

На правах рукописи

Авад Жабер Махмуд Жабер

**РОЛЬ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА, КАК КОФАКТОРА РАЗВИТИЯ
ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ НЕМЕЛАНОЦИТАРНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ КОЖИ**

14.01.10 – Кожные и венерические болезни

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва - 2021

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Снарская Елена Сергеевна

Официальные оппоненты:

Корсунская Ирина Марковна – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» Российской академии наук, лаборатория физико-химических и генетических основ дерматологии, заведующий лабораторией

Ключарева Светлана Викторовна – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.М. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра дерматовенерологии, профессор кафедры

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение дополнительного профессионального образования «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента Российской Федерации

Защита диссертации состоится «28» июня 2021 г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.09 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), по адресу: 119435, г Москва, ул. Большая Пироговская, д. 19.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет), по адресу: 119034 г. Москва, Зубовский бульвар, д. 37, стр. 1 и на сайте организации: www.sechenov.ru

Автореферат разослан «___» _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

кандидат медицинских наук, доцент



Чебышева Светлана Николаевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В последние десятилетия интерес к роли вирусов папилломы человека (ВПЧ; HPV) неуклонно возрастает, что можно связать, как с эволюцией методов молекулярной диагностики, так и с широким распространением этой вирусной инфекции. Эпидемиологические и молекулярно-биологические данные позволяют предполагать, что DNA HPV рода *beta* способны вызывать развитие ряда эпителиальных новообразований кожи, так как потенциальные онкогенные свойства большинства папилломавирусов связаны с их способностью нарушать дифференцировку и индуцировать пролиферацию эпителиоцитов кожи и слизистых оболочек, что клинически реализуется в виде развития целого спектра эпителиальных неоплазий, с высокими рисками злокачественной трансформации при наличии определенных эпигенетических факторов [zur Hausen, H. 2002; Bosch, F.X., 2006.]. Онкогенная стратегия папилломавирусов усиливается процессом интегративной виrogenии, т. е. включением вирусного генома в состав клеточных хромосом эпителиальных клеток. В настоящее время предпринимаются попытки определения роли вируса папилломы человека (DNA HPV *beta*) в развитии отдельных вариантов немеланоцитарных эпителиальных неоплазий кожи (НЭНК). [Кладова А.Ю., 2007; Forslund, O., P. Nordin, and B.G. Hansson, 2000; Bedard, K.M., 2008., IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human Papillomaviruses. Lyon. 200.; Bouvard, V., et al., 2009.] В развитии процессов инициации эпителиальных неоплазий, важное значение имеют эпигенетические механизмы модификации генома под действием HPV, который изучен только на модели цервикальной интраэпителиальной неоплазии шейки матки [Киселев Л.Ф., 2002]. Одной из наиболее вероятных гипотез является кофакторная роль вирусов в промоции опухолевого роста клеток уже поврежденных опухоль-инициирующими эпигенетическими факторами и прежде всего результатом кумулятивного эффекта ультрафиолетового излучения, т.е. фотостарением [Morales-Ducret, C.R., et al., 1995], что косвенно подтверждается злокачественным перерождением элементов на открытых участках кожи [Ramos, N., et al., 2002.] где УФ-В служит промотором экспрессии ряда HPV и таким образом индуцирует и ускоряет опухолевый рост [Marcuzzi, G.P., et al., 2009].

Носительство HPV отмечается на открытых участках кожного покрова, малигнизация возникает в результате поэтапных, многолетних изменений структур эпидермиса, которые варьируют от незначительных доброкачественных, а затем, до выраженных злокачественных дисплазий. Кроме прямого влияния на клеточный цикл, кумулятивное УФ излучение вызывает иммуносупрессию, блокируя противоопухолевый контроль, который в противном случае

распознавал бы высокоантигенную кожную опухоль. Некоторые специфические типы HPV *beta* – 5, -8, -38 могут усугублять вызванное УФ повреждение DNA (ДНК), [Jackson, S., et al., 2000] при этом мутировавшие клетки не подвергаются апоптозу. Также DNA HPV *beta* нарушают механизмы репарации DNA приводя к повышению УФ-индуцированных клеточных мутаций [Iftner, T., et al., 2002, Giampieri, S. and A. Storey, 2004]. Определение вирусной вирогении является новым подходом в диагностике HPV инфекции, показавшим свою высокую значимость в мониторинге течения и прогрессирования генитальной папилломавирусной инфекции [Snijders P., Chris J., 2006]. С учетом вышеизложенного, проведение качественного и количественного определения интегративной вирусной вирогении при немеланоцитарных эпителиальных неоплазиях разной степени агрессивности (доброкачественных, предраковых и злокачественных) на фоне выраженного дерматогелиоза, является актуальной задачей дерматологии, решение которой будет способствовать дальнейшему пониманию ко факторных взаимосвязей персистирующей папилломавирусной инфекции и степенью дерматогелиоза, в инициации, промоции и прогрессии эпителиальных новообразований кожи.

Цель

Изучить ассоциацию спектра немеланоцитарных эпителиальных новообразований кожи (НЭНК) различной степени злокачественности с вирусом папилломы человека у пациентов с дерматогелиозом на основе молекулярно-генетической детекции интегративной вирусной вирогении DNA HPV и разработать алгоритм оценки рисков развития злокачественного потенциала в эпителиальных неоплазиях.

Задачи исследования:

1. Провести клиническую оценку стадии дерматогелиоза по Глогау и степени тяжести по шкале SCINEXA 80 пациентов с немеланоцитарными эпителиальными неоплазиями кожи, (НЭНК) разной степени агрессивности.
2. Провести сравнительную молекулярно-генетическую ПЦР детекцию в режиме Real-Time DNA вирусов папилломы *beta* кожного типа в эпителиоцитах у пациентов с дерматогелиозом IV степени по Глогау и немеланоцитарными эпителиальными неоплазиями разной степени агрессивности, у пациентов без дерматогелиоза и эпителиальными неоплазиями разной степени агрессивности и здоровых доноров.
3. Изучить вирусную нагрузку DNA HPV *beta* у 80 пациентов и 40 здоровых доноров, с использованием рекомбинантных плазмидных положительных контролей, содержащих последовательность полных геномов HPV кожных типов рода *alpha*, *gamma*, *mu*, *nu* и *beta*.
4. Разработать алгоритм оценки рисков развития злокачественного потенциала в немеланоцитарных эпителиальных новообразованиях кожи, на основании индекса риска развития озлокачествления, с целью повышения эффективности их ранней диагностики.

Научная новизна работы

Впервые продемонстрированы прямые корреляционные взаимосвязи наличия высокого уровня интегративной вирусной вирогении папилломавирусной инфекции с IV катастрофической стадией дерматогелиоза, что демонстрирует наличие их кофакторных влияний на процессы индукции и промоции в развитии эпителиальных немеланоцитарных новообразований кожи различной степени злокачественности.

