



Сравнительный анализ ассоциации себорейного кератоза с вирусом папилломы человека у иммуносупрессивных и иммунокомпетентных пациентов

Молочков В.А. • Корнева Л.В. • Снарская Е.С. • Щербакова Е.О. • Полянская А.А. • Трофимова О.Б.

Молочков Владимир Алексеевич – д-р мед. наук, профессор, руководитель отделения дерматовенерологии и дерматоонкологии¹

Корнева Любовь Вячеславовна – канд. мед. наук, ассистент кафедры дерматовенерологии и дерматоонкологии¹

✉ 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2–2, Российская Федерация.
Тел.: +7 (495) 631 46 54.
E-mail: lvkorneva@mail.ru

Снарская Елена Сергеевна – д-р мед. наук, профессор кафедры кожных и венерических болезней Института профессионального образования²

Щербакова Евгения Оттовна – канд. мед. наук, ст. науч. сотр. отделения хронического гемодиализа и трансплантации почки¹

Полянская Альбина Александровна – врач-дерматовенеролог, косметолог³

Трофимова Ольга Борисовна – мл. науч. сотр. отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии⁴

Цель – изучить ассоциацию себорейного кератоза с вирусом папилломы человека (ВПЧ) на основе количественного анализа дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) ВПЧ, а также выявляемость разных генотипов ВПЧ рода *beta*.

Материал и методы. Обследованы 60 реципиентов почечного трансплантата, 20 из которых – с множественным себорейным кератозом, а также 22 иммунокомпетентных пациента с себорейным кератозом. Контрольную группу составили 49 добровольцев без кожных заболеваний.

Забор материала осуществляли в стерильных условиях борами (микробиопаты). После пробоподготовки с использованием набора для выделения ДНК из клинического материала ДНК-сорб-С производства ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора (ЦНИИЭ) проводилось определение ВПЧ методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени. Амплификация и детекция проводились на приборе Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Австралия).

Для количественного определения ВПЧ рода *beta* использовались рекомбинантные плазмидные положительные контроли, а также контрольные

плазмиды фрагмента β -глобинового гена человека (ЦНИИЭ). Для выявления ДНК ВПЧ рода *beta* применялись 4 системы олигонуклеотидов – группспецифических праймеров и зондов.

Результаты. У реципиентов почечного трансплантата кератотические очаги появляются как на открытых, так и на закрытых участках кожи. В себорейных кератомах и видимо здоровой коже реципиентов почечного трансплантата с высокой частотой выявляли ДНК ВПЧ рода *beta* (81 и 55% случаев соответственно) по сравнению с кожей здоровых доноров (47%).

Заключение. В результате проведенного исследования показана высокая выявляемость ДНК ВПЧ у реципиентов почечного трансплантата как в очагах себорейного кератоза, так и в видимо здоровой коже. У иммунокомпетентных пациентов отмечена высокая выявляемость ДНК ВПЧ в очагах себорейного кератоза по сравнению с таковой в видимо здоровой коже.

Ключевые слова: доброкачественные эпителиальные образования кожи, себорейная кератома, вирус папилломы человека рода *beta*, реципиенты почечного трансплантата, иммуносупрессивные пациенты, иммунокомпетентные пациенты, детекция ДНК ВПЧ рода *beta* в режиме реального времени.

¹ ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»; 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация

² ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России; 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, 8/2, Российская Федерация

³ Клиника эстетической медицины Premium Aesthetics; 109028, г. Москва, Казарменный переулок, 3–6, Российская Федерация

⁴ ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора; 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, 3а, Российская Федерация

Эпителиальные опухоли кожи (ЭОК) – одна из самых распространенных групп опухолей человека, отличающаяся значительным разнообразием. Изучение этиологии и патогенеза ЭОК представляет значительный интерес для оптимизации лечения и профилактики этих опухолей. К факторам,

способствующим развитию ЭОК, относят длительную инсоляцию и химические канцерогены [1]. Определенную роль отводят наследственным и иммунологическим нарушениям [2]. 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 ЭОК – плоскоклеточного рака, базальноклеточно-го рака, актинического кератоза, кератоакантомы, себорейного кератоза (СК) [3].

Обнаружение ВПЧ рода *beta* в ЭОК может быть следствием как активной вирусной инфекции, так и независимой бессимптомной персистенции, характерной для факторов естественной резистентности [1]. А отсутствие транскрипционной активности без массивной вирусной нагрузки в опухолевой ткани противоречит гипотезе о необходимости ВПЧ или вирусных онкогенов для поддержания опухолевого роста. Тем не менее многие авторы полагают, что ВПЧ рода *beta* может выступать этиологическим агентом в развитии ЭОК [3].

