантата; иммуносупрессия.

Для цитирования: Корнева Л.В., Снарская Е.С., Молочков В.А., Полянская А.А. Генодиагностика ассоциации ДНК вирусов папилломы человека рода *beta* с себорейным кератозом у иммуносупрессивных и иммунокомпетентных больных. *Российский журнал кожных и венерических болезней*. 2015; 18(2): 4–7.

GENODIAGNOSIS OF HPV BETA DNA ASSOCIATION WITH SEBORRHEIC KERATOSIS IN IMMUNOSUPPRESSED AND IMMUNOCOMPETENT PATIENTS

Korneva L.V.¹, Snarskaya E.S.², Molochkov V.A.¹, Polyanskaya A.A.³

¹M.F.Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russia; ²I.M.Setchenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia; ³Premium Esthetics Clinic, Moscow, Russia

Numerous data indicate the involvement of human papilloma virus (HPV), genus *beta*, in the development of epithelial tumors of the skin. We studied the association of seborrheic keratosis (SK) with HPV by analysis of HPV beta DNA, including that in immunosuppressed patients. Twenty recipients of renal transplants and 20 immunocompetent patients with SK were examined. Control group consisted of 49 volunteers without epithelial tumors of the skin. Genodiagnosis of HPV beta DNA in biopsy specimens was carried out by the real time polymerase chain reaction with hybridization fluorescent detection. Amplification and detection were carried out on a Rotor-Gene 3000 device (Corbett Research, Australia). The results indicated high levels of HPV DNA in transplant recipients – in foci of SK and in visually intact skin (in 85 and 55% cases, respectively), which was higher than the incidence of the virus in donor skin (47%). Virus charge in SK foci was significantly higher than in the control group.

Key words: genus *beta* human papilloma virus; genodiagnosis of HPV; cutaneous epithelial tumors; seborrheic keratosis; renal transplant recipients; immunosuppression.

Citation: Korneva L.V., Snarskaya E.S., Molochkov V.A., Polyanskaya A.A. Genodiagnosis of HPV beta DNA association with seborrheic keratosis in immunosuppressed and immunocompetent patients. *Rossiyskiy zhurnal kozhnykh i venericheskikh bolezney*. 2015; 18(2): 4–7. (in Russ.)

Сведения об авторах:

Корнева Любовь Вячеславовна, кандидат мед. наук, ассистент (lvkorneva@mail.ru); Снарская Елена Сергеевна, доктор мед. наук, профессор; Молочков Владимир Алексеевич, доктор мед. наук, профессор; Полянская Альбина Александровна, врач-дерматовенеролог, косметолог, ООО «Винтаж», клиника «Премиум эстетикс».

Corresponding author:

Snarskaya Elena, MD, PhD, DSc, prof. (snarskaya-dok@mail.ru).

Эпителиальные опухоли кожи – одна из самых распространенных групп опухолей, отличающаяся значительным разнообразием. Изучение их этиологии и патогенеза представляет значительный интерес для оптимизации лечения и профилактики.

Провоцировать развитие эпителиальных опухолей могут интенсивная инсоляция, химические канцерогены, определенную роль отводят наследственным и иммунологическим нарушениям [1]. В настоящее время в связи с достижениями в области молекулярной биологии предпринимаются попытки определения роли вируса папилломы человека (ВПЧ) рода *beta* в развитии отдельных вариантов эпителиальных опухолей кожи – плоскоклеточного и базально-клеточного рака, актинического кератоза, кератоакантомы, себорейного кератоза (СК) [1–3].

Наличие ВПЧ рода *beta* в целом ряде эпителиальных опухолей может быть следствием как активной вирусной инфекции, так и независимой бессимптомной персистенции, характерной для факторов естественной резистентности [1–3]. Поэтому, помимо выявления ВПЧ рода *beta*, целесообразно проводить количественное измерение вирусной нагрузки, определение которой является сравнительно новым подходом не только в диагностике папилломавирусной инфекции, но и в ее мониторинге, лечении и профилактике [3].

