

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

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

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Снарская Елена Сергеевна

Москва – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	21
2.1 Общая схема исследования.....	21
2.2 Молекулярно-генетическая детекция DNA HPV методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме «Real Time».....	25
2.3 Расчет нормализованной вирусной нагрузки.....	26
2.4 Молекулярно-биологическое исследование.....	27
2.5 Статистическая обработка данных.....	29
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	30
3.1 Клиническая характеристика больных, включенных в исследование.....	30
3.2 Анализ структуры фототипов пациентов.....	31
3.3 Клиническая оценка степени выраженности фотостарения.....	32
3.4 Клинико-морфологический анализ спектра эпителиальных неоплазий.....	34
3.5 Молекулярно-генетическая детекция вирусов папилломы человека в образцах кожи пациентов.....	47
3.6 Анализ сравнительной частоты детекции генотипов HPV рода beta в исследуемых образцах НЭНК.....	50
3.7 Количественный анализ показателей вирусной нагрузки DNA HPV во всех вирус позитивных эпителиальных неоплазиях.....	53
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	56
ВЫВОДЫ	68
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	70
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	71
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	72

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

По данным мировой литературы известно, что весомая доля опухолевых процессов у человека развиваются в результате участия онкогенных вирусов, в качестве которых рассматривается, в том числе, многочисленная группа вирусов папилломы человека (ВПЧ, HPV) [1,2]. Эти возможности папилломавирусов реализуются при наличии определенных эпигенетических факторов и связаны с их способностью индуцировать пролиферацию эпителиальных клеток кожи и слизистых оболочек, что приводит к развитию эпителиальных неоплазий, с выраженными рисками злокачественной трансформации [3,4]. Папилломавирусы кожного типа рода бета инфицируют многослойный плоский эпителий кожи, что и определяет спектр клинических мишеней, которыми являются прежде всего все морфологические структуры эпидермиса кожи [1,2,5]. Важной особенностью персистенции вирусов является возможность развития процесса интегративной вирогении, иначе говоря, включению гена вируса в структуры хромосом клеток эпидермиса [1,4,5]. Процессы вирогении содействуют, с одной стороны, устойчивой дестабилизации клеточного генома, приводя к необратимым мутациям и нарушениям процессов апоптоза. С другой стороны, прогрессирующее накопление массы мутировавших клеток ведет к приоритетной выборке инвазивных клеток. Так, ДНК вирусов папилломы обнаружена в хромосомах клеточных линий генитальных опухолей. В частности, линия клеток HLA цервикальной аденокарциномы, содержит геном вируса высокого онкогенного риска 18 типа [4,9,14].

Большой интерес представляет собой одна из наиболее вероятных гипотез влияния вирусов папилломы человека кожного типа, в которой они

рассматриваются как кофактор промоции опухолевого роста клеток уже поврежденных опухоль-инициирующими эпигенетическими факторами [40] и, прежде всего, результат кумулятивного эффекта ультрафиолетового излучения, то есть фотостарения [1,5,6,8,10,13,19,37,20,25,26,42]. Процесс может длиться очень медленно, незаметно, в течение нескольких лет, приводя к развитию злокачественных эпителиальных опухолей преимущественно на открытых участках кожи. Развитие злокачественного потенциала, которое может занимать годы, является результатом многоступенчатых трансформаций в морфологических структурах эпидермиса, которые впоследствии клинически манифестируют в виде единичных доброкачественных образований, а затем приобретают множественный характер уже в сочетании со злокачественными дисплазиями [1,5,6,20,26,42]. По данным многочисленных исследований, главную роль в развитии немеланоцитарных эпителиальных неоплазий кожи (НЭНК) принадлежит воздействию ультрафиолетового излучения (УФ) [6,20,25,26,27]. Особенно значительным является облучение с длиной волны 280-320 нм, что приводит к появлению клеточных мутаций в генах, контролирующих клеточный цикл, репарацию ДНК и апоптоз, в результате которого неизбежно запускается процесс фотоканцерогенеза [3,11,12,13,15,39]. Важными условиями для развития фотоканцерогенеза является образование мутировавших форм раннего проонкогенного белка p53 [18,38], накопление антиапоптотического белка bcl-2 [34], изменение уровня экспрессии Fas-рецепторов [38], прогрессирующее накопление металлопротеиназ MMP-1,-9 на фоне значительного обеднения TIMP [18]. Кроме того, кумулятивный эффект ультрафиолетового излучения вызывает локальную и системную иммуносупрессию, блокируя механизмы противоопухолевого контроля, который в противном случае распознал бы высокоантигенную кожную опухоль [8,10,20,40,44]. На коканцерогенез указывает злокачественное перерождение элементов, располагающихся на открытых участках кожи, например, при веррукозной эпидермодисплазии ВЭ [44, 72-78], при которых показано, что УФ-В служит промотором экспрессии ВПЧ-5 и -8 [44, 93]. Кроме того, промоции процессов канцерогенеза способствуют такие

эпигенетические факторы, как любая персистирующая хроническая инфекция, длительная цитостатическая и гормональная терапия, рентгенологическое и радиооблучение, коинфицирование несколькими HPV-типами, курение [40, 44, 94, 96, 97]. Играет определенную роль и генетическая предрасположенность, которая определяет способность организма к чувствительности к заражению и/или способность к элиминации вирусов [47, 98]. В литературе есть многообещающие данные в целом ряде современных исследований последних десятилетий, отмечающих роль вирусов папилломы рода beta при некоторых эпителиальных опухолях [32, 40, 63, 68, 109, 118, 124, 129]. В ряде работ указывается, что развитие бородавок, папиллом, некоторых немеланоцитарных неоплазий кожи резко возрастает после операций трансплантации [103, 105, 114, 129]. В настоящее время очевидно, что сам факт детекции вирусов папилломы в НЭНК не может являться доказательством его прямой этиологической роли, так как может быть следствием, как активной вирусной инфекции, так и бессимптомной персистенции вирусов, характерной для условно-патогенной флоры. Определение характера и особенностей вирусной нагрузки в ДНК опухолевых клеток кожи различной степени агрессивности на фоне выраженного фотостарения является новым подходом в изучении этиопатогенеза опухолей [31, 109, 113], что позволит с большей долей вероятности судить о значении и характере присутствия вирусов в опухолях на фоне иммуносупрессивной кожи и глубже понять механизмы, связывающие НЭНК с HPV. Сегодня доступны молекулярно-генетические исследования для выявления DNA HPV, что является целесообразным для прогностического обнаружения канцерогенных свойств HPV при эпителиальных дисплазиях.

Все вышеперечисленное определило цель и задачи настоящего исследования:

Цель: Изучить ассоциацию спектра немеланоцитарных эпителиальных новообразований кожи различной степени злокачественности с вирусом папилломы человека у пациентов с дерматогелиозом на основе молекулярно-генетической детекции DNA HPV и разработать унифицированный алгоритм рисков развития злокачественного потенциала в эпителиальных неоплазиях.

В соответствии с целью исследования нами были поставлены следующие задачи:

1. Провести клиническую оценку стадий дерматогелиоза по Глогау и степень его тяжести по шкале SCINEXA у 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 характер вирусной нагрузки DNA HPV beta у 80 пациентов с дерматогелиозом IV степени и немеланоцитарными эпителиальными неоплазиями разной степени агрессивности, у пациентов без дерматогелиоза и эпителиальными неоплазиями разной степени агрессивности и 40 здоровых доноров.
4. Разработать алгоритм оценки рисков развития злокачественного потенциала в немеланоцитарных эпителиальных новообразованиях кожи, на основании индекса риска развития озлокачествления, с целью повышения эффективности ранней диагностики злокачественных новообразований кожи.

Научная новизна и практическая значимость

Впервые изучены и продемонстрированы прямые корреляционные взаимосвязи высокого уровня интегративной вирусной вирогении папилломавирусной инфекции с дерматогелиозом IV стадии, что подтверждает наличие их

кофакторных влияний на промоцию опухолевого роста клеток уже поврежденных опухоль-инициирующим эпигенетическим фактором - результатом кумулятивного эффекта ультрафиолетового излучения, то есть фотостарения.

Впервые доказано, 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 (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 различной степени агрессивности.

Впервые разработан алгоритм рисков развития злокачественного потенциала в немеланоцитарных эпителиальных новообразованиях кожи, на основании индекса риска развития озлокачествления, с целью повышения эффективности ранней диагностики злокачественных новообразований кожи.

Впервые изучена ассоциация доброкачественных, предраковых и злокачественных НЭНК с HPV рода beta.

Впервые продемонстрировано ранее не описанное изменение характера вирусной нагрузки DNA HPV в зависимости от степени тяжести дерматогелиоза и клинических особенностей спектра эпителиальных неоплазий, которые отличаются различной степенью агрессивности.

Установлено увеличение вирусной нагрузки в образцах эпителиальных неоплазий кожи у пациентов с четвертой стадией фотостарения, что указывает на интегративную вирусную виrogenию и высокую активность вирусов папилломы и может свидетельствовать о выраженном влиянии вирусов кожного типа в промоции опухолевого роста клеток, поврежденных опухоль-инициирующим эпигенетическим фактором, то есть фотостарением.

Впервые 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).

Впервые 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 К и введена градация уровня риска (низкий, средний, высокий).

Индекс рисков рассчитывается по формуле:

$$ВН / ВН_n = К$$

ВН – показатель вирусной нагрузки

ВН_n = 1.42±0,6 - показатель вирусной нагрузки в здоровой коже

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 К2 (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.

Внедрение в практику результатов исследования

Полученные в ходе исследования результаты внедрены в научно-исследовательскую, практическую и педагогическую деятельность кафедры и

клиники кожных и венерических болезней им. В.А. Рахманова ФГАОУ ВО «Первый МГМУ имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет).

Основные 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. Был выявлен широкий спектр генотипов вируса рода бета как в опухолях, так и в коже доноров.
3. В случаях со множественными злокачественными неоплазиями преобладали - β 1 и - β 2 виды генотипов HPV, а в исследуемых образцах пациентов с солитарными доброкачественными неоплазиями встречались все виды HPV генотипов - β 1,- β 2,- β 3, - β 4, - β 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 вирогении 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.

Апробация работы

Материалы диссертации доложены и обсуждены на:

- Научно-практической конференции кафедры и клиники кожных и венерических болезней Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), 15 апреля 2019;
- Научно-практической конференции дерматологов «Актуальные вопросы дерматовенерологии и дерматоонкологии»-МЗ РФ МОНИКИ им М.Ф. Владимирского, Москва, 23-24 мая 2019;
- 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;
- XIX Всероссийском съезде дерматовенерологов и косметологов, Москва, 18-21 июня 2019 г.
- Межвузовской научно-практической конференции, Москва, 29 октября 2019 г.
- XXXVII Научно-практической конференции с международным участием «Рахмановские чтения: современная дерматовенерология и междисциплинарные связи», Москва, 30-31 января 2020 г.

Апробация диссертационной работы состоялась на научно-практической конференции кафедры и клиники кожных и венерических болезней им. В.А.

Рахманова Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет) 24 ноября 2020 года.