Иммуносупрессия также служит важным кофактором возникновения ЭОК. Известно, что количество ВПЧ-ассоциированных бородавок и кератотических кожных высыпаний неуклонно повышается после трансплантации [3]. Следовательно, помимо выявления ВПЧ рода *beta* необходимо проводить количественное измерение вирусной нагрузки. Этот современный метод диагностики ВПЧ-инфекции может применяться для мониторинга результатов лечения и профилактики [3, 4].

В связи с вышеизложенным проведение исследований, изучающих ассоциацию ВПЧ с различными формами ЭОК (доброкачественными, предраковыми и злокачественными) на основе количественного определения дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) ВПЧ, представляет собой актуальную задачу дерматоонкологии, решение которой будет способствовать дальнейшему пониманию взаимосвязей ЭОК с ВПЧ.

Цель – изучить ассоциацию СК с ВПЧ на основе количественного анализа ДНК ВПЧ.

В задачу исследования входило:

а) анализ частоты встречаемости ДНК ВПЧ рода *beta* в СК и видимо здоровой коже иммуносупрессивных (реципиенты почечного трансплантата (РПТ)) и иммунокомпетентных пациентов;

б) изучение выявляемости видов ВПЧ рода *beta* в себорейных кератомах и в видимо здоровой коже иммуносупрессивных пациентов (РПТ) и иммунокомпетентных лиц.

Материал и методы

Группа лиц, вошедших в исследование, была сформирована в соответствии с данными мировой научной литературы, согласно которым, ВПЧ рода *beta* ассоциирован с отдельным вариантом доброкачественных ЭОК, а именно с СК.

Всего на базе отделений дерматовенерологии и дерматоонкологии, а также хронического

Таблица 1. Распределение иммуносупрессивных (РПТ) и иммунокомпетентных пациентов по нозологиям

Пациенты с СК	Группа новообразований	Число больных	Количество исследованных очагов
Иммуносупрессивные (РПТ)	СК	20	21
	Видимо здоровая кожа	20	20
Иммунокомпетентные	СК	22	22
	Видимо здоровая кожа	22	22
Здоровые доноры	Здоровая кожа	49	49

СК – себорейный кератоз, РПТ – реципиенты почечного трансплантата

Таблица 2. Выявляемость ДНК ВПЧ рода *beta* в себорейных кератомах и образцах видимо здоровой кожи иммуносупрессивных (РПТ) и иммунокомпетентных пациентов

Пациенты с СК	Исследуемые образцы	Количество образцов	ВПЧ (-), n (%)	ВПЧ (+), n (%)
Иммуносупрессивные (РПТ)	СК	21	4 (19)	17 (81)
	Видимо здоровая кожа	20	9 (45)	11 (55)
Иммунокомпетентные	СК	22	6 (27)	16 (73)
	Видимо здоровая кожа	22	10 (45)	12 (55)
Здоровые доноры	Здоровая кожа	49	26 (53)	23 (47)

СК – себорейный кератоз, РПТ – реципиенты почечного трансплантата, ВПЧ – вирус папилломы человека, ВПЧ (-) – ВПЧ-негативные образцы, ВПЧ (+) – ВПЧ-позитивные образцы

гемодиализа и трансплантации почки ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского» (МОНИКИ) было обследовано 60 РПТ, у 20 из них имелись множественные СК. Было проведено исследование материала из очагов СК и видимо здоровой кожи области плеча. Обследовали также 22 иммунокомпетентных пациента с СК, у которых была исследована видимо здоровая кожа.

Среди 20 РПТ было 10 мужчин и 10 женщин в возрасте 46 ± 10 лет (от 22 до 60). Длительность иммуносупрессии составила от полугода до 13,5 года (медиана – 3 года). 16 пациентов РПТ получали микофенолата мофетил, такролимус и преднизолон, 4 – циклоспорин А в комбинации с другими иммуносупрессивными препаратами. Вирусная патология (вульгарные и подошвенные бородавки, опоясывающий герпес) зафиксирована у 4 из них, грибковые инфекции (разноцветный лишай, кандидоз слизистой оболочки рта или наружных половых органов) – у 9, акне и фолликулит – у 8, себорейный дерматит, алопеция, ксероз – у 5, ятрогенные осложнения (гиперплазия десен, гипертрихоз, пурпура) – у 4.