Отсутствие в большинстве очагов транскрипционной активности и низкая вирусная нагрузка, сопоставимая с таковой в здоровой коже, противоречат предположению о роли ВПЧ в стимуляции опухолевого роста [1–3]. Тем не менее ряд популяционных исследований, молекулярные и патоморфологические данные подтверждают, что ВПЧ рода *beta* могут играть этиологическую роль в развитии эпителиальных опухолей [4–6]. Иммуносупрессия является важным кофактором развития большинства эпителиальных новообразований кожи [6–8]. Так, по данным литературы [3], отмечается, что формирование ВПЧ-ассоциированных бородавок, ороговевающих кожных опухолей, в том числе себорейных кератом и немеланоцитарных видов рака кожи, значимо повышается после операций трансплантации внутренних органов (рис. 1).

Себорейный кератоз (СК) является самой распространенной доброкачественной эпителиальной опухолью кожи неизвестной этиологии, и сегодня ВПЧ рассматривается как один из возможных этиологических факторов. Ассоциация ВПЧ с СК была подтверждена в ряде исследований. Так, было показано наличие ВПЧ рода *beta* в 42 (76%) из 55 биоптатов СК у реципиентов почечного трансплантата (РПТ) против 13 (27%) из 48 образцов здоровой кожи ($p < 0,005$) [8]. Наряду с этими результатами в ряде других работ с использованием менее чувствительных разновидностей полимеразной цепной реакции (ПЦР) ДНК ВПЧ в СК обнаружить не удалось [9].

С учетом вышеизложенного изучение ассоциаций ВПЧ с различными формами эпителиальных образований кожи (доброкачественными, предраковыми и злокачественными) на основе современных молекулярных методов с целью количественного определения ДНК ВПЧ является актуальной задачей дерматоонкологии, решение которой будет способствовать дальнейшему пониманию взаимосвязей развития эпителиальных образований кожи с ВПЧ.

Цель исследования – изучить ассоциацию СК с ВПЧ на основе количественного анализа ДНК ВПЧ. Задачи исследования: определить встречаемость ДНК ВПЧ рода *beta* в СК и видимо здоровой коже РПТ и иммунокомпетентных больных, а также изучить вирусную нагрузку ДНК ВПЧ рода *beta* в СК и видимо здоровой коже РПТ и иммунокомпетентных людей.



Рис. 1. Множественные очаги себорейного кератоза, развившегося у пациентки после трансплантации почки.

Материалы и методы

Обследовано 60 больных с РПТ, находящихся на лечении в отделении хронического гемодиализа и трансплантации почки, длительно получающих курсы иммуносупрессивной терапии. У 20 пациентов, имеющих множественные элементы СК, был проведен забор материала (микробиопат кожи) из очагов СК, а также взят образец здоровой кожи в области плеча. Аналогично обследованы 20 иммунокомпетентных больных с множественными проявлениями СК, не получавших иммуносупрессивную терапию.

Группа иммуносупрессивных лиц состояла из 10 мужчин и 10 женщин в возрасте от 22 до 60 лет (средний возраст 46 ± 10 лет). Длительность иммуносупрессии составляла от полугода до 13,5 года (медиана 3 года). Иммуносупрессивную терапию 16 больным РПТ проводили микрофенолат мофетиллом, такролимусом и преднизолоном; 4 больных получали курсы циклоспорина А в комбинации с другими иммуносупрессивными препаратами.

Группа иммунокомпетентных лиц с СК состояла из 10 мужчин и 10 женщин, в возрасте от 24 до 78 лет (средний возраст 43 ± 15 лет).

Контрольная группа представлена 49 добровольцами, из них 29 мужчин и 20 женщин, в возрасте 39 ± 13 лет, у которых кожные заболевания, в том числе ассоциированные с кожными типами ВПЧ, отсутствовали.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ Statistica 10.0. Статистическую значимость различий частот определяли с помощью χ^2 -критерия. Для проверки распределения на нормальность применяли критерий Шапиро–Уилка. При $p > 0,05$ нулевую гипотезу о нормальности распределения не отвергали. Для анализа характерных вирусных нагрузок рассчитывали десятичный логарифм количества вирусов. Сравнение несвязанных выборок осуществляли с использованием критерия Манна–Уитни, связанных – с помощью критерия Вилкоксона. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Генодиагностику ВПЧ-инфекции проводили на базе ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора [3]. Материал забирали в стерильных условиях борами (микробиопаты), помещали в пробирки с транспортной средой и хранили при температуре 70°C . Пробоподготовку проводили методом обработки ткани протеиназой К с последующим выделением методом аффинной сорбции на силикагеле.