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.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 85 страницах машинописного текста. Состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Список литературы включает 120 источников, в том числе 82 иностранных автора. Работа иллюстрирована 8 таблицами, 21 рисунком.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Опухоли кожи являются одной из самых многочисленных и клинически разнообразных нозологий кожи. Группа немеланомных эпителиальных новообразований кожи (НЭНК) является распространенной группой опухолей человека. Развитию НЭНК способствуют многообразные факторы: ультрафиолетовое и ионизирующее излучение, курение, иммуносупрессия, меланодефицитный фототип кожи, наследственную предрасположенность [1-7]. В последние десятилетия отмечается значительный рост заболеваемости опухолями кожи, на фоне которого появился интерес к изучению роли вирусов папилломы, так как инфицирование вирусом папилломы человека в популяции так же стремительно растет и приближается к 90%. В настоящее время целесообразно рассматривать роль вирусов с позиций взаимного влияния и потенцирования процессов эпителиальноклеточного канцерогенеза с кумулятивным воздействием известного эпигенетического фактора, которым является ультрафиолетовое излучение [3,4,6,7-10]. Вирус папилломы человека имеет более двухсот вариантов генотипов, однако к родам, инфицирующим человека, относятся лишь некоторые: альфа, бета, гамма, мю, ню [1,2]. Эпидемиологические данные позволяют предполагать, что вирусы папилломы принадлежащие к роду бета имеют высокую способность способствовать развитию эпителиальных новообразований кожи, однако данная способность еще не ясна до конца [4,5,7,10]. Актуальными теориями возможного участия персистирующих вирусов папилломы кожного типа как ко-факторов канцерогенеза являются следующие три. Первая модель рассматривает вирусы с позиции усугубления мутаций эпителиоцитов, которые уже подверглись значительным изменениям генома в результате процесса фотостарения. Вторая модель рассматривает вирус с позиций триггера, который запускает опухолевый процесс, а потом теряет свои функции и даже исчезает из опухолевой ткани. Третья

модель рассматривает наличие персистенции вируса как случайный факт [4,5]. Глобальные исследования ученых, проведенные в последние десятилетия доказали значение и влияние кумуляции ультрафиолета длинны волны В в этиопатогенезе эпителиальных опухолей [3,11,13-17], где оно является промоутером повышения экспрессии вирусов -5 и -8 типов, за счет которого прогрессирует рост опухолей [10,18-20,25,36,38]. Доказано, что неконтролируемое многолетнее влияние УФ излучения неотвратно приводит к необратимому повреждению и невозполнимой утрате клеток Лангенгарса, снижению их антиген-презентативной функции и угнетению клеточного иммунного ответа на антигены опухоли [11,12,13,15,19]. В дальнейшем во всех клетках эпидермиса, подвергавшихся хроническому воздействию УФ-излучения, накапливается особый мутантный вариант белка p53, который уже не обладает своей основной функцией - инициацией процесса апоптоза [18,35,38,39]. Структурные мутации этого белка приводят к появлению в эпителиальных клетках новых свойств, присущих только опухолевым клеткам: отсутствием чувствительности к супрессирующим сигналам, иммортализации, нарастающей генетической нестабильности, выраженной активностью процессов неоангиогенеза, развитием блокировки процессов клеточной дифференцировки и т.д., что в результате позволяет в короткие сроки преодолеть сразу несколько этапов опухолевой прогрессии [19-21]. Важным фактом является то, что повышенная экспрессия белка p53 присуща не только злокачественным опухолям кожи, таким как, например, базально-клеточный (мутации в 20-29% клеток) и метатипический рак (мутация определялась в 50-72% клеток), но и клеткам предзлокачественных опухолей, например, актиническому кератозу [21,22]. Процесс фотостарения кожи является многокаскадным молекулярно-биологическим процессом, основные структурные изменения при котором происходят в структурах эпидермально-дермальных слоев и являются результатом накопления и прогрессирующей реализации кумулятивного эффекта ультрафиолетового облучения, приводящий к фатальным инволютивным процессам, на фоне которых критически высоки риски развития эпителиальных опухолей кожи (кератоакантом, актинического кератоза,

базальноклеточного, метатипического и плоскоклеточного рака кожи, меланомы) [12,16,17,23-27]. Типичными клиническими признаками фотостарения являются прежде всего: наличие эластоза, глубоких статических морщин, выраженной диспигментации кожи (гипер- и гипопигментация), ксероз и шелушение, дряблость и провисание кожи, серо-желтоватый цвет, грубые атрофии кожи, телеангиэктазии, актиническая пурпура, а так же появление и прогрессирующий характер роста доброкачественных опухолей в сочетании с предраковыми (солнечный кератоз) и даже злокачественными (меланома, базально-клеточный и плоскоклеточный рак кожи) заболеваниями кожи с преобладающей локализацией на открытых участках кожного покрова (лицо, шея, декольте, предплечья и кисты рук) [12-15,19,28-30]. Стадия и характер клинических признаков, характеризующих процесс фотостарения, прямо пропорционален количеству времени ультрафиолетового облучения накопленному с момента рождения [19,30-33,36]. В аспекте обсуждения ко-факторной роли папиллома вирусной инфекции и кумулятивного эффекта ультрафиолета, важным признаком чего является факт носительства вирусов кожных типов на участках, подвергающихся неконтролируемому воздействию УФ излучения. Так, целым рядом исследований было продемонстрировано, что некоторые типы вирусов рода бета – 5, -8, -38 достоверно усиливают повреждения ДНК эпителиоцитов и кератиноцитов и значительно удлиняют жизнь кератиноцитов, дестабилизируют процессы апоптоза и практически обеспечивают бессмертие всех мутировавших клеток [32,38,39,41-44]. Это означает, что далее все эти клетки на фоне персистирующей папилломавирусной инфекции, в свою очередь нарушают процессы передачи сигнала по пути специфической Вак-сигнализации [45,48]. Фактически это второй вариант блокировки апоптоза, путем блокады функций проапоптотического белка Вак, экспрессируемого клетками в большом количестве после УФ-индуцированного повреждения структур ДНК [19,37,38,45]. Важными механизмами реализации вирусного канцерогенного потенциала является способность вирусов нарушать и механизмы репарации ДНК за счет прямого связывания с особыми белками XRCC1, приводя к нарушению процессов

утилизации тиминовых димеров, что так же приводит к накоплению УФ-индуцированных мутаций [20,21,48].

Таким образом, концепция включающая наличие персистирующей папилломавирусной инфекции на фоне прогрессирующей иммуносупрессии вызванной процессом фотостарения, представляется нам актуальной и рассматривается как важный кофактор процессов канцерогенеза и развития всего спектра НЭНК. Так, по данным некоторых литературных источников, есть данные исследователей, которые указывают на серопозитивность по ВПЧ, которая может составлять от 24 до 57% среди лиц европейской популяции [43-50] и указывают на возможность отличия данных у лиц, принадлежащих разным этническим группам [51-56]. Некоторые авторы выявили серопозитивность по множественным типам вируса при плоскоклеточном раке [57,60,61], однако эти данные дискутируются [62,65]. Несмотря на проведение масштабных исследований кластеров антител и основных типов вирусов папилломы, до настоящего времени нет четкого представления о кожных типах вирусов папилломы высокого канцерогенного риска [65-67]. Основываясь на данных International Agency for Research on Cancer, возможными канцерогенами принято считать типы ВПЧ-5 и 8, правда, это утверждение относится только к случаям верруциформной эпидермодисплазии [35,74-78]. В динамике процессов инициации и промоции опухолей определенно важное значение оказывают эпигенетические факторы способствующие модификации генома в присутствии папилломавирусной инфекции [66,67,68,69-72]. Ранее уже была продемонстрирована подобная модель на примере повышенной секреции онкобелка E7 под влиянием вирусов высокого онкогенного риска 16 типа, который оказывал стимулирующее влияние на процессы метилирования генов противоопухолевой защиты [68,73-75].

Подобный пример эпигенетического механизма влияния вирусов папилломы удалось продемонстрировать в случаях интраэпителиальных неоплазий шейки матки [74,75], когда увеличение репликации вирусов папилломы в инфицированных клетках неизбежно приводит к появлению их опухолевого

фенотипа. Следовательно, рассуждая таким образом, вирус папилломы человека кожного типа должен иметь подобный путь участия в обретении эпителиоцитами опухолевого фенотипа. По данным мультигенного микроанализа в клетках, на примере поражения их пилломавирусами тридцать первого типа, кардинально меняется экспрессия большинства генов, из которых сто семьдесят восемь подвергаются активации, а сто пятьдесят, наоборот, торможению [50]. При анализе литературных данных, становится так же очевидным тот факт, что описанные случаи по выявлению вирусов в различных эпителиальных опухолях отличаются [78-82], что, на наш взгляд, обусловлено различной степенью чувствительности используемых методик исследования. Так, например, большинство из них обладают низкой степенью селективности и могут идентифицировать вирус только при его максимальном количестве, другие же, наоборот, являются высокоселективными и определяют единичные вирусы в клетках кожи [83-86]. Мы уже упоминали, о том что различия в получаемых исследователями данных о встречаемости вирусов при опухолях может быть так же обусловлено особенностями популяций народов Европы и США [87,89,90]. Подобные исследования в РФ начали проводить совсем недавно и они пока носят единичный и разрозненный характер [31, 66]. Частота случаев детекции ДНК вирусов папилломы человека в эпителиальных опухолях значительно возросла особенно за последние годы, так как сегодня доступны более совершенные методы молекулярно-генетической диагностики. В ряде последних исследований было выявлено, что процент детекции вирусов в опухолях вырос, так, почти в 70% и даже 90% случаев исследованных опухолей детектировались копии вирусов папилломы преимущественно кожного типа бета, в других версиях детекция выявляла и вирусы родов гамма, мю, ню. Важно отметить, что слизистые типы как правило, не обнаруживались в случаях немеланоцитарных опухолей кожи, за небольшим исключением которым является околоногтевая форма базосквамозного рака кожи, при которой были выявлены кожные и слизистые типы вирусов, причём особенно ВПЧ-16 [42,89]. Роль вируса 16 типа в морфопатогенезе околоногтевой формы базосквамозного рака, доказано наличием транскриптов белка Е6 кодируемого

геном вируса высокого онкогенного риска 16 типа [43,89]. Наиболее подробная модель вирусного канцерогенеза была продемонстрирована на примере верруциформной эпидермодисплазии (ВЭ), которая отличается высокими рисками не только развития множественных неоплазий кожи, но и высоким риском злокачественной трансформации [88,90-94].

По данным исследований, проведенных у пациентов с ВЭ, описаны случаи обнаружения вирусов преимущественно рода бета, однако отмечались и случаи коинфицирования 3 и 10 типами вирусов из семейства альфа-2, что клинически проявлялось в виде плоских бородавок [72-75]. Вирусоспецифический иммунодефицит так же объясняется с позиций цинкового гомеостаза, возникающий за счет гомозиготной мутации генов *-ever-1,-2*, ответственных за продукцию цинка [50]. Рассматривается вариант спонтанного канцерогенеза при ВЭ прежде всего с позиции генов предшественников, продуцируемых вирусами 8 типа, коими являются прежде всего белки онкогенеза E-6 и E-7 [77]: что подтверждается исследованием *in vitro*, где гиперэкспрессия белка онкогена E-7 в кератиноцитах стимулирует гиперпролиферацию и прорыв базальной мембраны, способствующий в свою очередь очередному этапу канцерогенеза - инвазии в дерму [77].

Прогресс в определении структур днк вирусов позволил расширить нозологии исследований, так высокочувствительная молекулярная диагностика способствовала детекции вирусов даже у пациентов с некоторыми НЭНК на фоне иммуносупрессивных состояний, на примере пациентов после операции трансплантации почек. Кроме того, проводились аналогичные исследования на фоне ВПЧ-инфекции, которые, впрочем, приводили к противоречивым результатам. В частности, не во всех опухолях подвергнутых исследованию, были обнаружены вирусы, кроме того, данные о распространенности ВПЧ трактовались в широком диапазоне, что, на наш взгляд, объясняется выбором метода детекции [83,85,88]. Однако, несмотря на малочисленность исследований и отрицательные данные некоторых из них, большинство авторов указывают на обнаруженные

факты инфицирования опухолей у разных групп пациентов в достаточном проценте случаев [89-97,106]. Противоречивость данных ряда исследований может быть рассмотрена с позиции использования в диагностике ДНК ВПЧ в НЭНК консенсусных праймеров, которые не отличались высокой селективностью по отношению к детекции различных типов вирусов, обладали низкой избирательной способностью к связыванию с ДНК-матрицей, так, при проведении постановки выявлялись и кожные, и слизистые типы вируса папилломы человека. Так, при проведении тестирования праймерных систем, использованных на одной серии клинических образцов больных с базалиомой: при использовании универсальных праймеров вирусные копии были детектированы в 50% случаев, при этом группоспецифические определяли их уже в 69% случаев. Таким образом, конкордантность результатов по спектру выявляемых генотипов составила 25% [107].

Возвращаясь к вопросу гипотез влияния вирусов папилломы человека кожного типа, в которой они рассматриваются как кофактор инициации и промоции эпителиального канцерогенеза в клетках уже поврежденных опухоль-иницирующим эпигенетическим фактором, которым является фотостарение, хочется отметить, что папилломавирусы кожного типа рода бета, инфицируя преимущественно многослойный плоский эпителий кожи, что совпадает со спектром клинических мишеней ультрафиолетового излучения, которыми являются морфологические структуры эпидермиса кожи [109,110,111,112]. Таким образом, процесс интегративной вирусной виrogenии, заключающийся в процессе включения вирусного генома в состав клеточных хромосом эпителиоцитов, к которому стремятся вирусы, в конечном счете и определяет их генеральную онкогенную стратегию повышения агрессивности опухолевого роста, особенно ярко проявляясь на фоне прогрессирующего фотостарения.

