

АЛЕКСАНДРОВА

Александра Константиновна

**КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА СЕБОРЕЙНОГО КЕРАТОЗА**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

доктора медицинских наук

14.03.02 - патологическая анатомия

14.01.10 - кожные и венерические болезни

Москва- 2020

Работа выполнена в ФГАО ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научный консультант:

доктор медицинских наук, доцент

Смольянникова Вера Анатольевна

Официальные оппоненты:

Карселадзе Аполлон Иродионович – доктор медицинских наук, профессор, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина», патологоанатомическое отделение, отдел морфологической и молекулярно-генетической диагностики опухолей, главный научный консультант

Мордовцева Вероника Владимировна – доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств», Медицинский институт непрерывного образования, кафедра кожных и венерических болезней с курсом косметологии, профессор кафедры

Титов Константин Сергеевич – доктор медицинских наук, доцент, ГБУЗ МКНЦ имени А.С. Логинова ДЗМ, онкохирургическое отделение опухолей кожи и мягких тканей, заведующий отделением

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Минздрава России

Защита диссертации состоится «21» декабря 2020 года в 14.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.01 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет) по адресу: 119991, Москва, ул.Трубецкая, д.8 стр.2

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

Автореферат диссертации разослан «___» _____ 2020г

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, доцент

Блинова Екатерина Валериевна

Общая характеристика работы

Актуальность исследования

Себорейный кератоз (СК) - доброкачественная эпителиальная опухоль кожи, в возрасте после 50 лет его распространенность достигает 80-100% в популяции [Kwon OS et al., 2003; Молочков В.А. с соавт., 2012; Roh NK et al., 2016]. Опухоли могут быть как единичными, так и множественными, что в последнем случае приводит к значительному косметическому дефекту, а так же рядом исследователей рассматривается как паранеопластический процесс [Ponti G. et al., 2010; Sardon C. et al., 2017; Asri H. et al., 2018]. Многообразие клинических проявлений СК приводит к частым диагностическим ошибкам [Izikson L. et al., 2002; Mohamed M. et al., 2013; Tran P.T. et al., 2019], которые, по данным морфологических исследований, составляют от 33,6% до 75,1% случаев [Лебедева Ю.В., 2010; Roh NK et al., 2016].

Этиология и патогенез СК не установлены, вопрос о возможности его малигнизации остается открытым [Vun Y. et al., 2006; Wu G. et al., 2015, Cimpean I et al., 2019; Kurihara Y. et al., 2019]. Результаты единичных иммуногистохимических (ИГХ) исследований, направленных на изучение экспрессии белков, участвующих в клеточном цикле: p53, p63, p16, p27, а также маркера пролиферации Ki-67, приводят к взаимоисключающим выводам. Это является следствием того, что наиболее детально рассматривались только определенные гистологические типы СК, на малом количестве материала или с использованием ретроспективного анализа, без учета распространенности и локализации опухолей. Остается неясной роль таких этиологических факторов, как инсоляция, инсулинорезистентность и генетическая предрасположенность [Conscience I. et al., 2006; Bruecks A.K. et al., 2007; Hafner C. et al., 2010; Genders R.E. et al., 2017]. Крайне скудно в литературе освещены факторы, влияющие на меланогенез в опухоли [Manaka L. et al., 2001; Mansur A.T. et al., 2019]. Несмотря на проведенные многочисленные молекулярные исследования, не ясна роль вирусов папилломы человека (ВПЧ) в развитии опухоли, что не позволяет оценить возможность и эффективность проведения противовирусной терапии

[Tardio J.C. et al., 2012; Meibody N.T.et al. 2013].

Таким образом, детальное изучение нарушений в регуляции клеточного цикла, пролиферативной активности клеток и меланогенеза при разных гистологических формах СК позволит уточнить патогенез заболевания и оценить риск злокачественной трансформации опухоли, усовершенствовать диагностику и разработать более дифференцированный подход к его терапии.

Степень разработанности темы исследования

Большинство работ отечественных и зарубежных авторов посвящены в основном клиническим проявлениям СК, учитывая частую имитацию СК других эпителиальных новообразований кожи, в том числе злокачественных. Предположительно, на формирование опухоли влияют следующие факторы: генетическая предрасположенность [Safa G. et al., 2011; Turan E. et al. 2013]; наличие активирующих мутаций в третьем рецепторе фактора роста фибробластов [Hafner C. et al., 2010; Groesser L. et al. 2012]; длительная инсоляция [Kwon OS. et al., 2003]; вирус папилломы человека (ВПЧ) [Кладова А.Ю., 2007; Tardio J.C. et al., 2012], иммунологические нарушения [Vestergaard M.E. et al., 2009; Лебедева Ю.В., 2010; Eastman K.L. et al., 2013] и «старение кератиноцитов» [Nakamura S. et al., 2003]. Рост и распространение опухолей происходит у пациентов при сопутствующей онкологической патологии внутренних органов и сопровождается повышением экспрессии EGFR в СК [Heaphy M.R. et.al., 2000; Ponti G. et al., 2010]. Однако в исследовании Saraiya A. с соавт. (2013) прогрессирование СК было предположительно связано с наличием у пациента гиперинсулинемии.