Впервые продемонстрировано, что выявленные у больных с дерматогелиозом и множественными эпителиальными неоплазиями высокие показатели детекции папилломавирусов в пролиферирующей ткани, значительно превышают показатели вирусной нагрузки в нормальной коже и коррелируют с другими клинико-анамнестическими признаками, в частности, выраженными признаками дерматогелиоза по Глогау и конституционально высокой степенью фоточувствительности (*II–III по Фицпатрику*), что свидетельствует о формировании «*патологического тандема*», который формирует местная иммуносупрессия и множественные пролиферативные очаги эпидермиса различной степени агрессивности.

Впервые разработан алгоритм расчета индекса рисков развития злокачественного потенциала в немеланоцитарных эпителиальных новообразованиях кожи, с целью повышения эффективности ранней диагностики и профилактики злокачественных новообразований кожи.

Практическая значимость работы

С помощью количественного анализа впервые детально изучена ассоциация доброкачественных, предраковых и злокачественных НЭНК с ВПЧ рода beta. На примере дерматогелиоза продемонстрировано ранее не описанное изменение вирусной нагрузки ДНК ВПЧ в зависимости от степени тяжести дерматогелиоза и ассоциированных с ним клинических особенностей и вариантов спектра эпителиальных неоплазий различной степени агрессивности. Установленное увеличение вирусной нагрузки в образцах эпителиальных неоплазий кожи у пациентов с катастрофической стадией фотостарения по сравнению с нормальной кожей, указывает на активацию папилломавирусной инфекции и может свидетельствовать о влиянии вирусов папилломы человека кожного типа в промоции опухолевого роста клеток уже поврежденных опухоль-инициирующим эпигенетическим фактором – результатом кумулятивного эффекта ультрафиолетового излучения, т.е. фотостарения.

Проанализирована зависимость вирусной нагрузки DNA HPV в образцах кожи с немеланоцитарными эпителиальными неоплазиями кожи различной степени агрессивности (фиброэпителиальные полипы, базальноклеточные папилломы, кератозы, солнечный эластоз, аденомы, карциномы) с целью определения степени вероятности развития злокачественных

эпителиальных новообразований кожи, исходя из показателей нормальной вирусной нагрузки DNA HPV в здоровой коже.

Разработан алгоритм расчета рисков развития злокачественных эпителиальных немеланоцитарных новообразований кожи, на основании полученных статистически значимых данных, выведен Индекс рисков развития злокачественных эпителиальных немеланоцитарных новообразований кожи K и введена градация уровня риска (низкий, средний, высокий).

Индекс рисков рассчитывается по формуле:

$$ВН / ВНн = K,$$

где $ВН$ – показатель вирусной нагрузки,

$ВНн = 1,42 \pm 0,6$ – показатель вирусной нагрузки в здоровой коже.

Низкий уровень рисков развития злокачественных немеланоцитарных эпителиальных новообразований соответствует индексу $K1 = ВН / ВНн \leq 1,68$.

Средний уровень рисков развития злокачественных немеланоцитарных эпителиальных новообразований соответствует индексу $K2 = ВН / ВНн \leq 1,7 - 1,9$.

Высокий уровень рисков развития злокачественных немеланоцитарных эпителиальных новообразований соответствует индексу $K3 = ВН / ВНн \geq 2,0$.

Таким образом, при наличии индекса $K \geq 2,0$ (2,0 и более), существует высокий риск развития злокачественного потенциала в эпителиоцитах, что приводит к развитию злокачественных опухолей кожи, в частности базальноклеточных карцином.

При наличии индекса $K2 (1,9 - 2,0)$ следует рекомендовать регулярные контрольные осмотры кожного покрова пациентов, дерматоскопическое исследование в динамике и рекомендовать регулярное применение фотопротекторных средств с целью профилактики негативного воздействия солнечного излучения.

Положения выносимые на защиту

1. При клинико-морфологическом мониторинге спектра немеланоцитарных эпителиальных неоплазий у пациентов на фоне IV степени дерматогелиоза по Глогау выявлено наибольшее количество случаев наличия и сочетания целого спектра множественных очагов доброкачественных и злокачественных НЭНК. У пациентов с I степенью дерматогелиоза по Глогау, выявлено наличие сочетания только единичных очагов доброкачественного спектра опухолей.
2. Молекулярно-генетическая детекция HPV в образцах кожи пациентов с НЭНК выявила признаки интегративной вирогении папилломавирусной инфекции кожного типа рода beta во всех исследуемых образцах. Было установлено, что как в НЭНК, так и нормальной коже

выявлялся широкий спектр генотипов HPV рода beta, принадлежащих к различным видам ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 5$).

3. В исследуемых образцах пациентов со множественными злокачественными неоплазиями преобладали $-\beta 1$ и $-\beta 2$ виды генотипов HPV, а в исследуемых образцах пациентов с солитарными доброкачественными неоплазиями встречались все виды HPV генотипов $-\beta 1$, $-\beta 2$, $-\beta 3$, $-\beta 4$, $-\beta 5$.
4. В результате изучения вирусной нагрузки DNA HPV beta у пациентов и здоровых доноров установлено, что во всех вирус позитивных образцах у больных с множественными эпителиальными неоплазиями отмечаются высокие показатели вирусной виrogenии в пролиферирующей ткани, которые значительно превышают показатели вирусной нагрузки DNA вируса в нормальной коже и коррелируют выраженными признаками дерматогелиоза по Глогау (IV катастрофическая стадия) и конституционально высокой степенью фоточувствительности (II–III по Фицпатрику), что свидетельствует о формировании патологического тандема, который составляет местная иммуносупрессия и множественные пролиферативные очаги эпидермиса.

Внедрение результатов исследования

Полученные результаты и рекомендации успешно используются в лечебной и учебной работе кафедры и клиники кожных и венерических болезней им. В.А. Рахманова ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет).

Результаты исследования применяются в педагогическом процессе, как на до дипломном, так и последипломном уровне на кафедре кожных и венерических болезней им. В.А. Рахманова ФГАОУ ВО «Первый МГМУ имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет).