Существует пробел в нашем понимании роли вирусов папилломы и рисками развития НЭНК, на фоне эпигенетического фактора влияния ультрафиолетового излучения, как результата прогрессирующего фотостарения [113-120]. Сложности

обнаружения ВПЧ в поврежденных структурах кожи с неоплазиями может быть обусловлена ограничениями применяемых методов молекулярной диагностики [116]. Тем не менее, по мнению zur Hausen, ВПЧ может выступать кофактором в развитии некоторых злокачественных опухолей, вмешиваясь в контроль клеточного цикла как заместитель для соматических мутаций (Рис.1) [1]. Таким образом, прогрессирующее фотостарение, является, на наш взгляд, важным кофактором развития НЭНК и может служить моделью для изучения роли вирусов и оценки степени рисков развития доброкачественных и злокачественных неоплазий. С учетом вышеизложенного, проведение исследований, изучающих патогенетически ассоциативную роль папилломавирусной инфекции с выраженным фотостарением IV степени по Глогау на основе качественного и количественного определения ДНК ВПЧ, является актуальной задачей дерматологии, решение которой будет способствовать дальнейшему пониманию патогенетических аспектов канцерогенеза.

С учетом вышеизложенного, в настоящее время не вызывает сомнений необходимость проведения количественного анализа числа копий вирусных геномов в коже с выраженным фотостарением и НЭНК, что позволит более объективно судить о характере присутствия вирусной персистирующей инфекции в опухолях кожи различной степени агрессивности, а, следовательно, более тонко разбираться в эпигенетических механизмах канцерогенеза, связывающие влияние кумулятивных эффектов ультрафиолетового излучения с вирусом папилломы человека. Таким образом, проведение исследований, изучающих ассоциацию вирусов с доброкачественными, предраковыми и злокачественными опухолями на основе количественного определения ДНК ВПЧ, является актуальной задачей дерматологии, решение которой будет способствовать дальнейшему пониманию взаимосвязей развития эпителиальных опухолей различной степени злокачественности с ВПЧ.

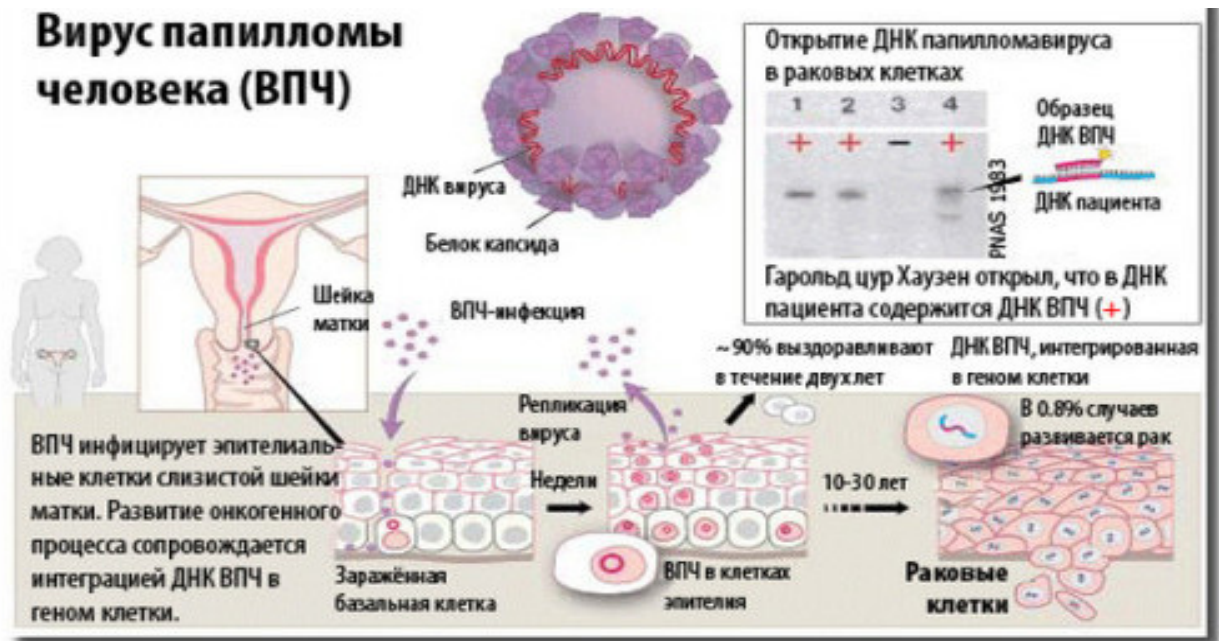


Рисунок 1 - Интеграция DNA HPV (ДНК ВПЧ) в геном клетки, адаптировано по zur Hausen H., [1].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Общая схема 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-anamnestическое обследование (сбор жалоб, анамнеза жизни и заболевания, оценка клинических проявлений и определение их степени тяжести). Разработан опросник для пациентов, где из данных анамнеза важными являлись:
 - ✓ возраст и пол пациентов, фототип кожи, длительность существования и количество высыпаний ассоциированных с кожными типами ВПЧ, наличие

признаков фотостарения, наличие эпителиальных неоплазий на открытых участках кожного покрова (пациенты заполняли разработанный нами опросник) (Табл. 1).

Таблица 1 - Разработанный опросник для пациентов для определения наличия факторов риска развития фотоиндуцированной патологии кожи в течение жизни

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 течение 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 [14];
- клиническую оценку стадий фотостарения (дерматогелиоза) (по Глогау Р.);
- клиническую оценку степени выраженности дерматогелиоза с использованием адаптированной шкалы SCINEXA.

Методику определения фототипов кожи проводили в соответствии со шкалой Фицпатрика [12]. По степени чувствительности человека к УФ-лучам различают 6 конституциональных фототипов кожи.

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

Хронологическое старение кожи оценивалось с помощью шкалы SCINEXA, включающей пять критериев оценки и семнадцать пунктов изменений кожи из-за накопления УФ излучения у 1 и 2 группы пациентов (Табл. 2).

Таблица 2 - Критерии фотостарения по шкале SCINEXA

Биологическое старение кожи			
№	Признак	Место	Оценка
1.	Гипо- и гиперпигментация	Зоны без воздействия солнца	От 0 до 3
2.	Статические заломы	Зоны без воздействия солнца	0-1-2-3
3.	Птоз	Зоны без воздействия солнца	0-1-2-3
4.	Гиполипидемия	Зоны без воздействия солнца	0-1-2-3
5.	Опухоли кожи	Зоны без воздействия солнца	0-1-2-3
Фотостарение кожи			
1.	Дисхромия	Верхняя часть туловища	0-1-2-3
2.	Лентигиозные высыпания	Верхняя часть туловища	0-1-2-3
3.	Отсутствие пигмента	Повсеместно	0-1-2-3
4.	Сероватый цвет кожи	Повсеместно	0-1-2-3
5.	Атрофия	Повсеместно	0-1-2-3
6.	Глубокие морщины	Кожа лица, шеи	0-1-2-3
7.	Солнечный эластоз	Кожа лица, шеи	0-1-2-3
8.	Шея моряка Ядассона	Задняя часть шеи	0-3
9.	Старческая дистрофия кожи	Лицо	0-3
10.	Сухость кожи	Лицо, задняя поверхность предплечий	0-1-2-3
11.	Черные точки	Вокруг глаз	0-1-2-3

12.	Извитые сосуды	Щеки, нос	0-1-2-3
13.	Солнечная пурпура Бейтмена	Щеки, нос	0-1-2-3
14.	Актинические комедональные бляшки	Открытые участки кожи лицо	0-3
15.	Базалиома	Открытые участки кожи лицо	0-3
16.	Базосквамозная карцинома	Открытые участки кожи лицо	0-3
17.	Меланома	Открытые участки кожи лицо	0-3

- Дерматоскопическое исследование для верификации доброкачественных и злокачественных неоплазий.
- Цитологическое исследование кожи и слизистых при наличии эпителиальных неоплазий.

2.2. Молекулярно-генетическая детекция DNA HPV методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме «Real Time»

Молекулярно-генетическая детекция DNA HPV методом ПЦР в режиме «Real Time» проводилась на базе ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (Москва). Микробиоптаты ткани были получены от 80 пациентов и 40 здоровых доноров с поверхности очагов эпителиальной дисплазии (базальноклеточных папиллом, аденом, фиброэпителиом, бородавок, кератоакантом, актинических кератом, базальноклеточных карцином кожи) и из участков видимо здоровой кожи, закрытых от воздействия ультрафиолетового излучения.

Положительный контроль амплификации представлял собой фрагмент специфичной DNA (контрольные плазмиды HPV в концентрации 10^4 копий DNA HPV HPV/мл). Процедуру термоциклирования проводили на амплификаторе

Mx3000P (Stratagene, США) с адаптированным компьютером по программе: предварительный этап при температуре 95° С -15 минут, затем при 95° С– 15 секунд, при 60° С – 30 секунд, при 65° С - 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 (6 log – 1 log) положительных плазмидных контролей 5, 8, 15, 37, 38, 20, 24, 49 типов HPV и DNA (ДНК) 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 ДНК ВПЧ/ 10^5 клеток человека нами было введено ограничение на минимальное количество клеток человека в образце, которое составило 5,9 log ($8,0 \times 10^5$) копий DNA человека/мл. В соответствии с полученными данными, все образцы, содержащие менее чем 5,9 log DNA человека/мл, считались невалидными.

2.3. Расчет нормализованной вирусной нагрузки

Метод ПЦР в режиме реального времени, («Real Time») взятый нами за основу методики количественного выявления HPV рода beta, позволял определять абсолютное количество DNA HPV и геномов человека в пробе. С учетом того, что при идентичном способе забора материала из очагов НЭНК, количество клеток (а соответственно и копий вируса), попадающих в образец, существенно варьировало, нами была использована методика нормирования количества вируса на определенное количество клеток человека. Подобный стандартизованный подход

позволял получать надежные и достоверные данные о вирусной нагрузке при различных патологиях кожи. Формула расчета: Вирусная Нагрузка = логарифм ((Кол-во DNA вируса папилломы / Кол-во DNA человека.) * 10⁵).

2.4. Молекулярно-биологическое исследование

Материалом для молекулярно-биологического исследования служили микробиоптаты кожи размером 0,2 x 0,2 см, полученные с помощью малоинвазивной модификации взятия биопсии бритвенным способом, или суспензия клеток, полученная методом соскоба, который использовался для взятия материала из зон новообразований. Исследуемый материал помещался в отдельные пробирки, содержащие 1 мл транспортной среды (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва). Для сохранения количества клеточной и вирусной DNA пробирки замораживались после взятия материала и хранились до проведения ПЦР-анализа при температуре -70С.

Пробоподготовка исследуемого материала осуществлялась методом обработки ткани протеиназой К, с последующим выделением DNA методом аффинной сорбции с использованием набора для выделения «ДНК-сорб-С» согласно инструкции 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 HPV 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, 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). Последовательности всех олигонуклеотидов для 25 типов HPV beta рода были выбраны при анализе известных последовательностей DNA HPV, (*Интернет ресурс "NCBI GeneBank" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)*) и обработаны при помощи программы AlignX пакета Vector NTI 6 (*InforMax Inc., 2000*). Выявление DNA HPV в подготовленных образцах было сделано в четырех пробирках, где каждая содержала одну из групп олигонуклеотидов для выявления HPV, а также олигонуклеотиды для выявления β -глобинового гена человека. В состав реакционных смесей для ПЦР входили 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-ДНК-полимераза (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 TE-буфер. Положительный контроль амплификации - представлял собой фрагмент специфичной DNA (контрольные плазмиды HPV в концентрации 10⁴ копий DNA HPV/мл). Процедуру термоциклирование проводили по протоколу на амплификаторе Mx3000P (*Stratagene, США*), соединенным с персональным компьютером по следующей программе: предварительный этап 95 °С – 15 мин., затем при 95°С – 15 с, при 60 °С – 30с, при 65 °С – 1 мин. – 50 циклов. Детекция продуктов амплификации осуществлялась путем измерения флуоресцентного сигнала, нарастающего по мере накопления специфического продукта реакции. При наличии положительной реакции кривая флуоресценции имела определенный S-образный вид. Далее проводилась качественная оценка результатов реакции. Для количественного анализа использовались десятикратные разведения (*blog–llog*) 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*).