Пролиферативная активность клеток СК, по данным разных исследователей, варьирует от низкой (Hafner C. et al., 2010) до высокой (Bahrani E. et al., 2019). Данные об экспрессии p53 в СК крайне противоречивы и проводились более 10 лет назад [Ko C.J. et al., 2005; Mandinova A. et al., 2009]. Вызывает интерес так же выявленная гиперэкспрессия белка p63 в СК, характерная для болезни Боуэна и плоскоклеточной карциномы [Seo E.Y. et al. , 2012]. Экспрессия еще одного белка - регулятора клеточного цикла, p16

изучена при отдельных гистологических видах СК и, по мнению одних авторов, свидетельствует о «старении клеток» [Hillen L.M. et al., 2017], а у других является маркером злокачественной трансформации опухоли [Harvey N.T. et al., 2013; Wu Y.H. et al. 2015]. Интерес к меланогенезу при СК ограничен единичными работами, в которых описано повышение количества меланина в опухоли и нарушение синтеза меланогенных цитокинов [Manaka L. et al., 2001, Takenaka Y. et al., 2013].

Роль вируса папилломы человека (ВПЧ) в развитии СК до сих пор не ясна. Наличие или отсутствие в клетках опухоли ДНК ВПЧ четко зависело от локализации опухоли и метода исследования [Кладова А.Ю., 2007; Tardio J.C. et al., 2012; Meibody NT. et al., 2013].

Цель исследования

Выявить патогенетические механизмы развития различных форм СК на основании комплексного клинического, морфологического и иммуногистохимического исследований и разработать алгоритм диагностики заболевания.

Задачи исследования

1. Дать клиническую характеристику пациентов с множественным и единичным СК.
2. Изучить морфологические особенности разных гистологических типов СК.
3. Изучить экспрессию белков p53, p63, p16 и p27(Kip1), участвующих в регуляции клеточного цикла и экспрессию рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) у пациентов с множественным и единичным СК при разных гистологических типах опухоли иммуногистохимическим методом.
4. Оценить состояние пролиферативной активности клеток по уровню экспрессии Ki-67 -маркера пролиферации клеток у пациентов с множественным и единичным СК при разных гистологических типах опухоли иммуногистохимическим методом.
5. Изучить процессы меланогенеза при разных гистологических типах СК иммуногистохимическим методом по уровню экспрессии маркера дифференциров

-ки меланоцитов Melan A.

6. Оценить выявляемость ДНК ВПЧ (6,11,18типы) иммуногистохимическим методом у пациентов с множественным и единичным СК.

7. Сравнить полученные результаты и выявить зависимость морфологических и иммуногистохимических изменений от нарушений углеводного обмена у пациентов с множественным и единичным СК.

Научная новизна.

В работе впервые:

- выявлены особенности клинических проявлений СК в зависимости от наличия у пациентов нарушений углеводного обмена (сахарного диабета 2 типа и нарушенной толерантности к глюкозе). На основании полученных данных предложена клиническая классификация опухолей;
- установлены различия в патогенетических механизмах развития единичного и множественного СК: при единичных опухолях в основе лежит повышение экспрессии p16 в сочетании со слабой экспрессией p63 и EGFR, при множественных отмечается гиперэкспрессия p16, p63 и EGFR;
- определена роль инсулинорезистентности в развитии множественного СК. Доказано, что гиперэкспрессия белков клеточного цикла p16, p63 и EGFR в СК ассоциирована с наличием нарушений углеводного обмена у пациентов и распространенностью опухолей;
- выявлен единый патогенез акантотического, клонального и аденоидного типа СК, учитывая отсутствие значимых различий в экспрессии белков клеточного цикла p53, p63, p16, p27, EGFR и маркера пролиферативной активности Ki-67, что дает возможность объединить их в единую группу обычного (простого) СК в гистологической классификации;
- выявлены патогенетические особенности раздраженного типа СК, в виде гиперэкспрессии белков клеточного цикла p53, p27, p16 и увеличения пролиферативной активности клеток опухоли, что свидетельствует о риске его злокачественной трансформации;

-определены прогностические факторы прогрессирования СК по результатам клинических и иммуногистохимических исследований: наличие гиперэкспрессии p16, p63, EGFR в опухоли у пациентов с сопутствующими нарушениями углеводного обмена;

-на основании клинических, морфологических и иммуногистохимических исследований установлено, что пигментация СК связана не с усилением меланогенеза под воздействием УФ излучения, а с накоплением пигмента в силу старения клеток опухоли, о чем свидетельствует снижение экспрессии Melan A в клетках СК по сравнению с окружающим эпидермисом, а так же локализация наиболее пигментированных опухолей на закрытых участках туловища;

-выявлено отсутствие корреляционной связи между степенью выраженности экспрессии EGFR и пролиферативной активностью опухоли (по Ki-67), что свидетельствует о снижении чувствительности клеток СК к влиянию данного фактора роста.