Степень достоверности и апробация результатов

Материалы диссертации и основные положения доложены и обсуждены на научно-практической конференции кафедры и клиники кожных и венерических болезней лечебного факультета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), научно-практической конференции дерматологов «Актуальные вопросы дерматовенерологии и дерматоонкологии» – МЗ РФ МОНИКИ им М.Ф. Владимирского 23–24 мая 2019, Москва; XXXVI научно-практической конференции с международным участием «Рахмановские чтения: «Московской дерматологической школе 150 лет: от истоков до современной дерматовенерологии и косметологии», Москва, 24-25 января 2019; XXXVII научно-практической конференции с международным участием «Рахмановские чтения: Современная дерматовенерология и

междисциплинарные связи», Москва 30–31 января 2020. Апробация работы состоялась на совместной клинической конференции кафедры и клиники кожных и венерических болезней лечебного факультета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) 24 ноября 2020 г.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ, в том числе 3 в изданиях, утвержденных перечнем ВАК РФ и 1 работа в журнале, входящим в базу данных Scopus.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 14.01.10 – Кожные и венерические болезни. Кожные и венерические болезни – область медицинской науки, изучающая кожный покров и видимые слизистые оболочки в норме и патологии. Основное внимание уделяется этиологии, эпидемиологии, патогенезу, диагностике, лечению и профилактике дерматозов и инфекций, передаваемых половым путем.

Диссертация соответствует формуле специальности и области исследований соответственно п. 1, 3.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания методик исследования, собственных исследований, заключения, выводов и указателя литературы. Работа изложена на 85 страницах компьютерного текста, иллюстрирована 8 таблицами, 21 рисунком. Указатель литературы содержит 120 источников, в том числе 82 иностранных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Работа выполнена на кафедре кожных и венерических болезней им. В.А. Рахманова ФГАОУ института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) в период 2018–2020 гг.

В исследование было включено 80 пациентов, находившихся на лечении и амбулаторно-консультативном приеме в клинике кожных и венерических болезней им. В.А. Рахманова Университетской клинической больницы № 2 и отделения ЛДО УКБ №2 Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (директор клиники – д.м.н., профессор О.Ю. Олисова) и 40 здоровых добровольцев.

Все пациенты были клинически обследованы, согласно Российским клиническим рекомендациям (2016): общий анализ крови, биохимическое исследование крови, ИФА крови на ВИЧ-инфекцию, сифилис, HBsAg, HCV, общий анализ мочи.

Лабораторное исследование клинических и биохимических параметров крови осуществлялось в межклинической биохимической лаборатории (руководитель – Тугаринова В.Г.)

Всем пациентам проводилось **клинико-морфологическое обследование** включающее:

- клинико-anamнестическое обследование (сбор жалоб, анамнеза жизни и заболевания, оценка клинических проявлений и определение их степени тяжести).
- ✓ Из данных анамнеза важными являлись: возраст и пол пациентов, фототип кожи, длительность существования и количество высыпаний ассоциированных с кожными типами НРV, наличие признаков фотостарения, наличие эпителиальных неоплазий на открытых участках кожного покрова (пациенты заполняли разработанный нами опросник) (Таблица 1).

Таблица 1 – Опросник для пациентов для определения факторов риска развития фотоиндуцированной патологии кожи

Вопросы	Данные анамнеза (да/нет)
УФ-облучение	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Хроническая неконтролируемая инсоляция, с детского возраста. ✓ Посещение соляриев: <ul style="list-style-type: none"> – длительность процедур; – частота сеансов. ✓ Смена климатических условий на более агрессивные по УФ излучению: <ul style="list-style-type: none"> – редко; – регулярно. ✓ Эпизоды сильных солнечных ожогов кожи в течении жизни: <ul style="list-style-type: none"> – да (1 или более); – нет
Пол	женщина; мужчина
Конституциональный тип фоточувствительности кожи по Фицпатрику	<ul style="list-style-type: none"> ✓ I мелано-дефицитный тип; ✓ II мелано-дефицитный тип; ✓ III мелано-компетентный тип
Осведомленность о необходимости регулярного применения фотопротекторов	<ul style="list-style-type: none"> ✓ низкая; ✓ крайне низкая; ✓ отсутствует

<p>Адекватность профилактических мер защиты кожи</p>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Эпизодическое применений средств фотопротекции. ✓ Никогда не применяет средства фотопротекции. ✓ Применяет, но: <ul style="list-style-type: none"> – фотопротекция низкого качества – с низким фактором защиты <15 SPF – крем и пластиковые солнцезащитные очки без УФ-фильтров
<p>Наличие эпителиальных неоплазий на открытых участках кожного покрова (базальноклеточные папилломы, фиброэпителиальные полипы, солнечное лентиго)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Нет. ✓ Есть: <ul style="list-style-type: none"> – единичные; – множественные

Осмотр дерматовенеролога включает:

- установление фототипа пациентов по шкале Фицпатрика;
- клиническую оценку стадий фотостарения (дерматогелиоза) (по Глогау Р.);
- клиническую оценку степени выраженности дерматогелиоза.

В результате анализа результатов опросников и анализа клинических признаков степени фотостарения по Глогау, мы получили возможность провести распределение всех участников исследования на две группы.

В 1-ю группу (*иммуносупрессивная*) вошли 42 пациентов с выраженными клиническими признаками фотостарения IV степени по Глогау (18 мужчин и 24 женщины) в возрасте $46,5 \pm 6,5$ года. Все пациенты этой группы имели скомпроментированный анамнез по данным опросника и множественные неоплазии, преимущественно на открытых участках кожного покрова.

Во 2-ю группу (*иммунокомпетентная*) вошли 38 пациентов без видимых признаков фотостарения (16 мужчин и 22 женщины) в возрасте $51 \pm 5,6$ года. Пациенты этой группы применяли фотопротекторы и не злоупотребляли солнечной инсоляцией, однако у них так же выявлены неоплазии кожного покрова.

Группа контроля состояла из 40 здоровых доноров (17 мужчин и 23 женщины) в возрасте $50 \pm 5,1$ года, у которых отсутствуют кожные заболевания, в том числе ассоциированные с кожными типами HPV (ВПЧ).

Была использована адаптированная шкала SCINEXA, содержащая 5 параметров для оценки степени хронологического старения кожи и 17 параметров, характеризующих изменения кожи вследствие кумулятивного эффекта воздействия УФ излучения у 1 и 2 группы

пациентов. Клинической оценке подвергался весь кожный покров (открытые и закрытые участки кожи) участников исследования. Клинические признаки дерматогелиоза характеризовались по схеме: 0 – отсутствие признака, 1 – 9 слабая выраженность признака (I степень), 2 – умеренная выраженность признака (II степень), 3 – сильная выраженность признака (III степень). Всем пациентам проводилось: дерматоскопическое исследование для верификации доброкачественных и злокачественных неоплазий, цитологическое исследование кожи и слизистых при наличии эпителиальных неоплазий.

Молекулярно-генетическая детекция HPV-инфекции

Проводилась на базе ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора. Микробиоптаты ткани получены с помощью малоинвазивной модификации взятия биопсии бритвенным способом, или методом соскоба (для получения суспензии клеток) с поверхности очагов дисплазии (базальноклеточных папиллом, аденом, фиброэпителиом, бородавок, кератоакантом, актинических кератом, карцином кожи) и из участков видимо здоровой кожи, закрытых от воздействия ультрафиолетового излучения у 80 пациентов и 40 здоровых доноров.