Среди иммунокомпетентных пациентов с СК было 11 мужчин и 11 женщин в возрасте 43 ± 15 лет

**Таблица 3.** Сравнительная частота обнаружения различных видов ВПЧ рода *beta* в себорейных кератомах и в видимо здоровой кожи иммуносупрессивных (РПТ) и иммунокомпетентных пациентов

Пациенты с СК	Исследуемые образцы	Количество ВПЧ (+) образцов	Виды ВПЧ, n (%)			
			<i>beta</i> -1*	<i>beta</i> -2*	<i>beta</i> -3*	<i>beta</i> -4, -5*
Иммуносупрессивные (РПТ)	СК	17	12 (71)	12 (71)	6 (35)	5 (29)
	Видимо здоровая кожа	11	10 (91)	7 (64)	3 (27)	5 (45)
Иммунокомпетентные	СК	16	5 (63)	5 (63)	1 (13)	1 (13)
	Видимо здоровая кожа	12	5 (2)	2 (33)	1 (17)	1 (17)
Здоровые доноры	Здоровая кожа	23	9 (39)	7 (30)	4 (17)	8 (35)

СК – себорейный кератоз, РПТ – реципиенты почечного трансплантата, ВПЧ – вирус папилломы человека, ВПЧ (+) – ВПЧ-позитивные образцы

* В том числе в ассоциации с другими видами

(от 24 до 78). Из них грибковые инфекции (микоз стоп) диагностированы у 9, себорейный дерматит – у 3, ксероз – у 5, склеродермия – у 4.

Контрольная группа была представлена 49 добровольцами (20 мужчин и 29 женщин) в возрасте 47 ± 8 лет (от 35 до 63), у которых кожные заболевания, в том числе ассоциированные с кожными типами ВПЧ, отсутствовали. Статистическая обработка полученных данных проводилась при помощи пакета программ Statistica 10.0. Достоверность различий определяли при помощи критерия χ^2 . 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 считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Генодиагностика ВПЧ-инфекции проводилась на базе ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора (ЦНИИЭ) [3].

Забор материала осуществляли в стерильных условиях борами (микробиоптаты). Исследуемый материал помещали в пробирки с транспортной средой и хранили при температуре -70°C .

Пробоподготовка проводилась методом обработки ткани протеиназой К с последующим выделением методом аффинной сорбции на силикагеле с использованием набора для выделения ДНК из клинического материала ДНК-сорб-С производства ЦНИИЭ.

Определение ВПЧ в биоптатах проводилось методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией

в режиме реального времени. Метод ПЦР в режиме реального времени позволил установить абсолютное количество геномов ВПЧ рода *beta* и ДНК человека в пробе. Амплификация и детекция проводились на приборе Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Австралия).

Для количественного определения ВПЧ рода *beta*, а также оценки его чувствительности и специфичности использовались рекомбинантные плазмидные положительные контроли, содержащие последовательность полных геномов ВПЧ кожных типов рода *alpha*, *gamma*, *mu*, *nu* и *beta*, – 1, 3, 4, 5, 7, 8, 15, 20, 24, 27, 37, 38, 49, 50, 65 (M. Favre Institut Pasteur, Unite Postulante Genetique, Papillomavirus et Cancer Humain (Франция); E.M. de Villiers, Abteilung tumorvirus-Charakterisierung Referenzzentrum fur Humanpathogene Papillomviren (Германия)), а также контрольные плазмиды фрагмента β -глобинового гена человека (ЦНИИЭ).

Для выявления ДНК ВПЧ рода *beta* применялись 4 системы олигонуклеотидов (группоспецифических праймеров и зондов):

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

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

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

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

Во все 4 системы введены олигонуклеотиды для выявления и количественного определения ДНК человека по β -глобиновому гену, 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 эпителиальных клеток (а соответственно, и копий вируса), попадающих в образец, существенно варьировало, использовалась методика нормирования количества вируса на количество клеток человека, что позволило получить надежные и достоверные данные о вирусной нагрузке ВПЧ в клетках кожи. Расчет нормализованной вирусной нагрузки (ВН) производился по формуле:
$$\text{ВН} = \lg((\text{кол-во ДНК ВПЧ} / \text{кол-во ДНК чел.}) \times 10^5)$$
 [2].

Результаты

Полученные данные представлены в виде таблиц 1–3.

Анализ предварительных данных показал, что у РПТ кератотические очаги появляются как на



открытых, так и на закрытых участках кожи. В себорейных кератомах и в видимо здоровой коже РПТ с высокой частотой выявляли ДНК ВПЧ рода *beta* (81 и 55% случаев соответственно) по сравнению с кожей здоровых доноров (47%). В очагах СК обнаруживались различные виды ВПЧ рода

beta: 1, 2, 3 и 4–5 (71, 71, 35 и 29% соответственно). При единичных очагах СК (от 1 до 3 по всему телу) в 43% случаев выявлялись ДНК ВПЧ β 1 и β 2. При множественных очагах СК (от 5 и более) у РПТ представители ВПЧ β 1 и β 2 обнаруживались в 91% случаев. ☞

Литература (References)