Практическая значимость.

Разработан алгоритм диагностики и ведения пациентов с множественным и единичным СК на основании особенностей клинической картины и морфологических проявлений заболевания. Установлено, что сочетание множественных очагов СК с преимущественным расположением в крупных складках кожи с множественными фиброэпителиальными полипами является основанием для проведения исследований, направленных на поиск у пациентов СД 2 типа или нарушенной толерантности к глюкозе.

На основании результатов иммуногистохимического исследования с моноклональными антителами к p53, p16 и Ki67 определен риск злокачественной трансформации раздраженной формы СК, что обосновывает применение активной хирургической тактики по удалению опухоли с обязательным гистологическим исследованием при ее локализации на открытых участках у пациентов с множественным СК.

Выявленные нами в ходе исследования прогностические факторы прогрессирования заболевания имеют несомненную ценность и могут

использоваться в клинической практике на этапе планирования комплексного лечения пациентов с СК.

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 14.03.02 - «Патологическая анатомия» (согласно пунктам 2 и 3) и 14.01.10-« Кожные и венерические болезни» (согласно пунктам 1 и 3).

Методология и методы исследования

Методология заключалась в системном подходе и комплексном анализе научных трудов отечественных и зарубежных авторов, связанных с клиническими проявлениями и патогенезом СК. На основании анализа были сформулированы цель и задачи исследования. Для их решения в работе были использованы клинический, генеалогический, лабораторный, гистологический и иммуногистохимический методы исследования, результаты которых были статистически обработаны.

Положения, выносимые на защиту:

1.СК является гетерогенным заболеванием, клинические проявления которого зависят от генетической предрасположенности и нарушений углеводного обмена.

2.Основную роль в патогенезе СК играет «старение» клеток на фоне окислительного стресса и нарушения метаболических процессов в клетке, приводящих к активации супрессорной активности в виде увеличения экспрессии p16 при низкой пролиферативной активности опухоли. Наличие у пациентов хронической гипергликемии приводит к ускоренному старению клеток, что клинически проявляется достоверным преобладанием множественного СК у пациентов с СД 2 типа и НТГ и сопровождается изменением экспрессии p63 и EGFR в клетках опухоли.

3.В отличие от акантотического, аденоидного и клонального типов СК формирование раздраженного типа с очагами плоскоклеточной дифференцировки происходит на фоне гиперэкспрессии маркеров клеточного цикла- p53, p27, p16 и повышенной пролиферативной активности клеток, что свидетельствует о возможности его злокачественной трансформации в дальнейшем.

4.Характер пигментации СК зависит от степени накопления пигмента в стареющих клетках, учитывая низкое содержание меланоцитов по данным экспрессии Melan A и отсутствие стимуляции меланогенеза под воздействием УФ излучения в опухолях.

5.Множественные фиброэпителиальные полипы и наличие нарушений углеводного обмена у пациентов с СК в сочетании с гиперэкспрессией p63, EGFR, p16 при иммуногистохимическом исследовании являются прогностическими факторами дальнейшего прогрессирования заболевания.

Степень достоверности результатов проведенных исследований, обоснованность научных положений, выводов, рекомендаций.

Научные положения, выводы и практические рекомендации, сформулированные в работе, базируются на достаточном по числу наблюдений материале. Достоверность полученных данных обеспечивается последовательным и логичным изложением задач исследования, использованием комплекса современных методов исследования, достаточного объема материала, адекватным применением методов статистического анализа, сравнении полученных результатов с актуальными данными современной литературы и их оценкой.

Апробация работы

Результаты исследования доложены на IV Московском форуме «Дерматовенерология и косметология: синтез науки и практики» (Москва, 2014); XXXII Юбилейной научно-практической конференции с международным участием «Рахмановские чтения: Вчера, сегодня, завтра отечественной дерматологии» (Москва, 2015); XV Всероссийском съезде дерматовенерологов и косметологов (Москва, 2015); XXXIII научно-практической конференции с международным участием «Рахмановские чтения: от дерматологии А.И.Поспелова до наших дней-170лет» (Москва, 2016); X Юбилейной научно-практической конференции дерматовенерологов и косметологов (Санкт-Петербург, 2016); Annual International Conference on Research, Education and Teaching by Russian Academics (Афины, Греция, 2016); VI Межрегиональном

Форуме "Дерматовенерология и косметология: синтез науки и практики" (Москва, 2016); X Международном форуме дерматовенерологов и косметологов (Москва, 2017); в виде постерного доклада на 29th European Congress of Pathology (Амстердам, Голландия, 2017); XI Международном форуме дерматовенерологов и косметологов (Москва, 2018).