Метод: исследуемый клеточный материал помещали в пробирки, содержащие 1 мл транспортной среды (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва). Для максимального сохранения количества клеточной и вирусной DNA пробирки замораживали сразу после взятия материала и хранили до проведения ПЦР-анализа при -70°C . Пробоподготовка исследуемого материала осуществлялась методом обработки ткани протеиназой К с последующим выделением DNA методом аффинной сорбции на силикагеле с использованием набора для выделения «DNA-сорб С» в соответствии с инструкцией производителя (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Элюция проводилась в 100мкл ТЕ-буфера. Образцы, содержащие очищенную DNA, использовались в реакции амплификации нуклеиновых кислот. Для разработки методики количественного определения ВПЧ рода beta, а так же оценки ее чувствительности и специфичности, использовались рекомбинантные плазмидные положительные контроли, содержащие последовательность полных геномов HPV 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, France; E.-M. de Villiers, Abteilung tumorvirus-Charakterisierung Referenzzentrum fur Humanpathogene Papillomviren, Germany), а также контрольные плазмиды фрагмента β -глобинового гена человека (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора).

Для выявления DNA HPV рода *beta* использовались четыре системы олигонуклеотидов (группоспецифических праймеров и зондов):

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

- 2-я – для выявления генотипов вида $\beta 2$ (9, 15, 17, 22, 23, 38, 37, 80);
- 3-я – для выявления генотипов вида $\beta 3$ (49, 75, 76);
- 4-я – для выявления генотипов вида $\beta 4$ (92), $\beta 5$ (96), $\beta 1$ (20, 24 и 93 типы).

Последовательности всех олигонуклеотидов для 25 типов HPV beta рода были выбраны при анализе известных последовательностей HPV, взятых из Интернет ресурса “NCBI GeneBank” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и обработаны при помощи программы AlignX пакета Vector NTI 6 (InforMax Inc., 2000). Во все четыре системы введены олигонуклеотиды к последовательности β -глобинового гена человека, с целью соблюдения принципа внутреннего контроля (оценки адекватности забора, хранения и обработки образцов).

Выявление DNA HPV в образцах ткани проводилось в четырех пробирках. Каждая пробирка содержала одну из групп олигонуклеотидов для выявления HPV, а также олигонуклеотиды для выявления β -глобинового гена человека.

В состав реакционных смесей для ПЦР входили следующие компоненты:

- ✓ олигонуклеотидные праймеры и зонды;
- ✓ нуклеотиды в концентрации 0,2 мМ каждого;
- ✓ ПЦР-буфер (66мМ Tris-HCl, pH 8,8, 17 мМ (NH₄)₂SO₄, 4 мМ MgCl₂, 0,01% Tween 20);
- ✓ TaqF-DNA – полимеразы (2U в реакцию) (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва);
- ✓ очищенная DNA, выделенная из клинического материала – 10 мкл.

В отдельные пробирки (вместо образца DNA) вносили положительные и отрицательные контрольные образцы (10 мкл). Отрицательный контроль амплификации – представлял обычную реакционную смесь, в которую вместо образца DNA добавлялся ТЕ-буфер.

Положительный контроль амплификации – представлял собой фрагмент специфичной DNA (контрольные плазмиды HPV в концентрации 104 копий DNA HPV /мл). Процедуру термоциклирования проводили на амплификаторе Mx3000P (Stratagene, США), с адаптированным компьютером по программе: предварительный этап 950 C – 15 минут, затем при 950 C – 15 секунд, при

600 C – 30 секунд, при 650 C – 1 минута. Всего 50 циклов.

Выявление продуктов амплификации осуществлялась путем измерения флуоресцентного сигнала, нарастающего по мере накопления специфического продукта реакции. При положительной реакции кривая флуоресценции имела характерный S-образный вид. В соответствии с этим нами проводилась *качественная* оценка результатов реакции. Для *количественного* анализа использовались десятикратные разведения положительных плазмидных контролей 5, 8, 15, 37, 38, 20, 24, 49 типов HPV и DNA человека (стандарты). Для построения и математической обработки описанных кривых использовалась

программа построения, обработки, анализа кривых флуоресценции и ведения документации для метода «ПЦР в реальном времени» – Mx3000P (*Stratagene, США*).

Качество клинических образцов (качество забора, транспортировки, хранения, выделения) определялось по количеству геномной DNA (β -глобинового гена человека). Для достижения чувствительности не менее чем 100 копий DNA HPV /105 клеток человека, введено ограничение на минимальное количество клеток человека в образце, которое составило **5,9 log (8,0*10⁵) копий ДНК человека/мл**. В соответствие с полученными данными, все образцы, содержащие менее чем 5,9 log DNA человека/мл, считались невалидными.

✓ **Расчет нормализованной вирусной нагрузки.**

Метод ПЦР в режиме реального времени, положенный нами в основу разработки методики количественного выявления HPV рода beta, позволяет определять абсолютное количество DNA HPV и геномов человека в пробе. С учетом того, что при взятии клинического материала из очагов НЭНК или нормального эпителия кожи количество клеток и копий вируса, попадающих в исследуемый образец может варьировать, мы использовали методику нормирования количества вируса на количество клеток человека, что является оправданным в отношении внутриклеточных инфекционных агентов. Подобный стандартизованный подход позволял получать надежные и достоверные данные о вирусной нагрузке при различных патологиях кожи. Расчет нормализованной вирусной нагрузки (ВН) производился по формуле: $VH^* = \text{Log} ((\text{Кол-во DNA HPV} / \text{Кол-во DNA чел}) \times 10^5)$

* ВН нормализованная вирусная нагрузка

Проводился количественный и качественный анализ показателей вирусной нагрузки DNA HPV во всех выявленных вирус позитивных эпителиальных неоплазиях у пациентов основных групп.

Статистическая обработка данных

Достоверность различия частот определяли при помощи критерия «хи-квадрат». Доверительные границы к частотам рассчитывали на основании биномиального распределения. Для анализа характерных вирусных нагрузок рассчитывали десятичный логарифм количества вирусов, анализ его связи с другими переменными проводили с использованием метода параметрической статистики: достоверность различий средних по группам вычисляли с помощью дисперсионного анализа, а доверительные границы к среднему – на основе распределения Стьюдента.

Методику определения фототипов кожи проводили в соответствии со шкалой Фицпатрика. Клинически выделяют четыре стадии фотостарения кожи (по Р. Глогау).