1. Кладова АЮ, Куведва ДА, Молочков ВА, Шипулина ОЮ, Киселев ВИ, Хлебникова АН, Козлова ЕС. Встречаемость кожных типов вируса папилломы человека в патологиях кожи. Альманах клинической медицины. 2006;9:44–50.
(Kladova AYU, Kuevda DA, Molochkov VA, Shipulina OYu, Kiselev VI, Khlebnikova AN, Kozlova ES. [Prevalence of skin types of human papilloma virus in skin lesions]. Al'manakh klinicheskoy meditsiny. 2006;9:44–50. Russian).
2. Куведва ДА, Кладова АЮ, Шипулина ОЮ, Молочков ВА. Разработка методики количественного определения папилломавирусов рода бета. В: Материалы VI научно-практической конференции «Социально значимые заболевания в дерматовенерологии. Диагностика, терапия, профилактика». М.; 2006. с. 97–8.
(Kuevda DA, Kladova AYU, Shipulina OYu, Molochkov VA. Development of *beta*-papilloma virus assay. In: Proceedings of the VI Research-to-Practice Conference “Socially Significant Diseases in DermatoVenereology. Diagnosis, Therapy, Prevention”. Moscow; 2006. p. 97–8. Russian).
3. Галил-Оглы ГА, Молочков ВА, Сергеев ЮВ. Дерматоонкология. М.: Медицина; 2005. 865 с.
(Galil-Ogly GA, Molochkov VA, Sergeev YuV. Dermato-Oncology. Moscow: Meditsina; 2005. 865 p. Russian).
4. Asgari MM, Kiviat NB, Critchlow CW, Stern JE, Argenyi ZB, Raugi GJ, Berg D, Odland PB, Hawes SE, de Villiers EM. Detection of human papillomavirus DNA in cutaneous squamous cell carcinoma among immunocompetent individuals. J Invest Dermatol. 2008;128(6): 1409–17.

Association of seborrheic keratosis and human papilloma virus in immune-suppressed and immunocompetent patients: a comparison study

Molochkov V.A. • Korneva L.V. • Snarskaya E.S. • Shcherbakova E.O. • Polyanskaya A.A. • Trofimova O.B.

Molochkov Vladimir Alekseevich – MD, PhD, Professor, Head of the Dermatovenereology and Dermato-Oncology Department¹

Korneva Lyubov' Vyacheslavovna – MD, PhD, Assistant Professor, Dermatovenereology and Dermato-Oncology Department¹

✉ 61/2–1 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation.

Tel.: +7 (495) 631 46 54.

E-mail: lvkorneva@mail.ru

Snarskaya Elena Sergeevna – MD, PhD, Professor, Department of Skin and Venereal Diseases, Institute for Professional Education²

Shcherbakova Evgeniya Ottovna – MD, PhD, Senior Research Associate, Chronic Dialysis and Kidney Transplantation Department¹

Polyanskaya Al'bina Aleksandrovna – Dermatovenereologist, Cosmetologist³

Trofimova Olga Borisovna – Junior Research Associate, Molecular Diagnosis and Epidemiology Department⁴

Aim: To study an association between seborrheic keratosis and human papilloma virus (HPV) using quantitative analysis of viral desoxyribonucleic acid (DNA); to assess prevalence of different phenotypes of *beta*-HPV.

Materials and methods: We examined 60 renal transplant recipients (20 of them had multiple seborrheic keratosis) and 22 immunocompetent patients with seborrheic keratosis. Control group included 49 healthy subjects.

Burr biopsy samples (micro-samples) were collected in sterile conditions. After sample procession and DNA isolation using DNK-sorb-C kit (Central Research Institute for Epidemiology – CRIE), polymerase chain reaction for HPV was performed with real-time fluorescent hybridization detection. For DNA amplification and detection we used Rotor-Gene 3000 analyzer (Corbett Research, Australia).

In the *beta*-HPV assay, recombinant plasmids were used as positive controls and control human

beta-globin gene fragments (CRIE). 4 oligo-nucleotide systems (group-specific primers and probes) were used for the detection of *beta*-HPV DNA.

Results: Keratotic lesions of open and covered skin regions were common in renal transplant recipients. *Beta*-HPV DNA was more frequent in seborrheic keratomas and intact skin (81% and 55%) of renal transplant recipients compared to healthy donors (47%).

Conclusion: HPV DNA was frequently detected in keratotic lesions and intact skin of renal transplant recipients. In immunocompetent patients prevalence of HPV DNA in keratotic lesions was significantly higher compared to intact skin.

Key words: benign epithelial skin lesions, seborrheic keratoma, *beta*-human papilloma virus, renal transplant recipients, immune-suppressed patients, immunocompetent patients, real-time detection of *beta*-HPV DNA.

¹ Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI); 61/2 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University; 8/2 Trubetskaya ul., Moscow, 119991, Russian Federation

³ Medical Aesthetics Clinic “Premium Aesthetics”; 3–6 Kazarmenny pereulok, Moscow, 109028, Russian Federation

⁴ Central Research Institute for Epidemiology; 3a Novogireevskaya ul., Moscow, 111123, Russian Federation