Личный вклад автора

Планирование работы, детальный анализ отечественной и зарубежной литературы по теме исследования, обследование и динамическое наблюдение пациентов с себорейным кератозом, забор материала для гистологического и иммуногистохимического исследования и их проведение, анализ и интерпретация полученных результатов, их статистическая обработка, формулировка научных положений, выводов и практических рекомендаций, а так же написание статей по основным результатам исследования выполнены лично автором.

Внедрение результатов исследования в практику

Разработанный автором в результате проведенных исследований алгоритм диагностики себорейного кератоза с учетом особенностей клинической картины и установленные прогностические факторы прогрессирования заболевания используются в практической работе врачей медико-санитарной части АО «Корпорация «Московский институт теплотехники»» (г. Москва) и многопрофильного медицинского центра АРСВИТА ООО «Королев Медицина» (МО, г.Королев). Материалы диссертации, посвященные патогенезу себорейного кератоза, возможностям его малигнизации и особенностям нарушений клеточного цикла используются в учебном процессе на практических занятиях и в лекционном курсе для студентов, ординаторов и аспирантов кафедры патологической анатомии имени академика А.И. Струкова Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), а так же кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО «Московский государственный

медико-стоматологический университет имени А.И.Евдокимова» Минздрава России.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 33 научные печатные работы, в том числе 12 статей в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России (из них 3 в международной базе данных Scopus).

Структура и объем работы

Диссертация изложена в традиционной форме, на 223 страницах. Состоит из оглавления, списка сокращений, введения, и четырех глав: обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных результатов исследования, а также заключения, выводов, практических рекомендаций и приложения. Работа иллюстрирована 57 рисунками, а так же 59 таблицами и 2 диаграммами. Список литературы содержит 287 источников, из которых 40 отечественных и 247 иностранных работ.

Основное содержание работы

Материалы и методы

Под наблюдением находились 334 пациента с клиническими проявлениями СК, самостоятельно обратившиеся с целью диагностики и удаления новообразований кожи в медико - санитарную часть АО Корпорации «Московский институт теплотехники» в период с 2013 по 2017 год. По результатам обследования в исследование были включены 300 человек: 227 (75,7%) женского пола и 73 (24,3%) мужского пола. Возраст пациентов варьировал от 45 до 78 лет (средний возраст $63,5 \pm 8,0$ лет, медиана 63 года).

Критерием включения в исследование было наличие у пациента гистологически верифицированного СК; отсутствие на момент осмотра и в анамнезе злокачественных новообразований кожи и внутренних органов, в том числе получающих химиотерапию и/или иммунотерапию. Таким образом, в исследование не вошли 34 пациента, у которых при гистологическом исследовании диагноз СК не был подтвержден. Исследования были одобрены на

заседании этического комитета Сеченовского университета (№11-13 от 13.11.2013).

Результаты обследования пациентов заносятся в индивидуальную регистрационную карту. Всем пациентам с СК было проведено клиническое обследование: сбор анамнеза заболевания; осмотр кожных покровов и видимых слизистых - не реже 1 раза в год в течение 4 лет; определение фототипа кожи (I-VI) по Т. Фитцпатрику; генеалогический анализ (составление родословной).

Наличие при осмотре значительных различий в количестве СК у пациентов позволило нам разделить их на 2 группы:

I группа. В нее вошли 150 пациентов с единичным СК (не более 20 опухолей) любой локализации. **II группа.** В нее вошли 150 пациентов с множественным СК (более 20 опухолей) любой локализации.

Лабораторные методы обследования включали в себя: 3-х кратное исследование глюкозы крови натощак 1 раз в месяц на аппарате ЭЛТА «Сателлит» (норма 3,33-5,55ммоль/л) - всем 300 пациентам.

По данным результатов анализов назначалась консультация эндокринолога. Сопутствующий диагноз СД 2 типа и НТГ пациентам с СК устанавливался с учетом диагностических критериев Всемирной организации здравоохранения 1999–2013 гг. и «Алгоритмов специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом» (под редакцией И.И. Дедова, М.В. Шестаковой – 2017 г. – 8 выпуск) с применением дополнительных методов исследования: проведения однократного перорального глюкозотолерантного теста (норма- <5,6ммоль/л натощак, через 2 часа <7,8ммоль/л), определения уровня гликированного гемоглобина (HbA_{1c}-норма <6,0%).