Результаты исследований

Гендерный состав исследуемых пациентов включенных в исследование (n=80), представлен 46,25% мужчин (37чел.) и 53,75% женщин (43чел).

В результате анализа результатов опросников и анализа клинических признаков степени фотостарения по Глогау, мы распределили всех участников исследования на 2 группы.

В 1 группу (*иммуносупрессивная*) вошли все пациенты с выраженными клиническими признаками фотостарения IV степени по Глогау (n= 42), из них 18 мужчин и 24 женщины в возрасте $46,5 \pm 6,5$ лет. Все пациенты этой группы имели скомпроментированный анамнез по данным опросника.

Во 2 группу (*иммунокомпетентная*) вошли пациенты без признаков фотостарения (n = 38), из них 16 мужчин и 22 женщины в возрасте $51,0 \pm 5,6$ лет. Пациенты этой группы применяли фотопротекторы и не злоупотребляли солнечной инсоляцией.

Группа контроля (n=40) состояла из здоровых доноров в возрасте $50,0 \pm 5,1$ лет, из них 17 мужчин и 23 женщины, у которых отсутствуют кожные заболевания, в том числе ассоциированные с кожными типами HPV.

При анализе структуры фототипов пациентов (n=80) вошедших в исследование было установлено, что наибольшая часть пациентов – 59 человек (73,75%) принадлежала к II фототипу кожи, 12 (15%) человек имели I фототип и 9 (11,25%) – III фототип кожи по Фицпатрику. Процессу фотостарения кожи с высоким риском развития новообразований наиболее подвержены люди именно с I, II – мелано-дефицитным и III – мелано-компетентным типом конституциональной чувствительности.

Клиническая оценка выраженности стадий фотостарения (дерматогелиоза) (адаптированная шкала SCINEXA)

Для проведения клинической оценки степени выраженности дерматогелиоза была использована адаптированная шкала SCINEXA (Таблица 2).

Таблица 2 – Клинические признаки фотостарения (дерматогелиоза), оцениваемые по адаптированной шкале SCINEXA

Признаки, характеризующие хронологическое старение кожи			
№	Название признака	Локализация	Число баллов
1.	Неравномерная пигментация	Закрытые участки кожного покрова	0/3
2.	Тонкие морщины	Закрытые участки кожного покрова	0/1/2/3
3.	Провисание кожи	Закрытые участки кожного покрова	0/1/2/3

4.	Уменьшение объема жировой ткани	Закрытые участки кожного покрова	0/1/2/3
5.	Доброкачественные новообразования (гемангиомы, себорейный кератоз)	Закрытые участки кожного покрова	0/1/2/3
Признаки, характеризующие индуцированное УФО старение кожи			
1.	Нарушение пигментации (веснушки после солнечных ожогов)	Плечи, область верхнего плечевого пояса	0/1/2/3
2.	Солнечное лентиго	Задняя поверхность предплечий	0/1/2/3
3.	Диспигментация	Открытые участки кожи, шея, лицо	0/1/2/3
4.	Желтоватый цвет кожи	Открытые участки кожи, лицо	0/1/2/3
5.	Псевдорубцы	Открытые участки кожи	0/1/2/3
6.	Грубые морщины	Лицо	0/1/2/3
7.	Лимонная кожа Миллиана	Лицо	0/1/2/3
8.	Ромбовидная кожа шеи	Шея	0/3
9.	Болезнь Фавра-Рокушо	Лицо	0/3
10.	Ксероз кожи	Лицо, задняя поверхность предплечий	0/1/2/3
11.	Комедоны	Периорбитальная область	0/1/2/3
12.	Телеангиэктазии	Щеки, нос	0/1/2/3
13.	Перманентная эритема	Щеки, нос	0/1/2/3
14.	Актинический кератоз	Открытые участки кожи лицо	0/3
15.	Базально-клеточный рак кожи	Открытые участки кожи лицо	0/3
16.	Плоскоклеточный рак кожи	Открытые участки кожи лицо	0/3
17.	Меланома	Открытые участки кожи лицо	0/3

Таблица 3 – Степень выраженности фотостарения (дерматогелиоза) в баллах в группах 1, 2, контрольной группе, с использованием модифицированной шкалы SCINEXA

Признак	1 группа	2 группа	Контрольная группа
возраст	46,5 ± 6,5	51,0 ± 5,6	50,0 ± 5,1
степень дерматогелиоза в баллах	35,02 ± 0,56	18,8 ± 1,33	15,7 ± 1,15

При анализе данных, представленных на рисунке и в Таблице 3, очевидно, что максимальное количество баллов степени фотостарения кожи отмечено у пациентов входящих

в 1-ю группу $35,02 \pm 0,56$ (что соответствует IV степени фотоповреждений по Глогау – «катастрофической») и значительно превышает таковой показатель степени фотостарения во 2-й группе пациентов $18,8 \pm 1,33$ (что соответствует I степени дерматогелиоза по Глогау – умеренной) и в 2 раза превышен по сравнению с группой контроля $15,7 \pm 1,15$, несмотря на то, что средний возраст данных групп пациентов достоверно не отличался.

Клинико-морфологический анализ спектра эпителиальных неоплазий у исследуемых групп пациентов

При анализе всего спектра основных клинических проявлений эпителиальных неоплазий, выявленных у всех исследуемых пациентов, (n=80) нами диагностированы эпителиальные неоплазии кожи разной степени агрессивности. Так спектр доброкачественных неоплазий кожи был представлен: 18 очагами кератоза солнечного (Кс); 5 очагами типичной кератоакантомы (Ка); 21 очаг аденомы сальных желез (Ас); 22 очага фиброэпителиальных полипов (Фп), 27 очагов папиллом (ПП); вульгарных бородавок 15 очагов (ВБ). Предраковые неоплазии были представлены: 15 очагами актинического кератоза (Ак); 3 очагами болезни Бовэна (ББ). Злокачественные неоплазии были представлены: 30 очагами базальноклеточной карциномы (БК); 10 очагами атипичной кератоакантомы. (АК) (Таблица 4). Однако характер, степень агрессивности и количество НЭНК значительно варьировали в 1 и 2 группах пациентов.