Определение ДНК ВПЧ рода *beta* в биоптатах осуществляли методом ПЦР с гибридационно-флюоресцентной детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Амплификацию и детекцию проводили на приборе Rotor-Gene 3000 ("Corbett Research", Австралия).

Для количественного определения ВПЧ рода *beta*, а также для оценки ее чувствительности и специфичности, использовали рекомбинантные плазмидные положительные контроли, содержащие последовательность полных геномов ВПЧ кожных типов рода *альфа*, *гамма*, *ми*, *ни* и *бета* и контрольные плазмиды фрагмента β -глобинового гена человека.

Для выявления ДНК ВПЧ рода *beta* использовали четыре системы олигонуклеотидов (группоспецифических праймеров и зондов):

Детекция ДНК ВПЧ рода *beta* в образцах с себорейным кератозом и в образцах видимо здоровой кожи у иммуносупрессивных и иммунокомпетентных лиц

Исследуемый образец	Количество образцов	ВПЧ-отрицательные образцы		ВПЧ-положительные образцы	
		абс.	%	абс.	%
Иммуносупрессивные:					
себорейный кератоз	20	3	15	17	85
видимо здоровая кожа у больных себорейным кератозом	20	9	45	11	55
Иммунокомпетентные:					
себорейный кератоз	20	6	30	14	70
видимо здоровая кожа у больных себорейным кератозом	20	13	65	7	35
Здоровая кожа доноров (контроль)	49	26	53	23	47

1-я – для выявления генотипов вида $\beta 1$ (типы 5, 8, 12, 14, 21, 19, 25, 47, 36);

2-я – для выявления генотипов вида $\beta 2$ (типы 9, 15, 17, 22, 23, 38, 37, 80);

3-я – для выявления генотипов вида $\beta 3$ (типы 49, 75, 76);

4-я – для выявления генотипов вида $\beta 4$ (тип 92), $\beta 5$ (тип 96), $\beta 1$ (типы 20, 24 и 93).

Во все четыре системы введены олигонуклеотиды с целью выявления и количественного определения ДНК человека (по β -глобиновому гену человека), что позволяло проводить оценку адекватности забора, хранения и обработки образцов (принцип внутреннего контроля).

С учетом того, что при взятии клинического материала из очагов СК и здоровой кожи количество попадающих в образец эпителиальных клеток (а соответственно и копий вируса) варьировало, использовали методику нормирования количества вируса на количество клеток человека. Расчет нормализованной вирусной нагрузки производили по формуле:

вирусная нагрузка = \lg (количество ДНК ВПЧ/количество ДНК человека) $\cdot 10^5$ [3].

Результаты

Мониторинг предварительных данных (см. таблицу) показал, что у иммуносупрессивных больных (РПТ) множественные кератотические очаги появляются не только на открытых, но и на закрытых участках кожного покрова (рис. 2). В группе иммуносупрессивных пациентов с РПТ мы выявили высокую частоту ДНК ВПЧ рода *beta* – в 85% случаев в очагах СК и в 55% случаев на участках видимо здоровой кожи, что значимо выше, чем в группе здоровых лиц, где выявление ДНК ВПЧ рода *beta* отмечено лишь в 47% случаев. В группе иммунокомпетентных лиц частота выявления ДНК ВПЧ рода *beta* в очагах СК и на участках видимо здоровой кожи мы выявляли значимо реже – в 70 и 35% случаев соответственно.

Вирусная нагрузка ДНК ВПЧ рода *beta* в СК и видимо здоровой коже у иммуносупрессивных пациентов с РПТ была высокой и составила 2,8 (1,9; 5,4) и 2,0 (1,3; 2,5) соответственно, поскольку распределения вирусных нагрузок носили ненормальный характер, значения представлены в виде медианы (25%;75%). У иммунокомпетентных лиц при анализе вирусной нагрузки в очагах СК отмечается ее уменьшение – 1,8 (1,2; 2,3), на участках видимо здоровой кожи нагрузка составила 2,2 (1,6; 1,8). Вирусная нагрузка ДНК ВПЧ в здоровой коже доноров была значимо ниже и составила всего 1,5 (0,9; 1,9).