Морфологические исследования. Проводилась эксцизионная биопсия опухолей кожи у 300 пациентов. Хирургическим путем под местной анестезией Sol. Novocaini 0,5% иссекалась вся опухоль, отступя от ее края не менее 0,5 см. В 36,3% случаев (109 СК) забор материала проводился с мест, которые легко подвергаются воздействию солнечного света: кожи лица (20СК), шеи (29СК), зоны декольте (34СК), с кожи плеч (24СК) и передней поверхности голени

(2СК). В 63,7 % случаев (191СК) - с мест, чаще закрытых, менее склонных к воздействию УФ облучения: с кожи живота (86СК), нижней трети спины (66СК) и боковых поверхностей туловища (39СК).

Материал фиксировали в 10% нейтральном растворе формалина и обрабатывали по стандартной методике, с последующей заливкой в парафиновые блоки, из которых готовили гистологические препараты с окраской гематоксилином и эозином.

Для ИГХ- исследований использовали парафиновые блоки от 130 пациентов с установленным гистологическим диагнозом СК: 65 от пациентов I группы и 65 – от пациентов II группы. Исследование проводили на серийных парафиновых срезах толщиной 5 мкм, помещенных на адгезивные стекла, покрытые полизином («Menzel-Glaser»Германия). Срезы обрабатывались по стандартной методике с депарафинизацией и обработкой в микроволновой печи. Использовали набор реактивов и системы визуализации Novolink™ Polymer Detection System и моноклональные антитела: p53 (Novocastra Ltd,) clone DO-7, ready-to-use; p63 (Dako Cytomation) clone 4A4, разведение 1:1000; p27 (Novocastra Ltd;) clone 1B4, разведение 1:20; EGFR (Novocastra Ltd;) clone EGFR.25, ready-to-use; p16 (BD Pharmingen), clone G175-405, разведение 1:1000; HPV (тип 6,11,18), clone C4C, (Novocastra Ltd;), разведение 1:4;1:5; 1:10; 1:20; Melan A (Novocastra Ltd;) clone A103, ready-to-use; Ki-67 (Novocastra Ltd.) clone MM1, ready-to-use.

В качестве позитивного и негативного контроля в каждом случае использовали рекомендованные производителями образцы тканей. Результаты оценивали с помощью светового микроскопа Leica DM4000B (100х, 200х, 400х).

Для маркеров p53, p63 и p27 учитывали количество ядер окрашенных клеток опухоли, для маркера EGFR- количество окрашенных мембран клеток опухоли: отсутствие реакции или слабое окрашивание менее 10% клеток расценивали как отрицательную реакцию; окрашивание от 10% до 30% - как положительную, окраска более 30% ядер клеток - как гиперэкспрессию, а также по интенсивности окраски: слабая (+) и выраженная (++). При выраженной

окраске ядра клеток окрашивались в темно-коричневый цвет полностью, при умеренной и слабой - в виде широкого кольца с более светлым центром.

Для цитоплазматического маркера p16 результаты ИГХ- исследования оценивали по интенсивности диффузного цитоплазматического окрашивания: выраженная (++), слабая (+).

Для Ki-67 оценивали количество положительно окрашенных ядер клеток опухоли к 300 клеткам опухоли в местах с наибольшей экспрессией (увеличение $\times 400$ в трех полях зрения).

Для оценки экспрессии Melan A оценивали количество положительно окрашенных клеток опухоли к 300 клеткам опухоли в местах с наибольшей экспрессией (увеличение $\times 400$ в трех полях зрения).

Для оценки экспрессии HPV учитывали наличие окрашенных ядер клеток опухоли.

Статистическая обработка данных.

Для удобства статистической обработки результатов проведенного исследования все данные анамнеза, клинического и морфологических исследований были формализованы с помощью специально разработанного кодификатора и внесены в базу данных, созданную на основе электронных таблиц EXCEL. Достоверность различий между количественными показателями вычисляли по критерию t Стьюдента для нормально распределенных величин или по непараметрическому критерию Манна-Уитни. Для сравнения качественных параметров применяли точный критерий Фишера и χ^2 . Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$ (95% точности).

Степень взаимосвязи параметров оценивали с помощью корреляционного анализа по Спирмену. Для описания величины коэффициента корреляции использовали следующие градации: до 0,2 – очень слабая корреляция, до 0,5 – слабая корреляция, до 0,7 – средняя корреляция, до 0,9 – высокая корреляция, свыше 0,9 – очень высокая корреляция. Так же проводили многофакторный логистический регрессионный анализ для оценки прогностических факторов. Для анализа практической ценности прогноза использовали построение ROC-кривой.

Статистическая обработка материала и расчеты показателей были проведены с использованием статистического пакета программ Statistica for Windows v.10 и SPSS v21.