При клинико-морфологическом мониторинге спектра эпителиальных неоплазий пациентов 1 группы, обращает на себя внимание преобладание множественного характера поражения кожи и наличие сочетаний доброкачественных и предраковых неоплазий со злокачественными НЭНК у пациентов этой группы. Кроме того, преобладающее количество очагов эпителиальных неоплазий у этих пациентов располагаются на открытых участках кожного покрова (лицо, шея, зона декольте, верхняя часть спины и верхние конечности). У 33 (78,5%) из 42 пациентов 1 группы, отмечено наибольшее количество выявленных случаев сочетания множественных очагов доброкачественных и злокачественных НЭНК на фоне выраженных клинических признаков фотостарения (соответствующих 4 степени по Глогау). В 17 случаях нами выявлено сочетание множественных базальноклеточных папиллом, лентиго, фиброэпителиальных полипов, кератоза солнечного и актинического с базальноклеточной карциномой, в 13 случаях – сочетание множественных базальноклеточных папиллом, аденом сальных желез, лентиго, солнечного эластоза, фиброэпителиальных полипов с гипертрофической формой актинического кератоза (предраковый дерматоз), в 3 случаях – сочетание множественных базальноклеточных папиллом, аденом сальных желез, с болезнью Бовэна. У остальных 9 пациентов первой группы отмечалось наличие

множественных очагов базальноклеточных папиллом, базальноклеточной карциномы на фоне выраженных признаков фотостарения, отличающихся большими размерами и выраженной тенденцией к преобладанию эрозивно-язвенных вариантов течения.

При клинико-морфологическом мониторинге спектра эпителиальных неоплазий у пациентов 2 группы (n-38), без клинических признаков фотостарения, нами выявлено, что в большинстве случаев выявленные очаги НЭНК носили солитарный характер и относились к спектру доброкачественных. Так, только в 18 случаях (47,36%) нами выявлено наличие сочетания солитарных очагов различных доброкачественных неоплазий у одного пациента. Из них в 15 случаях выявлено сочетание базальноклеточных папиллом, кератоза и фиброэпителиальных полипов; в 3 случаях выявлено сочетание солитарных очагов аденомы сальных желез, кератоза и вульгарных бородавок. В остальных 20 случаях очаги доброкачественных НЭНК были солитарными: в 15 случаях выявлены очаги аденомы сальных желез, в 3 случаях очаги базальноклеточных папиллом, в 2 случаях очаги вульгарных бородавок.

Таблица 4 – Распределение пациентов по нозологическим формам НЭНК и количеству исследованных опухолевых очагов

Группа новообразований	Нозологическая форма НЭНК	Количество больных	Количество исследованных опухолевых очагов
Доброкачественные опухоли кожи	Базальноклеточных папилломы	8	27
	Фиброэпителиальные полипы	7	22
	Бородавки вульгарные	4	15
	Кератоакантома типичная	3	5
	Кератоз себорейный	5	26
	Аденома сальных желез	18	21
Предзлокачественные опухоли	Актинический кератоз	12	15
	Болезнь Бовэна	3	3
Злокачественные опухоли кожи	Базальноклеточная карцинома	15	30
	Атипичная кератоакантома	3	10
Нормальная кожа		40	40
Всего:		120	199

Молекулярно-генетическая детекция вирусов папилломы человека в образцах кожи пациентов

Молекулярно-генетическая детекция DNA HPV рода *beta* проводилась в 199 образцах, при анализе полученных данных, мы выявили признаки интегративной вирогении папилломавирусной инфекцией кожного типа рода *beta* во всех исследуемых образцах в довольно высоком проценте случаев 70,85%. Так, последовательности DNA HPV рода *beta* выявлялись в 53,8% случаев себорейного кератоза, 20% – типичной кератоакантомы, 94,4% – актиническом кератозе АК, 66,6% – при болезни Бовена, 83,3% – при базальноклеточной карциноме, 80% – при атипичной кератоакантоме с признаками атипии. Наряду с этим, HPV *beta* рода обнаруживался и в микробиоптатах нормальной кожи здоровых доноров, но уже в незначительных количествах 32,5% (Таблица 5).

Таблица 5 – Количество HPV позитивных и негативных образцов в эпителиальных опухолях и образцах нормальной кожи

Исследуемые образцы	Кол-во образцов	Количество HPV негативных образцов		Количество HPV позитивных образцов	
		Абс.	%	Абс.	%
Себорейный кератоз	26	12	46,0	14	53,8
Базальноклеточные папилломы	27	–	–	27	100
Фиброэпителиальные полипы	7	3	42,8	4	57,2
Аденома сальных желез	18	13	72,2	15	83,3
Вульгарные бородавки	15	–	–	15	100
Кератоакантома	5	4	80,0	1	20,0
Актинический кератоз	18	1	5,6	17	94,4
Болезнь Бовэна	3	1	33,3	2	66,6
Базальноклеточная карцинома	30	5	16,6	25	83,3
Атипичная кератоакантома	10	2	20,0	8	80,0
Нормальная кожа (контроль)	40	27	67,5	13	32,5
Всего:	199	58	29,15%	141	70,85%

Таким образом, при анализе полученных данных, мы выявили признаки интегративной вирогении папилломавирусной инфекцией кожного типа рода *beta* во всех исследуемых образцах в довольно высоком проценте случаев. Кроме того, нами было установлено, что как в НЭОК, так и нормальной коже выявлялся весьма широкий спектр генотипов HPV рода *beta*, принадлежащих к различным видам ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 5$). При анализе сравнительной частоты

детекции генотипов ВПЧ рода beta в исследуемых образцах 1 группы иммуносупрессивных пациентов с 4 степенью фотостарения, папилломавирусы генотипов -β1 и -β2 встречались в 1,5–2 раза чаще, чем представители других β3, β4-β5 видов (Таблица 6). При этом частота детекции генотипов HPV рода beta в исследуемых образцах иммунокомпетентных пациентов группы с 1 степенью фотостарения HPV генотипы -β1, -β2, -β3, -β4, -β5 – встречались приблизительно с одинаковой частотой (Таблица 7).

Таблица 6 – Сравнительная частота детекции генотипов HPV рода beta в исследуемых образцах иммуносупрессивных пациентов 1 группы и нормальной коже (контроль)

Исследуемые образцы иммуносупрессивных пациентов 1 группы	Кол-во HPV позитивных образцов	спектр генотипов HPV рода beta			
		beta-1* (%)	beta-2* (%)	beta-3* (%)	beta-4,5* (%)
Себорейный кератоз	7	7 (50,0)	6 (42,8)	5 (35,7)	6 (42,8)
Кератоакантома атипичная	8	8 (100)	8 (100)	4 (50,0)	3 (37,5)
Актинический кератоз	17	12 (70,5)	17 (100)	7 (41,1)	5 (29,4)
Базальноклеточная карцинома	25	24 (96,0)	23 (92,0)	11 (44,0)	6 (24,0)
Болезнь Бовена	2	1 (50,0)	2 (100)	–	–
Нормальная кожа	13	3 (23,0)	4 (30,7)	9 (69,2)	5 (38,4)

*в том числе в ассоциации с другими видами.