2.5 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.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Клиническая характеристика больных, включенных в исследование

В исследование было включено 80 пациентов, находившихся на лечении и амбулаторно-консультативном приеме в клинике кожных и венерических болезней им. В.А. Рахманова УКБ №2 Первый МГМУ им.И.М.Сеченова и 40 здоровых добровольцев. Гендерный состав исследуемых пациентов включенных в исследование (n=80), был представлен 46,25% мужчин (37чел.) и 53,75% женщин (43чел) (Рис.2).

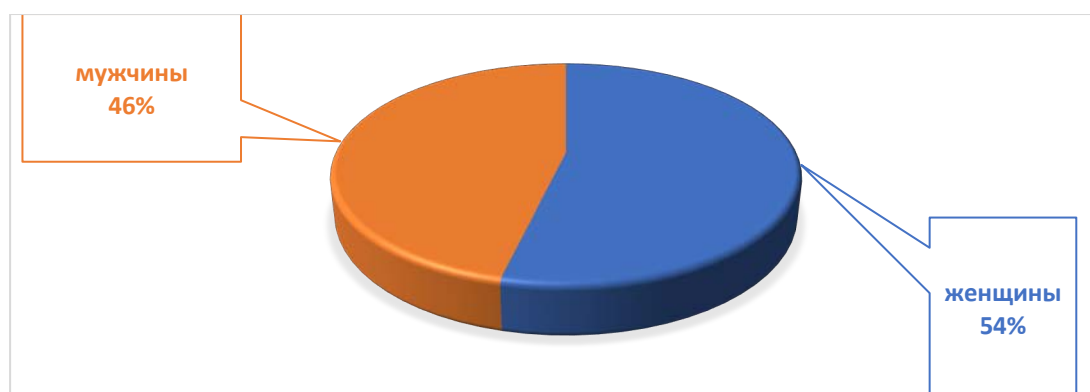


Рисунок 2 - Гендерный состав пациентов, вошедших в исследование (n=80)

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

В 1 группу (*иммуносупрессивная*) вошли 42 пациента с наличием выраженных клинических признаков дерматогелиоза IV степени по Глогау, которых 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 38 пациентов без признаков фотостарения из них 16 мужчин и 22 женщины в возрасте $51,0 \pm 5,6$ лет. Пациенты

этой группы применяли фотопротекторы в течении жизни и не злоупотребляли солнечной инсоляцией.

Группа контроля 40 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.

3.2. Анализ структуры фототипов пациентов

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 (Рис.3).

Полученные нами данные соответствуют литературным источникам, в которых указывается, что процессу фотостарения кожи с высоким риском развития новообразований наиболее подвержены люди именно с I, II – мелано-дефицитным и III – мелано-компетентным типом конституциональной чувствительности.

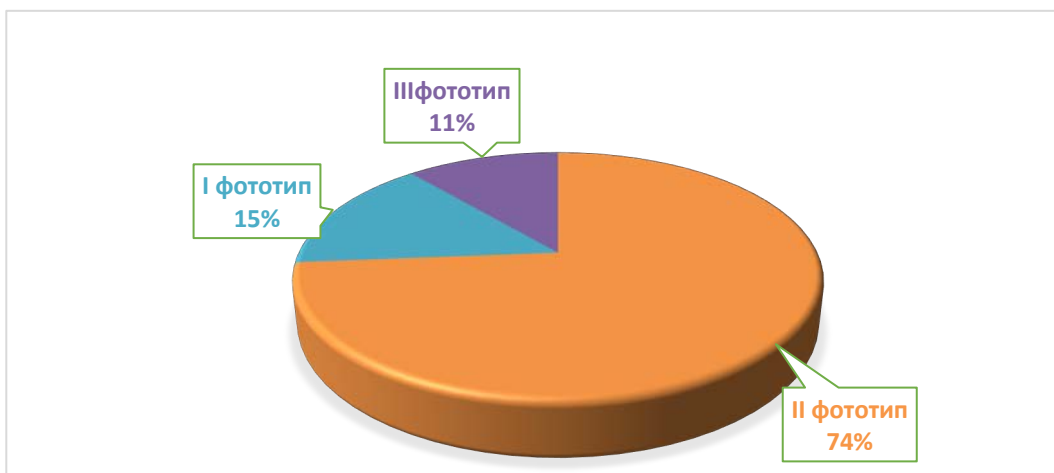


Рисунок 3 - Анализ структуры основных фототипов пациентов ($n=80$)

3.3. Клиническая оценка степени выраженности фотостарения

Клиническая оценка степени выраженности фотостарения оценивалась нами в баллах и проводилась у пациентов в анализируемых группах пациентов и лиц контрольной группы в соответствии с модифицированной шкалой SCINEXA. (Табл.3) (Рис.4)

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



Рисунок 4 - Степень выраженности фотостарения (дерматогелиоза) в баллах в группах 1, 2, контрольной группе, с использованием модифицированной шкалы SCINEXA

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

3.4. Клинико-морфологический анализ спектра эпителиальных неоплазий

При клинико-морфологическом мониторинге всего спектра основных клинических проявлений эпителиальных неоплазий, выявленных у всех исследуемых пациентов, (n=80) нами были диагностированы эпителиальные неоплазии кожи разной степени агрессивности. Так, в целом, 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 базальноклеточных папиллом (ПП); вульгарных бородавок 15 очагов (ВБ). (Рис.5)

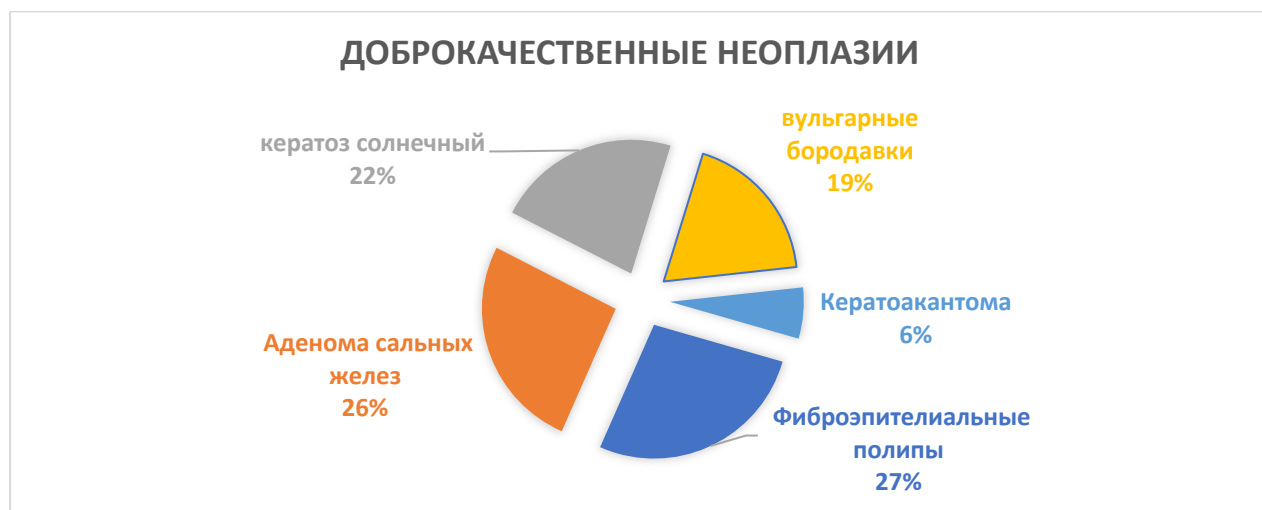


Рисунок 5 - Спектр доброкачественных неоплазий у исследуемых пациентов

Предраковые неоплазии были представлены: 15 очагами актинического кератоза (Ак); 3 очагами болезни Бовэна (ББ). (Рис.6)



Рисунок 6 - Спектр предраковых неоплазий у исследуемых пациентов

Злокачественные неоплазии были представлены: 30 очагами базальноклеточных карцином (БК); 10 очагами атипичной кератоакантомы (АК). (Рис.7) (Табл.4).



Рисунок 7 - Спектр злокачественных неоплазий у исследуемых пациентов

Однако следует отметить, что характер, степень агрессивности и количество НЭНК значительно варьировали в 1 и 2 группах пациентов. При клинко-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 признаках фотостарения (соответствующих 4 степени по Глогау) (Рис.8). В 17 случаях нами выявлено сочетание множественных базальноклеточных папиллом, лентиго, фиброэпителиальных полипов, кератоза солнечного и актинического с базальноклеточной карциномой, Рис.9,10) в 13 случаях – сочетание множественных базальноклеточных папиллом, аденом сальных желез, лентиго, солнечного эластоза, фиброэпителиальных полипов с гипертрофической формой актинического кератоза (предраковый дерматоз) (Рис. 11, 12), в 3 случаях - сочетание множественных базальноклеточных папиллом, аденом сальных желез, с болезнью Бовена. 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 (Рис.13,14).

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 (рис.15). Из них в 15 случаях выявлено сочетание базальноклеточных папиллом, кератоза и фиброэпителиальных полипов (рис.16-17); 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 слюнных желез, в 3 случаях очаги базальноклеточных папиллом (рис.18-21), 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 слюнных 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

Клинические примеры



Рисунок 8 - Пациентка И. 73 г, 1 группа

Диагноз: Дерматогелиоз IV степени. I фототип, множественные кератомы, солнечный эластоз, множественное лентиго, гипертрофическая форма актинического кератоза левого виска



Рисунок 9 - Пациент Р. 49 лет, 1 группа

Диагноз: Дерматогелиоз IV степени, II фототип, множественные базальноклеточные карциномы, базальноклеточные папилломы, фиброэпителиальные полипы, актинический кератоз



Рисунок 10 - Пациент Г. 72 г, 1 группа

Диагноз: Дерматогелиоз IV степени, II фототип, солнечный эластоз
множественные кератомы, папилломы, фиброэпителиальные полипы,
актинический кератоз, нодулярно-язвенная базальноклеточная карцинома
периорбитальной зоны



Рисунок 11 - Пациентка М, 68 лет, 1 группа

Диагноз: Дерматогелиоз IV степени, II фототип, солнечный эластоз, множественные папилломы, фиброэпителиальные полипы, себорейные кератомы, актинический кератоз, базальноклеточная карцинома левой носощечной области



а

б

Рисунок 12 (а,б) - Пациент 69 лет, 1 группа

Диагноз: Дерматогелиоз IV степени, II фототип, множественные папилломы, фиброэпителиальные полипы, актинический кератоз, базальноклеточная карцинома правого ската носа



Рисунок 13 - Пациент М, 78 лет, 1 группа

Диагноз: Дерматогелиоз IV степени, II фототип, множественные папилломы, фиброэпителиальные полипы, себорейные кератомы, актинический кератоз, атипичная кератоакантома левой щечной области



а

б

Рисунок 14 (а,б) - Пациентка С. , 60 лет, 1 группа

Диагноз: Дерматогелиоз IV степени, II фототип, множественные базальноклеточные папилломы, фиброэпителиальные полипы



Рисунок 15 - Пациент Ж. 59 лет, 1 группа

Диагноз: Дерматогелиоз IV степени, II фототип, множественные базальноклеточные карциномы, базальноклеточные папилломы, фиброэпителиальные полипы, актинический кератоз, лентиго

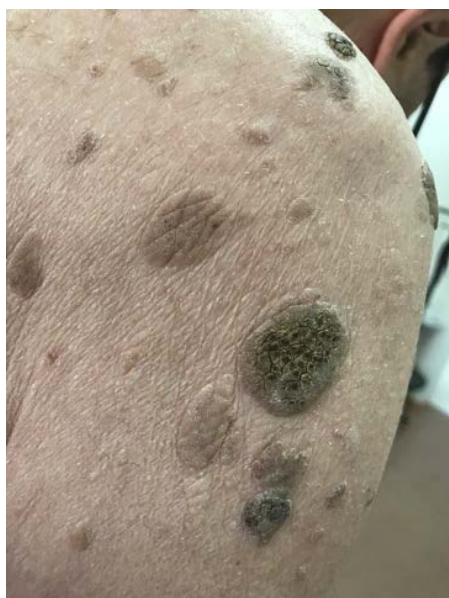


Рисунок 16 - Пациент С. 64 г, 2 группа

Диагноз: дерматогелиоз I степени, II фототип, множественные себорейные кератомы верхних конечностей



а

б

Рисунок 17 (а,б) - Пациентка К, 38 лет. 2 группа

Диагноз: дерматогелиоз I степени, III фототип, множественные себорейные кератомы, фиброэпителиальные полипы кожи живота