Результаты собственных исследований и их обсуждение

Клиническая характеристика пациентов с себорейным кератозом

Под наблюдением находились 300 пациентов с СК: 227 (75,7%) женского пола и 73 (24,3%) мужского пола. Возраст пациентов варьировал от 45 до 78 лет (средний возраст $63,5 \pm 8,0$ лет, медиана 63 года). В возрастной группе старше 60 лет находились две трети наблюдаемых пациентов (69,4%), что свидетельствует о развитии СК преимущественно в пожилом возрасте. Первые опухоли у большинства больных - 249 человек (83%) появились после 40 лет, у 51 пациента (17%) - после 55 лет. СК встречался значительно чаще у женщин (75,7%), что обусловлено, на наш взгляд, неодинаковой скоростью процесса старения у мужчин и женщин (Castelo-Branco C. et al., 2015). Так, снижение продукции эстрогенов в климактерическом периоде у женщин ведет к их дефициту, ухудшению чувствительности тканей к инсулину и ускоренному старению тканей [В.И. Кулаков с соавт. 2011]. Это подтверждает и тот факт, что средний возраст мужчин в нашем исследовании был достоверно выше, чем у женщин, и составил 66,1 и 62,7 лет соответственно ($p=0,001$).

Проведенный генеалогический анализ выявил наследственную отягощенность у 159 пациентов (53%): 127 из них (79,9%) были с множественным СК, с единичным - всего 32 (20,1%). У 144 пациентов множественный СК наблюдался в семье у одного из родителей (преимущественно у матери - 83,3%) и у сибсов пробанда (11,1%). У 15 пациентов множественный СК присутствовал в III поколениях (включая пробанда). Результаты исследования позволили предположить аутосомно - доминантный тип наследования заболевания с вариабельной экспрессивностью. Об этом свидетельствует наличие у пациентов родственников с множественными очагами поражения в II- III поколениях, отсутствие пропуска поколений, а так же описание семейных случаев множественного СК в

литературе (Hafner C. et al, 2008).

При осмотре СК был представлен преимущественно новообразованиями двух видов: куполообразной формы, с участками неравномерной пигментации, от 0,5см до 2,4см в диаметре, с сального вида папилломатозной или гладкой поверхностью, с милиарными темными псевдородовыми кистами или в виде приподнятых над поверхностью бляшек овальной формы, с выраженным гиперкератозом на поверхности. В исследовании встречались пациенты с III (51,4%), II (47,3%) и I (1,3%) фототипом кожных покровов, причем окраска опухолей не зависела от фототипа и варьировала от серовато- желтого до темно-коричневого цвета.

Из сопутствующих новообразований кожи у всех пациентов с СК встречались фиброэпителиальные полипы (ФП) и вишневые ангиомы. Более редко регистрировались актинический кератоз (7%), внутридермальные (простые) невусы (3%), атеромы (3%), диспластические невусы (2%), сенильная гемангиома (1%), липома (1%), дерматофиброма (0,7%) и кератоакантома (0,7%).

При клиническом осмотре и ознакомлении с медицинской документацией первых пациентов, было выявлено, что множественный СК сочетался у них с множественными ФП и сахарным диабетом 2 типа (СД 2 типа). По данным литературы, ФП являются маркерами нарушений углеводного обмена: именно инсулинорезистентность, сопровождаемая гиперинсулинемией, приводит к избыточной стимуляции рецепторов инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР-1) и патологической пролиферации кератиноцитов и фибробластов (Shah R. et al. 2014). Это позволило нам предположить взаимосвязь СК с нарушениями углеводного обмена. Было выявлено, что из 300 пациентов 114 (38%) страдают СД 2 типа. Длительность заболевания составляла от 2 до 8 лет, у 23 пациентов диагноз был установлен впервые. Уровень глюкозы крови натощак варьировал от 6,2- до 8,0 ммоль/л. Нарушение толерантности к глюкозе (НТГ) было обнаружено у 45 пациентов (15%) - уровень глюкозы натощак составлял 5,6-6,0 ммоль/л. У 141 (47%) пациента нарушений углеводного обмена выявлено не было, уровень глюкозы натощак составлял от 4,2 до 5,3ммоль/л.

В течение жизни у одних пациентов СК оставались единичными, отмечался их медленный рост и увеличение в размерах, у других появились множественные опухоли.

В I группу вошли 150 пациентов с единичным СК (не более 20 опухолей) любой локализации.: 108 женского и 42 мужского пола в возрасте 45 - 77 лет (средний возраст $62,162,1 \pm 8,6$ лет). В локализации опухолей не было замечено определённой закономерности, они с одинаковой частотой присутствовали на коже туловища и лица, отсутствовали на коже ладоней, подошв, а также на видимых слизистых оболочках. У большинства пациентов (76%) встречались единичные ФП (менее 5 элементов) с локализацией на коже шеи, веках или боковых поверхностях туловища. Нарушения углеводного обмена в виде СД 2 типа были у 16 пациентов (10,7%), продолжительность заболевания составляла от 2 до 5 лет. НТГ была впервые диагностирована у 9(6%) человек. У 125 (83,3%) пациентов отсутствовали нарушения углеводного обмена.