Рис. 2. Множественные себорейные кератомы на закрытых участках тела у иммуносупрессивного пациента.

У РПТ с единичным СК (от 1 до 5 очагов по всему телу) ДНК ВПЧ рода *beta* обнаруживали в 43% случаев. При множественных очагах СК (5 и более) у РПТ отмечалась тенденция к более частому обнаружению ДНК ВПЧ рода *beta* – в 91% случаев.

Сложность выявления ВПЧ в эпителиальных опухолях кожного покрова, вероятно, связана с ограничениями используемых методик молекулярной диагностики, при этом проведенный нами количественный анализ вирусных геномов позволил более объективно судить о характере присутствия ВПЧ в опухолях кожи. Мы считаем перспективным продолжение проведения исследований для подтверждения или опровержения роли ВПЧ рода *beta* в развитии эпителиальных опухолей в общей популяции и особенно среди иммуносупрессивных лиц.

ЛИТЕРАТУРА [REFERENCES]

- IARC. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human Papillomaviruses*. Lyon; 2012. vol. 90.
- Accardi R., Gheit T. Cutaneous HPV and skin cancer. *Presse Med.* 2014; 43(12P2): e435–43.
- Кладова А.Ю., Кувяда Д.А., Молочков В.А., Шипулина О.Ю., Киселев В.И., Хлебникова А.Н., Козлова Е.С. Встречаемость кожных типов вирусов папилломы человека в опухолях кожи. *Альманах клинической медицины*. МОНИКИ. 2006; 9: 44–50. [Kladova A.Yu., Kuevda D.A., Molochkov V.A., Shipulina O.Yu., Kiselev V.I., Khlebnikova A.N., Kozlova E.S. The occurrence of cutaneous types of human papillomavirus in skin tumors. *Almanakh klinicheskoy meditsiny* M.F.Vladimirskiy Moscow regional research clinical Institute. 2006; 9: 44–50]. (in Russian)
- Quint K. D., Genders R. E., de Koning M. N., Borgogna C., Gariglio M., Bouwes Bavinck J.N., Doorbar J., Feltkamp M. C. Human beta-papillomavirus infection and keratinocyte carcinomas. *J. Pathol.* 2015; 235(2): 342–54.
- Borgogna C., Lanfredini S., Peretti A., De Andrea M., Zavattaro E., Colombo E. et al. Improved detection reveals active beta-papillomavirus infection in skin lesions from kidney transplant recipients. *Mod. Pathol.* 2014; 27(8): 1101–15.
- Farzan S.F., Waterboer T., Gui J., Nelson H.H., Li Z., Michael K.M., et al. Cutaneous alpha, beta and gamma human papillomaviruses in relation to squamous cell carcinoma of the skin: a population-based study. *Int. J. Cancer.* 2013; 133(7): 1713–20.
- Zhao Y.K., Lin Y.X., Luo R.Y., Huang X.Y., Liu M.Z., Xia M., Jin H.

- Human papillomavirus (HPV) infection in seborrheic keratosis. *Am. J. Dermatopathol.* 1989; 11(3): 209–12.
8. Li Y.H., Chen G., Dong X.P., Chen H.D. Detection of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus DNA in non-genital seborrheic keratosis. *Br. J. Dermatol.* 2004; 151(5): 1060–5.
9. Meibodi N.T., Nahidi Y., Meshkat Z., Esmaili H., Gharib M., Gholoobi A. N evidence of human papillomaviruses in non-genital seborrheic keratosis. *Indian J. Dermatol.* 2013; 58(4): 326. doi: 10.4103/0019-5154.113949.