Рисунок 18 - Пациент Т, 40 лет. 2 группа

Диагноз : дерматогелиоз I степени, III фототип, лентиго фиброэпителиальные полипы периорбитальной зоны



Рисунок 19 - Пациентка Т, 48 лет. 2 группа

Диагноз : дерматогелиоз I степени , III фототип, множественные лентиго
фиброэпителиальные полипы, базальноклеточные папилломы периорбитальной
зоны



Рисунок 20 - Пациентка С, 58 лет. 2 группа

Диагноз : дерматогелиоз I степени , III фототип, множественные лентиго
фиброэпителиальные полипы, базальноклеточные папилломы кожи лба и
периорбитальной зоны

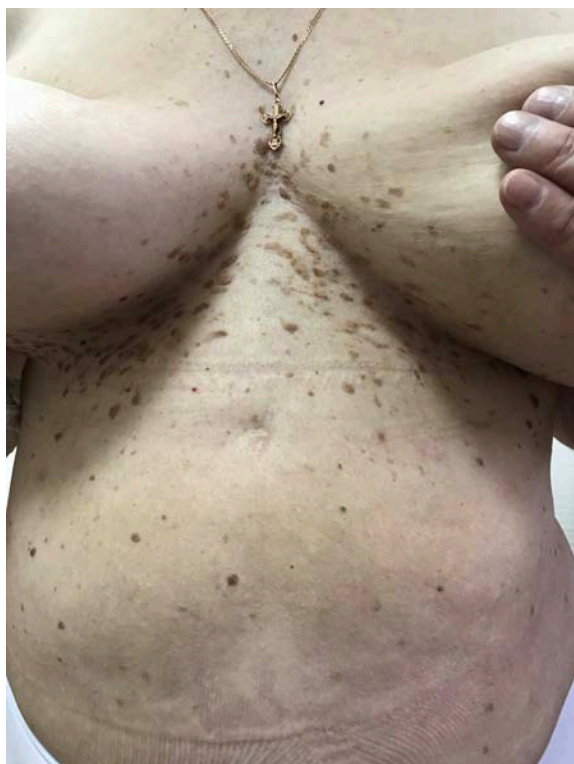


Рисунок 21 - Пациентка Г, 56 лет. 2 группа

Диагноз: дерматогелиоз I степени, II фототип, множественные лентиго фиброэпителиальные полипы, базальноклеточные папилломы, себорейные кератомы кожи туловища

3.5. Молекулярно-генетическая детекция вирусов папилломы человека в образцах кожи пациентов

При анализе результатов молекулярно-генетической детекции DNA HPV рода *beta*, которая была проведена в 199 образцах ткани взятых у пациентов из очагов эпителиальных неоплазий разной степени агрессивности, развившихся на фоне дерматогелиоза и участков здоровой кожи доноров, мы выявили признаки интегративной вирогении папилломавирусной инфекцией кожного типа рода *beta* во всех исследуемых образцах опухолей в довольно высоком проценте случаев 70,85%. Так, последовательности DNA HPV рода *beta* выявлялись в 53,8% случаев очагов себорейного кератоза, 20% - типичной кератоакантомы, 94,4% - актинического кератоза, 66,6% - при болезни Бовена, 83,3% - при базальноклеточной карциноме, 80% при атипичной кератоакантоме с признаками

атипии. Наряду с этим, HPV beta рода обнаруживался в микробиоптатах нормальной кожи здоровых доноров, но уже в незначительных количествах 32,5% (табл.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 НЭНК, так и нормальной коже выявлялся весьма

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

3.6. Анализ сравнительной частоты детекции генотипов HPV рода beta в исследуемых образцах НЭНК

При анализе сравнительной частоты детекции генотипов HPV рода beta в исследуемых образцах 1 группы иммуносупрессивных пациентов с 4 степенью фотостарения, папилломавирусы генотипов - $\beta 1$ и $\beta 2$ встречались в 1,5-2 раза чаще, чем представители других $\beta 3$, $\beta 4$ - $\beta 5$ видов (табл.6).

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

*в том числе в ассоциации с другими видами

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)

При этом частота детекции генотипов HPV рода beta в исследуемых образцах иммунокомпетентных пациентов 2 группы с 1 степенью фотостарения HPV генотипы - $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 5$ - встречались приблизительно с одинаковой частотой (табл.7).

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 вирогенеза 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 ($p < 0,01$) (табл.8).

Таблица 8 - Встречаемость 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

3.7. 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 уровень К**
- ✓ **средний уровень К**
- ✓ **высокий уровень К**

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

$$\text{ВН} / \text{ВНн} = \text{К}$$

ВН – показатель вирусной нагрузки

ВНн = 1.42±0,6 - показатель вирусной нагрузки в здоровой коже

Таким образом, учитывая введённые 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

$$\text{К1} = \text{ВН} / \text{ВНн} \leq 1.68$$

Средний уровень рисков развития злокачественных немеланоцитарных эпителиальных новообразований соответствует индексу К2, при котором показатель вирусной нагрузки составляет 1.7-1.9

$$\text{К2} = \text{ВН} / \text{ВНн} \leq 1.7-1.9$$

Высокий уровень рисков развития злокачественных немеланоцитарных эпителиальных новообразований соответствует индексу К3, при котором показатель вирусной нагрузки равен или превышает показатель 2.0

$$\text{К3} = \text{ВН} / \text{ВНн} \geq 2.0$$

Таким образом, при наличии индекса К3 (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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вирус папилломы человека является одним из самых распространенных в мире, сегодня охарактеризовано около 200 генотипов вирусов папиллом, инфицирующих человека, млекопитающих и птиц; из них к родам, инфицирующих человека, относятся alpha-, beta-, gamma-, mu- и nu [zur Hausen, H. 2002 Mallitt K.A., et al. 2010.; Баграмова Г.Э 2014]. Эпидемиологические и молекулярно-биологических данные позволяют предполагать, что ВПЧ рода beta способны вызывать развитие ряда эпителиальных опухолей кожи, однако данная взаимосвязь в настоящее время до конца не изучена. По данным мировой литературы известно, что около 20% всех неопластических процессов у человека развиваются в результате воздействия целого ряда, так называемых, онкогенных вирусов, в качестве которых рассматриваются, в том числе, папилломавирусы человека (ВПЧ, HPV) [zur Hausen, H. 2009.; Scheurer, M.E. 2015; Bosch, F.X. 2016; Снарская, Е.С.2020]. 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 [Choi, W. , Miyamura, Y., 2010]. Папилломавирусы кожного типа рода бета инфицируют клетки эпителия кожи, что и определяет спектр клинических мишеней, которыми являются морфологические структуры эпидермиса кожи [Scheurer, M.E. 2005]. Онкогенная стратегия канцерогенных папилломавирусов усиливается рядом механизмов, которые повышают агрессивность опухолевого роста. Важной особенностью этих механизмов является, так называемая, интегративная виrogenия, т.е. включение вирусного генома в состав клеточных

хромосом [Majewski, S. , S. Jablonska. 1997;Weissenborn S. J., Nindl I.,2005]. Процессы интеграции, которые иногда встречаются при доброкачественных опухолях, наиболее важны и присущи большинству инвазивных карцином и предраковых неоплазий, существенно влияя и определяя взаимоотношения вируса с ДНК клетки. Интеграция способствует общей дестабилизации клеточного генома, предрасполагая к серии необратимых мутаций. Накопление массы мутировавших клеток ведет к селекции инвазивных клонов клеток. Наиболее ярко это продемонстрировано на примере цитогенетической динамики HPV-индуцированной малигнизации при генитальных опухолях [Bosch, F.X. 2006]. Согласно одной из гипотез, вирусы папилломы человека кожного типа рассматриваются как кофактор промоции опухолевого роста клеток, которые уже повреждены другими опухоль-иницирующими эпигенетическими факторами и, прежде всего, длительным воздействием ультрафиолетового излучения [Weissenborn S. J., 2005; Choi, W. 2010; Bilaç, C.2014 ;Beissert, S. 2008; Snijders P., Chris J. 2006]. Процесс может длиться годами, незаметно приводя к развитию злокачественных эпителиальных опухолей преимущественно на открытых участках кожного покрова [Вульф К., Джонсон Р.,2007]. Малигнизация возникает в результате поэтапных, многолетних изменений структур эпидермиса, которые варьируют от незначительных доброкачественных, а затем, до выраженных злокачественных дисплазий. По данным многочисленных исследований, главную роль в развитии немеланоцитарных эпителиальных опухолей кожи (НЭНК) принадлежит УФ облучению В-спектра с длиной волны 280-320нм, что приводит к появлению клеточных и геномных мутаций, контролирующих клеточных цикл, репарацию ДНК и апоптоз, вследствие чего инициируется процесс фотоканцерогенеза [A. Vierkotter, U. Ranft, U. Kramer, D. Sugiri, V. Reimann, J. Krutmann 2009]. При избыточной инсоляции зафиксировано образование мутантных форм онкобелка p53, повышение образования антиапоптотического белка bcl-2, подавление экспрессии Fas-рецепторов. В дополнение к прямому влиянию на клеточный цикл, кумулятивное УФ излучение вызывает, как локальную, так и системную иммуносупрессию, блокируя противоопухолевый

контроль, который в противном случае распознал бы высокоантигенную кожную опухоль. На ко-канцерогенез также указывает на злокачественное перерождение элементов на открытых участках кожи, подверженных неконтролируемому воздействию солнца, при которых показано, что УФ-В служит промотором экспрессии ВПЧ-5 и -8 и таким образом индуцирует и ускоряет опухолевый рост. Ряд популяционных исследований, молекулярные и патоморфологические данные подтверждают, что ВПЧ рода beta могут играть этиологическую роль в развитии эпителиальных опухолей, а солнечная иммуносупрессия является важным кофактором развития эпителиальных образований кожи. Определение вирусной нагрузки является новым подходом в диагностике ВПЧ-инфекции, показавшим свою высокую значимость в мониторинге течения и прогрессирования генитальной папилломавирусной инфекции [Кувейда Д.А 2007; Баграмова Г.Э 2014; Корнева Л.В 2015; Olishova O.Yu 2021].

Таким образом, в настоящее время не вызывает сомнений необходимость проведения количественного анализа вирусных геномов в НЭНК, что позволит более объективно судить о характере присутствия ВПЧ в опухолях кожи, а следовательно, глубже понимать механизмы, связывающие НЭНК с ВПЧ. Целью нашего исследования стало изучение ассоциации спектра немеланоцитарных эпителиальных новообразований кожи различной степени злокачественности с вирусом папилломы человека у пациентов с дерматогелиозом на основе молекулярно-генетической детекции DNA HPV и разработка алгоритма оценки рисков развития злокачественного потенциала в эпителиальных неоплазиях. В соответствии с целью исследования были определены следующие **задачи**:

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 ранней диагностики злокачественных новообразований кожи.