Таблица 7 – Сравнительная частота детекции генотипов HPV рода beta в исследуемых образцах иммунокомпетентных пациентов 2 группы (без признаков дерматогелиоза) и нормальной коже (контроль)

Исследуемые образцы иммунокомпетентных пациентов 2 группы	Кол-во HPV позитивных образцов	спектр генотипов HPV рода beta			
		beta-1* (%)	beta-2* (%)	beta-3* (%)	beta-4,5* (%)
Себорейный кератоз	7	7 (100)	6 (85,7)	5 (71,4)	6 (85,7)
Базальноклеточные папилломы	27	27 (100)	25 (92,5)	21 (77,7)	23 (85,1)
Фиброэпителиальные полипы	4	3 (75,0)	4 (100)	2 (50,0)	1 (25,0)
Аденома сальных желез	15	14 (93,3)	13 (86,6)	9 (60,0)	14 (93,3)
Вульгарные бородавки	15	7 (46,6)	15 (100)	–	9 (60,0)
Кератоакантома типичная	1	1 (100)	1 (100)	–	1(100)
Нормальная кожа	13	3 (23,0)	4 (30,7)	9 (69,2)	5 (38,4)

*в том числе в ассоциации с другими видами

При изучении вирус позитивных образцов кожи пациентов 1 группы с фотостарением IV степени и клинической картиной доброкачественных, предраковых и злокачественных новообразований, нами выявлена интегративная вирусогения в виде ассоциации 2 и более видов вирусов рода beta, которая отмечена нами в 71,4% – 100% случаев образцов НЭНК. При изучении вирус позитивных образцов здоровой кожи лиц контрольной группы наблюдалось инфицирование только одним видом DNA HPV рода beta в 85,7% образцов ($p < 0,01$) (Таблица 8).

Таблица 8 – Встречаемость одного или нескольких генотипов DNA HPV рода beta в образцах эпителиальных опухолей и нормальной коже

Исследуемые образцы	Кол-во DNA позитивных образцов	Детекция одного генотипа DNA HPV в образце		Детекция 2 и более генотипов DNA HPV в образце	
		Абс.	%	Абс.	%
Себорейный кератоз	14	4	28,6	10	71,4
Кератоакантома атипичная	8	2	25,0	6	75,0
Болезнь Бовэна	2	–	–	2	100
Актинический кератоз	17	–	–	17	100
Базальноклеточная карцинома	30	3	10,0	27	90,0
Нормальная кожа (контроль)	13	9	69,2	4	30,8

Количественный анализ показателей вирусной нагрузки DNA HPV во всех вирус позитивных эпителиальных неоплазиях

В результате проведенного количественного анализа было установлено, что средние показатели вирусной нагрузки DNA HPV во всех вирус позитивных эпителиальных неоплазиях у пациентов 1 группы значительно превышали средние показатели вирусной нагрузки DNA вируса в нормальной коже ($1,4 \pm 0,6$ логарифма на 100 тыс. клеток), при этом в образцах себорейных кератом, вирусная нагрузка составляла $2,3 \pm 0,6$ логарифма на 100 тыс. клеток, образцах аденом сальных желез $3,7 \pm 0,9$ логарифма на 100 тыс. клеток, актинического кератоза $4,05 \pm 0,2$ логарифма на 100 тыс. клеток и карцином базальноклеточных $2,08 \pm 1,4$ логарифма на 100 тыс. клеток, различия имели достоверный характер ($p < 0,05$).

Таким образом, количественное измерение DNA HPV, позволяет более точно судить о характере присутствия вируса в опухолевой ткани и может рассматриваться, как предпочтительный метод для изучения связи вируса с развитием, течением или прогрессированием заболевания.

Увеличение вирусной нагрузки в образцах эпителиальных неоплазий кожи у пациентов с катастрофической стадией фотостарения по сравнению с нормальной кожей, указывает на активацию папилломавирусной инфекции. На основании полученных данных, нами была проанализирована зависимость вирусной нагрузки DNA HPV в образцах кожи с немеланоцитарными эпителиальными неоплазиями кожи различной степени агрессивности (фиброэпителиальные полипы, базальноклеточные папилломы, кератозы, солнечный эластоз, аденомы, карциномы) с целью определения степени вероятности развития злокачественных эпителиальных новообразований кожи, исходя из показателей нормальной вирусной нагрузки DNA HPV в здоровой коже.

Таким образом, учитывая полученные статистически значимые данные, мы вывели *Индекс рисков развития злокачественных эпителиальных немеланоцитарных новообразований кожи* К и ввели градации уровня риска (низкий, средний, высокий).

Индекс рисков развития злокачественных эпителиальных немеланоцитарных новообразований кожи К рассчитывается по формуле:

$$ВН /ВНn=К,$$

где ВН – показатель вирусной нагрузки

$ВНn = 1,42 \pm 0,6$ – показатель вирусной нагрузки в здоровой коже.

Таким образом, учитывая введенные градации уровней рисков, можно рассчитать:

Низкий уровень рисков развития злокачественных немеланоцитарных эпителиальных новообразований соответствует индексу К 1, при котором показатель вирусной нагрузки составляет менее 1,68.

$$К1=ВН 1/ВНn \leq 1,68.$$

Средний уровень рисков развития злокачественных немеланоцитарных эпителиальных новообразований соответствует индексу К2, при котором показатель вирусной нагрузки составляет 1,7–1,9.

$$К2=ВН2/ВНn \leq 1,7-1,9.$$

Высокий уровень рисков развития злокачественных немеланоцитарных эпителиальных новообразований соответствует индексу К3, при котором показатель вирусной нагрузки равен или превышает показатель 2,0.

$$К3=ВН3/ВНn \geq 2,0$$

Таким образом, при наличии индекса К 3 (2,0 и более), существует высокий риск развития злокачественного потенциала в эпителиоцитах, что приводит к развитию злокачественных опухолей кожи, в частности базальноклеточных карцином.

При наличии индекса K2 (1,9–2,0) следует рекомендовать регулярные контрольные осмотры кожного покрова пациентов, дерматоскопическое исследование в динамике и рекомендовать регулярное применение фотопротекторных средств с целью профилактики негативного воздействия солнечного излучения.

ВЫВОДЫ

1. При клинико-морфологическом мониторинге 80 пациентов с немеланоцитарными эпителиальными неоплазиями установлено, что максимальное количество баллов по шкале SCINEXA отмечено у пациентов, составивших **1-ю группу 35,02±0,56** баллов, что соответствует IV степени фотоповреждений по Глогау – «катастрофической» и значительно превышает таковой показатель степени фотостарения пациентов составивших **2-ю группу 18,8±1,33** балла, что соответствует I степени дерматогелиоза по Глогау – «умеренной» и в 2 раза превышен по сравнению с группой контроля **15,7±1,15** баллов, при этом средний возраст пациентов данных групп достоверно не отличался.