Во II группу вошли 150 пациентов с множественным СК (более 20 опухолей) любой локализации, из них 119 женского и 31 мужского пола. Средний возраст пациентов был достоверно выше - $64,9 \pm 7,1$ лет ($p=0,002$), преобладали пациенты 67-78 лет ($p=0,003$), тогда как в I группе преобладали пациенты 45-55 лет ($p=0,001$). СК у обследуемых пациентов располагались преимущественно по линиям Лангера. Гендерных различий в локализации не было выявлено. Среднее количество опухолей на одного пациента составило 51. Индекс встречаемости составил: область спины, живота, боковых поверхностей туловища-100%(150/150), область шеи и декольте - 100% (150/150), большая складка живота и складка под молочными железами - 89,3% (134/150) , кожа лица- 90,7% (136/150), волосистой части головы- 34,7%(52/150), паховые складки- 14%(21/150). Это противоречит данным литературы (Kwon OS et al., 2003; Лебедевой Ю.В., 2010, Kim HS et al.2013) о расположении СК преимущественно на открытых участках кожного покрова и не позволяет считать ведущей теорию о главенствующей роли инсоляции в его патогенезе.

У пациентов с множественным СК достоверно чаще встречались нарушения углеводного обмена - в 89,3% в отличие от 16,7% в I группе ($p=0,00001$), а также множественные ФП, расположенные как в одной (20,7% к 12,7%) ($p=0,044$), так и в двух и более анатомических областях (66,3% к 11,3%) ($p=0,00001$). Наличие нарушений углеводного обмена оказывали значимое влияние на клиническую картину заболевания.

Для 98 пациентов (65,3%) с СД2 типа (длительность заболевания составляла от 2- до 8 лет или впервые установленный у 23 пациента) были характерны крупные, от 1см до 2,1см в диаметре, умеренно и сильно пигментированные опухоли, с преимущественной локализацией на коже туловища. Поражались крупные складки кожи, в которых СК сливались в сплошной линейный очаг, сочетаясь с множественными ФП: у 15 пациентов на коже шеи или в подмышечных областях, у 83 пациентов - в двух и более анатомических зонах. На спине количество опухолей было значительно меньше, более мелких размеров (0,4-0,8см в диаметре), расположены опухоли были асимметрично, преимущественно в области лопаток и верхней трети спины.

У 36 пациентов (24%) с НТГ очаги СК были более мелкими, множественными, без значительного гиперкератоза на поверхности, от 0,4-до 1см в диаметре, а на шее и в крупных складках кожи СК был представлен преимущественно пятнами, со слабым шелушением. У 25 пациентов наблюдались множественные ФП: из них у 12 пациентов – с множественными ФП в двух и более анатомических зонах.

У 16 пациентов (10,7%) без нарушений углеводного обмена отсутствовало поражение крупных складок кожи и достоверно чаще встречались единичные ФП - 88,1% случаев ($p=0,00001$). СК локализовались преимущественно на коже туловища и лица, были разных размеров, от 0,4- до 1,8 см в диаметре, четко очерченные и не склонные к слиянию. На спине очаги СК часто были расположены линейно, вдоль позвоночного столба по типу «елочки», или регистрировались отдельно расположенные крупные опухоли, со значительным гиперкератозом на поверхности.

Сочетание СК с другими новообразованиями кожи достоверно чаще встречалось у пациентов II группы ($p=0,034$), как и сопутствующая кожная патология - 44% против 16,7% в I группе ($p=0,00001$). Кроме того, сочетание от 2 до 4 заболеваний кожи встречалось у 35 пациентов (11,7%) с СД 2 типа, что подтверждает влияние хронической гипергликемии на кожные процессы. Преобладали заболевания грибковой и вирусной этиологии - дерматофития стоп (8%) и дистально-латеральная форма онихомикоза (14%), разноцветный лишай (3%), кандидоз складок, вульгарные бородавки (4,3%). Значительно реже (до 3%) встречались другие заболевания кожи: себорейный дерматит, вульгарный псориаз, красный плоский лишай, вульгарный ихтиоз, порокератоз и пиодермии.

Из-за вариабельности клинических проявлений СК расхождение клинического и морфологического диагнозов в нашем исследовании составило 10,8%. Наиболее часто множественный СК имитировали старческие бородавки (кератопапилломы) (53%), вульгарные бородавки (23,5%); внутридермальные невусы и актинический кератоз (по 8,8%); базальноклеточный рак (5,9%). В 2 случаях, которые первоначально рассматривались нами как меланома и кератоакантома кожи, морфологически был диагностирован себорейный кератоз, и пациенты включены в исследование.