Работа была выполнена на кафедре кожных и венерических болезней им. В.А.Рахманова института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского Сеченовского университета в период с 2018 по 2020 гг. В исследование было включено 80 пациентов, находившихся на лечении и амбулаторно-консультативном приеме в клинике кожных и венерических болезней 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. Всем пациентам проводилось клинικο-морфологическое обследование включающее: клинико-анамнестическое обследование (сбор жалоб, анамнеза жизни и заболевания, оценка клинических проявлений и определение их степени тяжести). Специально был разработан опросник для всех пациентов для возможности проведения оценки степени влияния солнечного излучения в течении жизни пациентов. Из данных анамнеза важными являлись: возраст и пол пациентов, фототип кожи, длительность существования и количество высыпаний ассоциированных с кожными типами ВПЧ, наличие признаков фотостарения, наличие эпителиальных неоплазий на открытых участках кожного покрова (пациенты заполняли разработанный нами опросник). Осмотр дерматовенеролога включал: 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 пациента 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. 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. Дерматоскопическое исследование для верификации доброкачественных и злокачественных неоплазий. Цитологическое исследование кожи и слизистых при наличии эпителиальных неоплазий. Генодиагностика ВПЧ-инфекции проводилась на базе ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора. Микробиоптаты ткани получены с помощью взятия биопсии бритвенным способом, или методом соскоба (для получения суспензии клеток) с поверхности очагов опухолей и из участков видимо здоровой кожи. Далее клеточный материал помещали в пробирки, содержащие 1 мл транспортной среды (*ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва*) и замораживали после взятия материала и хранили до проведения ПЦР-анализа при -70 C). Для выявления ДНК ВПЧ рода beta использовались четыре системы олигонуклеотидов (группоспецифических праймеров и зондов). Последовательности всех

олигонуклеотидов для 25 типов ВПЧ beta рода были выбраны при анализе известных последовательностей ВПЧ, 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). Положительный контроль амплификации - представлял собой фрагмент специфичной ДНК (контрольные плазмиды ВПЧ в концентрации 10⁴ копий ДНК ВПЧ/мл). Выявление продуктов амплификации осуществлялась путем измерения флуоресцентного сигнала, нарастающего по мере накопления специфического продукта реакции. Для *количественного* анализа использовались десятикратные разведения (6 log – 1 log) положительных плазмидных контролей 5, 8, 15, 37, 38, 20, 24, 49 типов ВПЧ и ДНК 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). Для достижения чувствительности не менее чем 100 копий ДНК ВПЧ/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 соответствии с полученными данными, все образцы, содержащие менее этого количества копий считались невалидными. Метод ПЦР в режиме реального позволяет определять абсолютное количество ДНК ВПЧ и геномов человека в пробе. Расчет нормализованной вирусной нагрузки(ВН) производился по формуле $VH^* = \text{Log} ((\text{Кол-во ДНК ВПЧ} / \text{Кол-во ДНК чел}) \times 10^5)$. Нами проводился как количественный, так и качественный анализ показателей вирусной нагрузки ДНК ВПЧ во всех позитивных эпителиальных опухолях неоплазиях. Статистическая 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. В результате проведенного исследования при клинико-морфологическом анализе фототипов пациентов (n=80) мы установили, что большая часть пациентов – 59 человек (73,75 %) имела II фототип кожи, 12 (15%) человек имели I фототип и 9 (11,25%) - III фототип кожи по Фицпатрику. При анализе данных, полученных в результате подсчета степени дерматогелиоза по шкале SINEXA, становится очевидно, что максимальное количество баллов степени фотостарения кожи $35,02 \pm 0,56$ выявлено у пациентов входящих в 1-ю группу, что соответствует 4 степени фотоповреждений по Глогау – «катастрофической» и значительно превышает таковой показатель степени фотостарения во 2-й группе пациентов $18,8 \pm 1,33$, что соответствует 1 степени дерматогелиоза по Глогау - умеренной и в 2 раза превышен по сравнению с группой контроля $15,7 \pm 1,15$. При анализе спектра основных клинических проявлений эпителиальных опухолей, нами были диагностированы эпителиальные неоплазии кожи разной степени агрессивности у всех пациентов. Однако показатели характера, степень агрессивности и количества НЭНК значительно отличались у пациентов в 1 и 2 группах. Так при клинико-морфологическом мониторинге спектра эпителиальных неоплазий пациентов **1 группы**, обращает на себя внимание преобладание множественного характера поражения в виде сочетаний доброкачественных и предраковых неоплазий со злокачественными НЭНК. Кроме того, преобладающее количество очагов эпителиальных неоплазий у пациентов этой группы располагаются на открытых участках кожного покрова: лице, шее, зоне декольте, верхней части спины и верхних конечностей. У 33 из 42 пациентов 1 группы, что составляет 78,5% выявлено нами наибольшее количество случаев сочетания множественных очагов доброкачественных со злокачественными НЭНК на фоне выраженных клинических признаках фотостарения (соответствующих 4 степени по Глогау). Так, 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 слюнных желез, с «болезнью Боуэна». 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**, нами выявлено, что в большинстве случаев выявленные очаги НЭНК носили солитарный характер и относились к спектру доброкачественных. Так, только в 18 случаях 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 слюнных желез, кератоза и вульгарных бородавок. В остальных 20 случаях очаги доброкачественных НЭНК были солитарными: в 15 случаях выявлены очаги аденомы слюнных желез, в 3 случаях очаги базальноклеточных папиллом, в 2 случаях очаги вульгарных бородавок. Молекулярно-генетическая качественная детекция ДНК ВПЧ рода *beta* проводилась в 199 образцах биоптатов ткани. Так, последовательности ДНК ВПЧ рода бета мы обнаружили в 53,8% случаев очагов себорейного кератоза, 20% - типичной кератоакантомы, 94,4% - актиническом кератозе, 66,6% - при «болезни Боуэна», 83,3% - при базальноклеточной карциноме, 80% - при атипичной кератоакантоме с признаками атипичности. Наряду с этим, вирусы рода бета обнаруживались и в микробиоптатах нормальной кожи здоровых доноров, но уже в незначительных количествах 32,5% и расценивался нами, как обычное носительство. Таким образом, при анализе полученных данных, мы выявили достоверные признаки интегративной вирогении папилломавирусной инфекции кожного типа рода бета во всех исследуемых образцах в довольно высоком проценте случаев. Кроме того, нами было установлено, что как в НЭНК, так и

нормальной коже выявлялся широкий спектр генотипов ВПЧ рода бета, такие как бета1, бета2, бета3, бета4 и бета5. Проанализировав частоту встречаемости различных генотипов вирусов рода бета в исследуемых образцах 1 группы пациентов с IV степенью фотостарения, мы установили преобладание почти в 2 раза папилломавирусов генотипов - $\beta 1$ и $\beta 2$, чем других представителей. При этом частота детекции генотипов ВПЧ рода бета в исследуемых образцах пациентов 2 группы с I степенью фотостарения ВПЧ генотипы - $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 5$ - встречались приблизительно с одинаковой частотой. При изучении вирус позитивных образцов кожи пациентов 1 группы с фотостарением 4 степени и клинической картиной доброкачественных, предраковых и злокачественных новообразований, нами выявлена интегративная вирогенез в виде ассоциации 2 и более видов вирусов рода бета, 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 ВПЧ рода бета, не выходящих за пределы цифр носительства ($p < 0,01$).

В результате проведенного количественного анализа присутствия вирусов, показано, что показатели вирусной нагрузки во всех вирус позитивных образцах опухолей у пациентов первой группы значительно выше таковых же показателей нормальной кожи $1,4 \pm 0,6$ лог, обращает на себя внимание динамика вирусной нагрузки в кератомах, $2,3 \pm 0,6$ лог, аденомах $3,7 \pm 0,9$ лог, актинического кератоза $4,05 \pm 0,2$ лог и карцином базальноклеточных $2,08 \pm 1,4$ лог, различия имели достоверный характер ($p < 0,05$). Полученные нами данные убедительно демонстрируют, что у пациентов с выраженной степенью фотостарения регистрируется рост показателей вирусной нагрузки в образцах неоплазий кожи, что подтверждает активацию вирусной инфекции и может свидетельствовать, на наш взгляд, подтверждением наиболее вероятной гипотезы влияния вирусов папилломы человека кожного типа, в которой они рассматриваются как кофактор промоции опухолевого роста клеток уже поврежденных опухоль-инициирующим эпигенетическим фактором - результатом кумулятивного эффекта ультрафиолетового излучения, то есть фотостарения. Возможно,

папилломавирусную инфекцию следует рассматривать с позиций ко-канцерогенеза с прогрессирующим дерматогелиозом, на что так же очевидно указывает приоритетная локация опухолевых элементов на открытых участках кожи, так и высокие риски их злокачественного перерождения.

Нами продемонстрировано, что выявленные у больных 1 группы с дерматогелиозом (показатель степени по шкале *SCINEXA* $35,02 \pm 0,56$) множественными эпителиальными неоплазиями (базальноклеточными папилломами, фиброэпителиомами, кератомами, карциномами кожи) высокие показатели детекции папилломавирусов в пролиферирующей ткани ($2,3 \pm 0,6$ логарифма на 100 тыс. клеток, аденомах сальных желез $3,7 \pm 0,9$ логарифма на 100 тыс. клеток, актиническом кератозе $4,05 \pm 0,2$ логарифма на 100 тыс. клеток) значительно превышают показатели вирусной нагрузки ДНК вируса в нормальной коже ($1,42 \pm 0,6 \log$) и коррелируют с другими клинико-анамнестическими признаками, в частности, 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.

На основании полученных данных нами была проанализирована зависимость вирусной нагрузки ДНК ВПЧ 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 ДНК ВПЧ в здоровой коже.

Таким образом, учитывая полученные статистически значимые данные, мы вывели *Индекс рисков развития злокачественных эпителиальных*

немеланоцитарных новообразований кожи **К** и ввели градации уровней риска.

Уровень риска:

- низкий
- средний
- высокий

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

$$\mathbf{ВН} / \mathbf{ВНn} = \mathbf{К}$$

ВН – показатель вирусной нагрузки

ВНn = 1.42±0,6 - показатель вирусной нагрузки в здоровой коже

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

Низкий уровень рисков развития злокачественных немеланоцитарных эпителиальных новообразований соответствует индексу **К1**, при котором показатель вирусной нагрузки составляет менее 1.68.

$$\mathbf{К1} = \mathbf{ВН} / \mathbf{ВНn} \leq 1.68$$

Средний уровень рисков развития злокачественных немеланоцитарных эпителиальных новообразований соответствует индексу **К2**, при котором показатель вирусной нагрузки составляет 1.7-1.9.

$$\mathbf{К2} = \mathbf{ВН} / \mathbf{ВНn} \leq 1.7-1.9$$

Высокий уровень рисков развития злокачественных немеланоцитарных эпителиальных новообразований соответствует индексу **К3**, при котором показатель вирусной нагрузки равен или превышает показатель 2.0.

$$\mathbf{К3} = \mathbf{ВН} / \mathbf{ВНn} \geq 2.0$$

На основании полученных в ходе исследования нами данных, можно утверждать, что присутствие вирусов в ДНК эпителиоцитов можно расценивать как

кофакторное их влияние на промоцию опухолевого роста клеток уже поврежденных опухоль-инициирующим эпигенетическим фактором - результатом кумулятивного эффекта ультрафиолетового излучения, то есть дерматогелиоза. Полученные нами данные свидетельствуют, что прогрессирование процесса фотоповреждения структур кожи в течение жизни пациентов на фоне носительства папилломавирусной инфекции провоцирует развитие предраковых и злокачественных эпителиальных опухолей кожи, которые приобретают множественный и более агрессивный характер течения. В результате изучения вирусной нагрузки DNA HPV *beta* у 80 пациентов и 40 здоровых доноров установлено, что во всех вирус позитивных образцах у больных с множественными эпителиальными неоплазиями на кожном покрове, отмечаются самые высокие показатели вирусной вирусности в пролиферирующей ткани, прежде всего в злокачественных и предзлокачественных неоплазиях, которые значительно превышают показатели вирусной нагрузки в нормальной коже и коррелируют с катастрофической стадией дерматогелиоза на фоне конституционально высокой степени фоточувствительности.