2. При клиническом изучении спектра немеланоцитарных эпителиальных неоплазий у пациентов 1 группы (n=42) в 33 случаях (78,5%) выявлено наибольшее количество как доброкачественных, так и злокачественных НЭНК на фоне IV степени дерматогелиоза по Глогау. У всех пациентов 2 группы, с I степенью дерматогелиоза по Глогау, выявлено наличие сочетания единичных очагов только доброкачественного спектра НЭНК.

3. Молекулярно-генетическая детекция HPV в 199 образцах кожи пациентов обеих групп выявила признаки интегративной вирогении папилломавирусной инфекцией кожного типа рода beta во всех исследуемых образцах. Было установлено, что как в НЭНК, так и нормальной коже выявлялся широкий спектр генотипов HPV рода beta, принадлежащих к различным видам ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 5$). Однако в исследуемых образцах 1 группы пациентов с IV степенью фотостарения, в 1,5–2 раза чаще встречались HPV генотипы видов $-\beta 1$ и $-\beta 2$, а в исследуемых образцах пациентов 2 группы с I степенью фотостарения встречались все виды HPV генотипов ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 5$).

4. В результате изучения вирусной нагрузки DNA HPV beta у 80 пациентов и 40 здоровых доноров установлено, что средние показатели вирусной нагрузки DNA HPV во всех вирус позитивных образцах у больных 1 группы с множественными эпителиальными неоплазиями отмечаются высокие показатели вирусной вирогении в пролиферирующей ткани, (*в себорейных кератомах 2,3 ± 0,6 логарифма на 100 тыс. клеток, аденомах сальных желез 3,7 ± 0,9 логарифма на 100 тыс. клеток, актиническом кератозе 4,05 ± 0,2 логарифма на 100 тыс. клеток*) которые значительно превышают показатели вирусной нагрузки DNA вируса в нормальной коже ($1,42 \pm 0,6 \log$) и коррелируют выраженными признаками дерматогелиоза по

Глогау (IV катастрофическая стадия) и конституционально высокой степенью фоточувствительности (II–III по Фицпатрику), что свидетельствует о формировании патологического тандема, который составляет местная иммуносупрессия и множественные пролиферативные очаги эпидермиса.

5. На основании анализа полученных данных разработан алгоритм рисков развития злокачественного потенциала в немеланоцитарных эпителиальных новообразованиях кожи, с целью определения степени вероятности развития злокачественных эпителиальных новообразований кожи, исходя из показателей нормальной вирусной нагрузки DNA HPV в здоровой коже.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. С целью оценки потенциального риска развития злокачественного канцерогенеза у пациентов с прогрессирующим дерматогелиозом может быть применен расчет показателей уровня интегративной вирогении папилломавирусов рода beta.

2. Количественное измерение вирусной нагрузки DNA HPV в эпителиальных новообразованиях различной степени агрессивности позволяет более точно судить о характере присутствия вируса в опухолевой ткани и может рассматриваться как предпочтительный метод для изучения связи вируса с развитием, течением или прогрессированием заболевания.

3. Для определения степени вероятности развития злокачественных эпителиальных новообразований кожи, исходя из показателей нормальной вирусной нагрузки DNA HPV в здоровой коже рекомендуется использовать индекс рисков развития злокачественных эпителиальных немеланоцитарных новообразований кожи K , рассчитываемый по формуле: $VH / VH_n = K$ (VH – показатель вирусной нагрузки; $VH_n = 1.42 \pm 0,6$ - показатель вирусной нагрузки в здоровой коже). При наличии индекса $K3$ (2,0 и более) существует высокий риск развития злокачественного потенциала в эпителиоцитах, что приводит к развитию злокачественных опухолей кожи, в частности, базальноклеточных карцином. При наличии индекса $K2$ (1.9 – 2.0) следует рекомендовать регулярные контрольные осмотры кожного покрова пациентов, дерматоскопическое исследование в динамике и регулярное применение фотопротекторных средств с целью профилактики негативного воздействия солнечного излучения.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Снарская Е.С., Авад Жабер Махмуд Жабер, Шнахова Л.М. Сочетанная фотоиндуцированная патология кожи и глаз у пациентов на фоне дерматогелиоза. // **Российский журнал кожных и венерических болезней**; 2019; 22(1–2). – С. 4-10.

2. **Авад Жабер Махмуд Жабер**, Снарская Е.С. Вирус папилломы человека, как эпигенетический кофактор развития ряда эпителиальных немеланоцитарных новообразований кожи (*обзор литературы*) // **Российский журнал кожных и венерических болезней**; 2019; 22(5–6). – С. 138-148.
3. Снарская Е.С., **Авад Жабер Махмуд Жабер**. Эпителиальные немеланоцитарные новообразования кожи и роль вируса папилломы. // XXXVI Научно-практическая конференция с международным участием Рахмановские чтения: Московской дерматологической школе 150 лет: от истоков до современной дерматовенерологии и косметологии. Сборник тезисов. – М.: Практическая медицина. 2019. – С. 86-88.
4. **Авад Жабер Махмуд Жабер**, Снарская Е.С. Вирус папилломы человека *beta* и ультрафиолетовое облучение, как кофакторы канцерогенеза. // XXXVII Научно-практическая конференция с международным участием Рахмановские чтения: Современная дерматовенерология и междисциплинарные связи. Сборник тезисов. – М.: Практическая медицина. 2020. – С. 10-11.
5. Снарская Е.С., **Авад Жабер Махмуд Жабер**. Интегративная вирусология папилломавирусов рода *beta* кожного типа на фоне прогрессирующего дерматогелиоза, как потенциальный риск развития злокачественного канцерогенеза. // **Российский журнал кожных и венерических болезней**; 2020; 23(3). – С. 132–146.
6. Olisova O.Yu., Snarskaya E.S., Anpilogova E.M., **Jaber Mahmoud Jaber Awad** Molecular detection and genotyping of β -Human Papillomavirus and its association with epithelial skin neoplasms. **Dermatol Ther (Scopus)**. 2021 Jan 9:e14767. doi: 10.1111/dth.14767.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- DNA HPV – дезоксирибонуклеиновая кислота вируса папилломы человека (ДНК ВПЧ)
 КС – кератоз солнечный
 КА – типичная кератоакантома
 АС – аденома сальных желез
 ФП – фиброэпителиальный полип
 БП – базальноклеточная папиллома
 ВБ – вульгарная бородавка
 АК – актинический кератоз
 ББ – болезнь Бовэна
 БК – базальноклеточная карцинома
 АК – атипичная кератоакантома
 НЭНК – немеланоцитарные эпителиальные новообразования кожи
 ВН – показатель вирусной нагрузки
 ВНп – показатель вирусной нагрузки в здоровой коже
 К – индекс риска развития злокачественных эпителиальных немеланоцитарных новообразований кожи