Поступила 12.03.15
Received 12.03.15

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616.5-006.63-02-036.1

Клиническая характеристика и факторы риска развития базально-клеточного рака кожи у населения промышленного городского округа

Писклакова Т.П.¹, Екимова О.И.²

¹Кафедра сервиса и технологии художественной обработки материала (зав. – В.А. Лившиц) ФГБОУ ВПО Южно-Уральский государственный университет, 454080, г. Челябинск; ²Областной кожно-венерологический диспансер № 3, 454031, г. Челябинск

В Областном кожно-венерологическом диспансере №3 (Челябинск) создан регистр больных базально-клеточным раком (БКР) кожи с учетом профессионального анамнеза, в который включены 267 пациентов, проживающих в городском промышленном округе (г. Копейск). Больных разделили на 5 профессиональных групп: 56 пациентов – работники угледобывающей, 43 – химической, 18 – металлургической промышленности, 92 – рабочие, не имеющие вредных условий производства, 58 – служащие. У пациентов из профессиональных групп с вредными условиями производства более часто выявляли множественный БКР кожи (21,9; 27,9; 27,8%); первично-множественный рак регистрировался у 14,6% пациентов–работников угледобывающей и 16,2% работников химической промышленности. Проведенный многомерный факторный анализ показал, что в качестве ведущих факторов риска развития БКР кожи в профгруппах с вредными условиями производства выступают профессиональные факторы; для других профгрупп – инсоляция, фототип кожи пациента.

Ключевые слова: базально-клеточный рак кожи; первично-множественный рак; вредные производственные факторы; факторы риска развития базально-клеточного рака.

Для цитирования: Писклакова Т.П., Екимова О.И. Клиническая характеристика и факторы риска развития базально-клеточного рака кожи у населения промышленного городского округа. *Российский журнал кожных и венерических болезней.* 2015; 18(2): 7–10.

CLINICAL CHARACTERISTICS OF BASAL-CELL CUTANEOUS CARCINOMA AND RISK FACTORS FOR THIS DISEASE IN RESIDENTS OF AN INDUSTRIAL CITY REGION

Pisklakova T.P.¹, Ekimova O.I.²

¹South Ural State University, Chelyabinsk, Russia; ²Regional Center of Skin and Sexually-Transmitted Diseases No. 3, Chelyabinsk, Russia

The register of patients with basal-cell cutaneous carcinoma (BCCC) in Regional Center of Skin and Sexually-Transmitted diseases No. 3 in Chelyabinsk, was created with consideration for the professional appurtenance of 267 patients living in the industrial region of the city (in the town of Kopeisk). The patients were distributed into 5 professional groups: 56 patients engaged in coal mining, 18 in metallurgy, 92 workers without harmful occupational exposure, and 58 patients not engaged in industry. Multiple BCCC was more often diagnosed in patients from professional groups exposed to harmful factors (21.9, 27, and 27.8%); primary multiple cancer was diagnosed in 14.6% of patients engaged in coal mining and 16.2% of patients engaged in chemical industry. Multidimensional factorial analysis showed that occupational factors were the leading risk factors for BCCC in professional groups with harmful occupational exposure, while the risk factors for other professional groups were insolation and patient's skin phototype.

Key words: basal-cell cutaneous carcinoma; primary multiple cancer; harmful occupational factors; basal-cell cancer risk factors.

Citation: Pisklakova T.P., Ekimova O.I. Clinical characteristics of basal-cell cutaneous carcinoma and risk factors for this disease in residents of an industrial city region *Rossiyskiy zhurnal kozhnykh i venericheskikh bolezney.* 2015; 18(2): 7–10. (in Russ.)

Базально-клеточный рак (БКР) кожи относится к группе злокачественных новообразований кожи, которая согласно МКБ-10, в статистических отчетах учитывается

Сведения об авторах:

Писклакова Татьяна Павловна, доктор мед. наук (pisklakova@mail.ru); Екимова Ольга Ивановна, врач-дерматовенеролог (olga_ekimova@list.ru).

Corresponding author:

Pisklakova Tatiana, MD, PhD, DSc (pisklakova@mail.ru).

наряду с плоскоклеточным раком кожи, метатипическим раком как «другие злокачественные новообразования кожи». Заболеваемость данной онкологической группы растет на протяжении нескольких десятилетий и тенденции к росту сохраняются как в мире, так и в Российской Федерации [1, 2]. Челябинская область не является исключением [2, 3]. Это подтверждает анализ структуры онкологической заболеваемости региона. Если в 2001–2004 гг. в статистических отчетах Челябинской области «другие онкологические заболевания кожи» занимали второе место, то с 2005 г. по настоящее время «немеланомные раки кожи»