Анализ полученных данных позволил разработать алгоритм расчета 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. Так, при наличии индекса **К3** (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 **К2** (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 анализе спектра немеланоцитарных эпителиальных неоплазий у пациентов 1 группы в 78,5% случаев диагностировано наибольшее количество как доброкачественных, так и злокачественных НЭНК на фоне IV степени дерматогелиоза по Глогау. У пациентов 2 группы, с I степенью дерматогелиоза по Глогау, выявлено наличие единичных очагов только доброкачественного спектра неоплазий.
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 тканей. 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 во всех вирус позитивных образцах у больных I группы с множественными эпителиальными неоплазиями отмечаются самые высокие показатели вирусной вирогении в пролиферирующей ткани, (*в себорейных кератомах $2,3 \pm 0,6$ логарифма на 100 тыс. клеток, аденомах сальных желез $3,7 \pm 0,9$ логарифма на 100 тыс. клеток, актиническом кератозе $4,05 \pm 0,2$ логарифма на 100 тыс. клеток*), которые значительно превышают показатели вирусной нагрузки в нормальной коже ($1,42 \pm 0,6 \log$) и коррелируют с IV катастрофической стадией дерматогелиоза на фоне конституционально высокой степени 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 расчета 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 вирусности 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 СОКРАЩЕНИЙ

АК - актинический кератоз

АС - аденома сальных желез

ББ - болезнь Бовэна

БП - базальноклеточная папиллома

ВБ - вульгарная бородавка

ВН – показатель вирусной нагрузки

ВНn - показатель вирусной нагрузки в здоровой коже

К - индекс риска развития злокачественных эпителиальных
немеланоцитарных новообразований кожи

КА – типичная кератоакантома

КС - кератоз солнечный

НЭОК – немеланоцитарные эпителиальные опухоли кожи

ФП - фиброэпителиальный полип

DNA HPV - дезоксирибонуклеиновая кислота вируса папилломы человека
(ДНК ВПЧ)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баграмова, Г.Э Проллиферативная активность эпителиальных клеток, как прогностический маркер течения патологического процесса различных клинических вариантов папилломавирусной инфекции.// Баграмова Г.Э, Хлебникова А.Н., Молочков В.А., Халдин А.А.,и др.,Методические рекомендации МЗ №8/Департамент здравоохранения города Москва; 2014:9с.
2. Баграмова, Г.Э. Проллиферативная активность клеток вирусных новообразований кожи.//Селезнева Е.В, ХлебниковаА.Н., Баграмова Г.Э и др., Вестник последипломного медицинского образования,2012;2:17-19
3. Вульф К., Джонсон Р., Сюрмонд Д. Фотодерматозы и лучевой дерматит. Дерматология по Томасу Фицпатрику. Атлас-справочник. Пер. с англ. М.: Практика; 2007: 286–8;318-27
4. Каприн, А.Д. Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность) // под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой - М.: МНИОИ им. П.А. Герцена - филиал ФГБУ «ФМИЦ им. П.А. Герцена» Минздрава России, 2017. - 250 с.
5. Киселев,В.И.,АшрафянЛ.А.,Этиологическая роль вируса папилломы человека в развитии рака шейки матки :генетические и патогенетические механизмы, возможности терапии и профилактики. Гинекология ,2004;4:6:174-180.
6. Кладова,А. Ю., Встречаемость кожных типов вирусов папилломы человека в опухолях кожи. // Кладова ,А. Ю., Кувейда Д. А., Молочков В.А., Шипулина О.Ю., Киселев В.И., Хлебникова А. Н Альманах клинической медицины. Издательство: Московский областной научно-исследовательский институт им. М.Ф.Владимирского (Москва). 2006; 9:44--50.

7. Козлова, Е.С. Быков А.С., Кладова А.Ю., Куевда Д.А. Изучение некоторых вирусно-бактериальных ассоциаций при псориазе// Альманах клинической медицины.2007(15): 191-194.
8. Копнин, Б.П. Опухолевые супрессоры и мутаторные гены. Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва <http://www.rosoncweb.ru/library/pub/02/>
9. 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
10. Куевда, Д.А. Разработка методики количественного определения папилломавирусов рода Бета // Куевда, Д. А., Кладова А. Ю., Шипулина О. Ю., Молочков В. А VI научно-практическая конференция «Социально значимые заболевания в дерматовенерологии. Диагностика, терапия, профилактика». Москва- 2006. - Р. 97-98.
11. Курдина М.И. Рак и предраковые дерматозы. // Российский журнал кожных и венерических болезней. - 1999; (6) : 12-24с.
12. Малишевская, Н.П. Эпидемиологические и клинико-морфологические особенности базально-клеточного рака кожи нетипичной локализации. // Н.П. Малишевская , Е.Р. Стародубов , Е.Н. Малишевская / Российский журнал кожных и венерических болезней. 2000; (2) : 9–11с.
13. Молочков , В А . К проблеме лечения базалиом кожи. / В.А. Молочков, Е.С. Снарская , П.Ю. Поляков , А.В.Афонин , Т.Е. Сухова , Ю.С. Романко. Российский журнал кожных и венерических болезней. - 2005;(6): 4-9.
14. Молочков ,В. А. Базалиома: клиника, диагностика, лечение, профилактика. Consilium Medicum. Дерматология. (Прил.) 2013; 4: 40-44

15. Молочков, В.А., Снарская Е.С. К вопросу о метастазировании базально-клеточного и метатипического рака кожи. Российский журнал кожных и венерических болезней.2003;(1) : 7–9с.
- 16.Огрызко , Е.В. Эпидемиологическая ситуация по заболеваемости новообразованиями кожи в Российской Федерации в 2000–2006 гг. // Е.В. Огрызко , М.Е. Иванова , В.Н. Волгин / Российский журнал кожных и венерических болезней. - 2008; 6: 4–8.
17. Олисова, О.Ю., Фотостарение кожи: современный взгляд на проблему (лекция). //Олисова, О.Ю., Громова С.А., Смиренная В.А. Российский журнал кожных и венерических болезней. 2010; 2:58--62 .
- 18.Петрунин,Д.Д. Подходы к иммунокоррекции пациентов с рецидивирующим базально-клеточным раком кожи с различными иммунофенотипами.//Д.Д.Петрунин,С.В.Оковитый,А.В.Косталевская С.В. Сучков - Вопросы онкологии.- 2012; 58 (3) : 406-15.
- 19.Писклакова , Т. П. Особенности течения базально клеточного рака кожи на Южном Урале. // Т.П. Писклакова , Ю.Н. Ковалев , С.М. Истомина , В.Н. Шевченко / Российский журнал кожных и венерических болезней. -1998; 5: 9–10.
20. Пфистер Х., et al. Вирусы папилломы человека и неоплазии кожи, Дерматолог., русскоязычная версия журнала «Der Hautarzt» Shringер Medizin Verlag - 2007 -59:26-30 -Киев- 2012;3(01):p.225--229.
- 21.Сергеев , Ю.В.,. Современные подходы к диспансеризации и профилактике рака кожи. // Ю.В. Сергеев , С.В. Борисова , С.И. Шубина / Кремлевская медицина. - . 2000; 3: 38–40.
- 22.Сергеев , Ю.В.,. Современные подходы к диспансеризации и профилактике рака кожи. // Ю.В. Сергеев , С.В. Борисова , С.И. Шубина / Кремлевская медицина. - . 2000; 3: 38–40.

23. Сергеев, Ю.В. Актуальные проблемы практической дерматоонкологии: рост заболеваемости, совершенствование диспансеризации и профилактика базальноклеточного рака кожи. / Ю.В. Сергеев, С.В. Борисова, С.И. Шубина // Российский журнал кожных и венерических болезней. 1999; 1: 8–11.
24. Снарская, Е.С. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, как неинвазивный метод оценки степени агрессивности эпителиальных новообразований// Е.С. Снарская, С.Б. Ткаченко, Е.В. Кузнецова - Российский журнал кожных и венерических болезней--2016.; 18 (2)-С-132-38
25. Снарская Е.С. Фотостарение кожи: современные аспекты. Вестник дерматологии и венерологии. 2011;2:98--103
26. Снарская, Е.С. Современный менеджмент и терапевтическая стратегия базальноклеточного рака кожи» - Вопросы онкологии - 2013- 4 -23-25с.
27. Снарская, Е.С. Молочков В.А. Базалиома –М.- Практическая Медицина - 2018 – с. 130
28. Снарская, Е.С. Матриксные металлопротеиназы и их тканевые ингибиторы при базально-клеточном и метатипическом раке кожи / Е.С. Снарская, В.А. Молочков, Г.А. Франк, Л.Э. Завалишина // Архив патологии. - 2005. - 3. - С.14-18
29. Снарская, Е.С. Развитие множественных опухолей различного генеза в процессе фотостарения кожи / Е.С. Снарская, А.И. Борисова, К.А. Чонглян // Российский журнал кожных и венерических болезней. - 2011. – 4. – С. 13-18.
30. Снарская, Е.С. Экспериментальный метатипический рак кожи (первая отечественная модель) / Е.С. Снарская, В.А. Молочков, Л.Н. Пылев, Л.А. Васильева // Российский журнал кожных и венерических болезней. - 2004. – 6. –С. 66-70.

- 31.Суколин , Г.И. Роль генетических и средовых факторов в клиническом полиморфизме и эпидемиологии опухолей кожи.// Г.И. Суколин , Г.Г.Тимошин , Т.Б. Трофимова / Проллиферативные заболевания кожи.- М., 1991: 18–21.
- 32.Суколин , Г.И. Роль генетических и средовых факторов в клиническом полиморфизме и эпидемиологии опухолей кожи.// Г.И. Суколин , Г.Г.Тимошин , Т.Б. Трофимова / Проллиферативные заболевания кожи.- М., 1991: 18–21.
- 33.Сухова,Т.Е. Сравнительные исследования эффективности фотодинамической терапии и криодеструкции в лечении актинического кератоза. Т.Е. Сухова, К.А. Чанглян, А.В. Молочков, В.А. Молочков, С.В. Коренев, Ж.С. Кунцевич, Ю.В. Молочкова, В.Н. Галкин, Ю.С. Романко // Biomedical Photonics.2016. - 5(3). 19-29.
- 34.Хлебникова, А. Н. Новые подходы к лечению базальноклеточного рака кожи на основе интерферонотерапии и криодеструкции. Клиническая дерматология и венерология. 2007;(5): 49-54.
- 35.Хлебникова, А.Н. Морфологические особенности актинического кератоза / А.Н. Хлебникова, М. А. Бобров , Е.В. Селезнева , К.А. Чанглян // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2012. – 2. -С.10-15.
- 36.Хлебникова, А.Н., Кладова А.Ю., Кириченко Н.А., Сарханн В.С. К проблеме гигантских базалиом// Клиническая дерматология и венерология. 2007(1):9-12.
37. Akgul B., et al. The E7 protein of cutaneous human papillomavirus type 8 causes invasion of human keratinocytes into the dermis in organotypic cultures of skin. Cancer Res, 2005;65(6):2216—23.

38. Andersson K., et al. Seroreactivity to cutaneous human papillomaviruses among patients with nonmelanoma skin cancer or benign skin lesions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(1):189--95.
39. Asgari M. M., Kiviat N. B., Critchlow C. W., Stern J. E., Argenyi Z. B., Raugi G. J. et al. Detection of human papillomavirus DNA in cutaneous squamous cell carcinoma among immunocompetent individuals. *J Invest Dermatol.* 2008;128(6):1409--1417.
40. Astori G., Lavergne D., Benton C., Hockmayr B., Egawa K., Garbe C. et al. Human papillomaviruses are commonly found in normal skin of immunocompetent hosts. *J Invest Dermatol.* 1998;110(5):752--755.
41. Battie, C. New insights in photoaging, UVA induced damage and skin types / C.Battie, S.Jitsukawa, F.Bernerd, S.Del Bino, C.Marionnet, M.Verschoore // *Exp Dermatol.* – 2014. – 23(1). – P.7-12.
42. Bedard K.M., et al. The E6 oncoproteins from human beta papillomaviruses differentially activate telomerase through an E6AP-dependent mechanism and prolong the lifespan of primary keratinocytes. *J Virol*, 2008;82(8):3894--902.
43. Beissert S. and K. Loser, Molecular and cellular mechanisms of photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol.* 2008;84(1):29--34.
44. Beissert S., Loser K. Molecular and cellular mechanisms of photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol.* 2008;84(1):29--34.
45. Beissert S., Loser K., Molecular and Cellular Mechanisms of Photocarcinogenesis. *Photochemistry and Photobiology.* 2008; 84:29--34
46. Beissert, S. Molecular and Cellular Mechanisms of Photocarcinogenesis / S.Beissert, K.Loser // *Photochemistry and Photobiology* 2008. - 84(1). - P. 29--34.

47. Berkhout R.J., Bouwes Bavinck J.N., Schegget J. Persistence of human papillomavirus DNA in benign and (pre)malignant skin lesions from renal transplant recipients. *J Clin Microbiol.* 2000;38(6):2087--96.
48. Bertoli P., et al. Detection of human papillomavirus in lesions of a patient with dermatosis papulosa nigra. *Acta Dermatoven APA.* 2004;13:63--5.
49. Bilaç, C. Chronic actinic damage of facial skin / C. Bilaç, M.T. Şahin, S. Öztürkcan // *Clin Dermatol.* – 2014. - 32(6). – P. 752-762.
50. Bosch, F.X. Epidemiology of human papillomavirus infections and associations with cervical cancer: new opportunities for prevention / F.X. Bosch [et al.] // *Papillomavirus Research.* - 2006. -P. 19 - 39.
51. Bouvard V., et al. A review of human carcinogens--Part B: biological agents. *Lancet Oncol.* 2009;10(4):321--2.
52. Bouwes Bavinck J.N., et al. Keratotic skin lesions and other risk factors are associated with skin cancer in organ-transplant recipients: a case-control study in The Netherlands, United Kingdom, Germany, France, and Italy. *J Invest Dermatol.* 2007;127(7):1647--56.
53. Burgers W.A., et al. Viral oncoproteins target the DNA methyltransferases. *Oncogene.* 2007;26(11):1650--5.
54. Casabonne D., et al. A case-control study of cutaneous squamous cell carcinoma among Caucasian organ transplant recipients: the role of antibodies against human papillomavirus and other risk factors. *Int J Cancer.* 2009;125(8):1935--45.
55. Casabonne D., et al. A prospective pilot study of antibodies against human papillomaviruses and cutaneous squamous cell carcinoma nested in the Oxford component of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer.* 2007;121(8):1862--8.

56. Chang Y.E., Laimins L.A. Microarray analysis identifies interferon-inducible genes and Stat-1 as major transcriptional targets of human papillomavirus type 31 // *J. Virol.* — 2000; 74: 4174-4182).
57. Choi, W. Regulation of human skin pigmentation in situ by repetitive UV exposure: molecular characterization of responses to UVA and/or UVB. / W. Choi, Y. Miyamura, R. Wolber, C. Smuda, W. Reinhold, H. Liu, L. Kolbe, V. J. Hearing // *J Invest Dermatol.* – 2010. - Jun;130(6). – P. 1685-1696.
58. de Jong-Tieben L. M., Berkhout R.J., ter Schegget J., Vermeer B. J., de Fijter J. W., Bruijn J. A. et al. The prevalence of human papillomavirus DNA in benign keratotic skin lesions of renal transplant recipients with and without a history of skin cancer is equally high: a clinical study to assess risk factors for keratotic skin lesions and skin cancer . *Transplantation.* 2000; 69(1): 44--49.
59. de Villiers E. M., Lavergne D., McLaren K., Benton E. C. Prevailing papillomavirus types in non-melanoma carcinomas of the skin in renal allograft recipients. *Int J Cancer.* 1997; 73, (3):356--361.
60. de Villiers E. M., Lavergne D., McLaren K., Benton E. C. Prevailing papillomavirus types in non-melanoma carcinomas of the skin in renal allograft recipients. *Int J Cancer.* 1997;73(3): 356—361.
61. Durst M., et al. Inverse relationship between human papillomavirus (HPV) type 16 early gene expression and cell differentiation in nude mouse epithelial cysts and tumors induced by HPV-positive human cell lines. *J Virol.* 1991;65(2):796--804.
62. Euvrard, S., Kanitakis J., Claudy A. Skin cancers after organ transplantation. *N Engl J Med.* 2003;348(17):1681--91.
63. Feltkamp M.C., et al. Seroreactivity to epidermodysplasia verruciformis-related human papillomavirus types is associated with nonmelanoma skin cancer. *Cancer Res.* 2003;63(10): 2695—70

64. Forslund O., et al. Identification of human papillomavirus in keratoacanthomas. *J Cutan Pathol.* 2003;30(7):423--9.
65. Forslund O., et al. Identification of human papillomavirus in keratoacanthomas. *J Cutan Pathol.* 2003;30(7): 423--9.
66. Gassenmaier A., et al. Papillomavirus DNA in warts of immunosuppressed renal allograft recipients. *Arch Dermatol Res.* 1986;278(3):219--23.
67. Giampieri S., Storey A. Repair of UV-induced thymine dimers is compromised in cells expressing the E6 protein from human papillomaviruses types 5 and 18. *Br J Cancer.* 2004; 90(11):2203--9.
68. Giampieri S., Storey A. Repair of UV-induced thymine dimers is compromised in cells expressing the E6 protein from human papillomaviruses types 5 and 18. *Br J Cancer.* 2004;90(11):2203--9.
69. Gupta S., et al. Human papillomavirus and skin tags: is there any association? *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2008;74(3):222--5.
70. Gushi A., et al. Detection and sequences of human papillomavirus DNA in nongenital seborrhoeic keratosis of immunopotent individuals. *J Dermatol Sci.* 2003;31(2):143--9.
71. Harwood C.A., et al. Human papillomavirus infection and non-melanoma skin cancer in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *J Med Virol.* 2000;61(3):289--97.
72. Harwood C.A., et al. Human papillomavirus infection and non-melanoma skin cancer in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *J Med Virol.* 2000;61(3):289--97.
73. Herman ,J.G. Epigenetic changes in cancer and preneoplasia. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2005;70:329--33.

74. Herman, J.G. Epigenetic changes in cancer and preneoplasia. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2005;70:329--33.
75. Hopfl R.M., Schir M. M., Fritsch P. O. Keratoacanthomas: human papillomavirus associated. *Arch Dermatol*. 1992; 128(4):563--564.
76. IARC IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human Papillomaviruses. Lyon. 2007;90.
77. Iftner A., Klug S. J., Garbe C., Blum A., Stancu A., Wilczynski S. P. et al. The prevalence of human papillomavirus genotypes in nonmelanoma skin cancers of nonimmunosuppressed individuals identifies high-risk genital types as possible risk factors. *Cancer Res*. 2003;63(21):7515--7519.
78. Jackson S., et al. Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. *Genes Dev*. 2000;14(23):3065--73.
79. Jacyk W.K., Dreyer L., de Villiers E.M. Seborrheic keratoses of black patients with epidermodysplasia verruciformis contain human papillomavirus DNA. *Am J Dermatopathol*. 1993;15(1):1--6.
80. Karagas M.R., et al. Human papillomavirus infection and incidence of squamous cell and basal cell carcinomas of the skin. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98(6):389--95.
81. Kathryn J., Martires B.A., Pingfu Fu., Polster A.M., Kevin D. Cooper M.D., Elma D. Baron M.D. Factors That Affect Skin Aging. *Arch Dermatol*. 2009;145(12):1375--1379 .
82. Klaes R., et al. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res*, 1999;59(24):6132--6.
83. Kuevda, D., Kladova A., Shipulina O., Molochkov V., Pokrovskii V. Novel Real-time PCR based quantitative assay for detection of broad spectrum of Beta - human

papillomaviruses// Abstract in 23-d international papillomavirus conference and clinical workshop. – Prague, 2006.p. 285;

84. Laure, Rittié, Gary J Fisher. UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Research Reviews*. 2002;1(4):705—720 .
85. Lazarczyk M., et al. Regulation of cellular zinc balance as a potential mechanism of EVER-mediated protection against pathogenesis by cutaneous oncogenic human papillomaviruses. *J Exp Med*. 2008;205(1):35--42.
86. Li Y.H., Chen G., Dong X. P., Chen H. D. Detection of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus DNA in nongenital seborrhoeic keratosis. *Br J Dermatol*. 2004;151(5):1060--1065.
87. Majewski S. and S. Jablonska, Human papillomavirus-associated tumors of the skin and mucosa. *J Am Acad Dermatol*. 1997;36(5):659—85.
88. Majewski, S. Human papillomavirus-associated tumors of the skin and mucosa / S. Majewski, S. Jablonska // *J. Am. Acad. Dermatol.* - 1997. - Vol. 36. - P. 659 - 685.
89. Mallitt K.A., et al. An analysis of clustering of betapapillomavirus antibodies. *J Gen Virol*. 2010; 91(8):2062--7.
90. Marcuzzi G.P., et al., Spontaneous tumour development in human papillomavirus type 8 E6 transgenic mice and rapid induction by UV-light exposure and wounding. *J Gen Virol*, 2009;90(12) 2855--64.
91. Meibodi N.T., et al. No Evidence of Human Papillomaviruses in Non-genital Seborrheic Keratosis. *Indian J Dermatol*. 58(4):326.
92. Meyer T., et al. Frequency and spectrum of HPV types detected in cutaneous squamous-cell carcinomas depend on the HPV detection system: a comparison of four PCR assays. *Dermatology*. 2000;201(3):204-11.
93. Morales-Ducret C.R., et al. Bcl-2 expression in primary malignancies of the skin. *Arch Dermatol*, 1995;31(8):909--12.

94. 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.* 2021 Jan 9:e14767. doi:
10.1111/dth.14767.
95. Orth G. Genetics of epidermodysplasia verruciformis: Insights into host defense
against papillomaviruses. *Semin Immunol.* 2006;18(6):362--74.
96. Pett M.R., et al. Acquisition of high-level chromosomal instability is associated
with integration of human papillomavirus type 16 in cervical keratinocytes. *Cancer
Res.* 2004; 64(4):1359--68.
97. 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.
98. Ramoz N., et al. Evidence for a nonallelic heterogeneity of epidermodysplasia
verruciformis with two susceptibility loci mapped to chromosome regions 2p21-
p24 and 17q25. *J Invest Dermatol.* 2000;114(6):1148--53.
99. Ramoz N., et al. Mutations in two adjacent novel genes are associated with
epidermodysplasia verruciformis. *Nat Genet.* 2002;32(4):579--81.
100. Robson R., et al. Prospective registry-based observational cohort study of
the long-term risk of malignancies in renal transplant patients treated with
mycophenolate mofetil. *Am J Transplant.* 2005;5(12): 2954--60.
101. Roncalli de Oliveira W., et al. Seborrheic Keratosis-like lesions in patients
with epidermodysplasia verruciformis. *J Dermatol.* 2003;30(1):48--53.
102. RuDa, Pandel, Borut Poljšak, Aleksandar Godic, and Raja Dahmane, ISRN
Dermatology Volume 2013, Article ID 930164, 11 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/930164> "Skin Photoaging and the Role of
Antioxidants in Its Prevention"

103. Sallam M. A., Kamel M. M., Missiry G. E., Helal M. F. Detection of some types of human papillomaviruses in skin tags. *Sc. J. Az. Med. Fac. (Girls)*. 2003;24(1):311--317.
104. Sanchez-Lanier M., C. Triplett M.C. Possible role for human papillomavirus 16 in squamous cell carcinoma of the finger. *J Med Virol*. 1994;44(4):369--78.
105. Schaper I.D., et al. Development of skin tumors in mice transgenic for early genes of human papillomavirus type 8. *Cancer Res*. 2005;65(4):1394--400.
106. Scheurer, M.E. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology and prevention / M.E. Scheurer [et al.] // *Int. J. Gynecol. Cancer*. - 2005. - Vol. 15. - P. 727 - 746.
107. Shamanin V., et al. Specific types of human papillomavirus found in benign proliferations and carcinomas of the skin in immunosuppressed patients. *Cancer Res*, 1994;54(17):4610--3.
108. Snijders P., Chris J. The value of viral load in HPV detection in screening // *HPV today*. - 2006. - Vol. 8. - P. 8-9.
109. Snijders P., Chris J. The value of viral load in HPV detection in screening. *HPV today*. 2006; 8: 8--9.
110. Thomas M., Banks L. Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene*. 1998;17(23):2943--54.
111. Tsambaos D., et al. Detection of human papillomavirus DNA in nongenital seborrhoeic keratoses. *Arch Dermatol Res*. 1995;287(6):612--5.
112. Vierkotter, A. The SCINEXA: A novel, validated score to simultaneously assess and differentiate between intrinsic and extrinsic skin ageing / A. Vierkotter, U. Ranft, U. Kramer, D. Sugiri, V. Reimann, J. Krutmann // *Journal of dermatological science*. - 2009. - 53(3). - P. 207-211

113. Waterboer T., et al. Antibody responses to 26 skin human papillomavirus types in the Netherlands, Italy and Australia. *J Gen Virol.* 2009;90(8):1986--98.
114. Waterboer T., et al. Serological association of beta and gamma human papillomaviruses with squamous cell carcinoma of the skin. *Br J Dermatol.* 2008;159(2):457--9.
115. Weissenborn S. J., Nindl I., Purdie K., Harwood C., Proby C., Breuer J. et al. Human papillomavirus-DNA loads in actinic keratoses exceed those in non-melanoma skin cancers // *J Invest Dermatol.* - 2005. - Vol. 125, №1. - P. 93-97.
116. Weissenborn S. J., Nindl I., Purdie K., Harwood C., Proby C., Breuer J. et al. Human papillomavirus-DNA loads in actinic keratoses exceed those in non-melanoma skin cancers. *J Invest Dermatol.* 2005; 125(1): 93--97.
117. Wieland, U., et al., Communication: papillomavirus DNA in basal cell carcinomas of immunocompetent patients: an accidental association? *J Invest Dermatol*, 2000. 115(1): p. 124-8.
118. Zhao Y.K., et al. Human papillomavirus (HPV) infection in seborrheic keratosis. *Am J Dermatopathol.* 1989;11(3):209--12.
119. zur Hausen H., Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(9):690--8.
120. zur Hausen, H. Papillomaviruses and cancer: from basic to clinical application / H. zur Hausen // *Nat. Rev. Cancer.*- 2002. - Vol. 2. - P. 342 -350.