Таким образом, характер развития как множественного СК, так и единичного СК у лиц с генетической предрасположенностью и без нарушений углеводного обмена и у лиц с сопутствующими нарушениями углеводного обмена протекают по-разному, что указывает на роль инсулинорезистентности в патогенезе СК. На основании проведенных исследований нами предложена клиническая классификация заболевания:

1. Единичный себорейный кератоз.
2. Множественный себорейный кератоз с инсулинорезистентностью.
3. Множественный себорейный кератоз без инсулинорезистентности

Гистологическая характеристика себорейного кератоза

Нами был проведен анализ 300 гистологических препаратов, из них акантотический тип СК составил 194 опухолей (64,7%), аденоидный - 42 (14%), клональный - 34(11,3%), раздраженный -30(10%). В I группе достоверно преобладал аденоидный тип СК ($p=0,033$), во II группе- акантотический ($p=0,035$) (таблица 1).

Таблица 1 - Распределение гистологических типов себорейного кератоза в исследуемых группах

Гистологический тип	Группа				Всего	
	I		II			
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Кол-во СК	150	100	150	100	300	100
Акантотический тип	89	59,3	105	70,0* (0,035)	194	64,7
Аденоидный тип	27	18,0	15	10,0* (0,033)	42	14,0
Клональный тип	22	14,7	12	8,0	34	11,3
Раздраженный тип	12	8,0	18	12,0	30	10,0

*Примечание:** - достоверные различия между группами (p).

В одной и той же опухоли при серийных срезах могли встречаться характерные особенности нескольких типов, что подчеркивает единую природу всех гистологических типов СК.

Во всех препаратах опухоль содержала три вида клеток - преимущественно базалоидные, незначительное количество шиповатых и единичные меланоциты. При клональном типе базалоидные клетки были мелкими, с выраженными базофильными ядрами и располагались в опухоли в виде «гнезд». При раздраженном типе встречались очаги плоскоклеточной дифференцировки, напоминающие истинные роговые жемчужины при плоскоклеточном раке.

Была выявлена значимая корреляционная зависимость между гистологическим типом и локализацией СК ($R=0,34$, $p=0,000001$). На местах закрытых, менее подверженных воздействию УФ, достоверно чаще выявлялся акантотический тип СК ($p=0,00001$), тогда как на подверженных избыточной

инсоляции – аденоидный и раздраженный тип опухоли ($p=0,017$ и $p=0,00001$ соответственно). В 90% случаев (27 из 30 СК) раздраженный тип локализовался на подверженных избыточному солнечному излучению участках, что не ставит под сомнение роль УФ излучения в его развитии. А вот аденоидный тип СК, который некоторые исследователи (Elder DE et al, 2009; Roh NK et al, 2016) считают возникающим из сенильного лентиго и описывают исключительно на подверженных солнечному излучению участках туловища - только в 52,4% случаев (22/42СК).

В 75,7% случаев (22/29СК) встречались скудные периваскулярные лимфоцитарно-моноцитарные инфильтраты в строме опухоли, а также в виде единичных очагов в нижележащей дерме. Более выраженная воспалительная реакция в виде периваскулярных и очаговых (более 2 очагов в дерме) инфильтратов встречалась в 15,7% (4/25 СК), и только в 8,7% случаев (2/23 СК) наблюдался выраженный диффузный лимфоцитарно-моноцитарный инфильтрат вплоть до сетчатого слоя дермы.

СК с выраженным воспалением достоверно преобладали во II группе ($p=0,011$). Степень выраженности воспалительной реакции коррелировала с гистологическим типом опухоли в обеих группах ($R=0,49$, $p=0,0000001$). Так, слабое воспаление достоверно чаще встречалось при акантотическом типе (88,7%) в отличие от других гистологических форм ($p=0,00001$), умеренное - при аденоидном (28,6%) и клональном (32,3%) в отличие от акантотического (9,8%) ($p=0,0025$, $p=0,001$). Выраженное воспаление встречалось достоверно чаще при раздраженном типе СК - в 70% случаев ($p=0,00001$). Выраженность воспаления в опухоли зависела от локализации СК ($R=0,37$, $p=0,0000001$). Так, умеренное и выраженное воспаление достоверно чаще встречалось в СК, расположенных на подверженных интенсивному УФ излучению местах (44%), чем при локализации опухолей на участках, закрытых от влияния солнца (13,1%) ($p=0,00001$).

Присутствие нейтрофильных лейкоцитов в строме опухоли наблюдалось в 16СК раздраженного типа с выраженным воспалением. В 7 опухолях (3 клонального, 3 акантотического и 1 аденоидного типа) наличие нейтрофилов

сочеталось с начальным формированием очагов плоскоклеточной дифференцировки. Все опухоли были расположены на подверженных влиянию УФ излучения участках кожи. Таким образом, мы предположили, что в формировании плоскоклеточных очагов и раздраженного типа СК необходимым является сочетание двух факторов - избыточного УФ излучения и хронической травматизации, морфологическим проявлением которой является наличие нейтрофилов в инфильтрате. Одного из этих факторов недостаточно, так как в остальных СК, локализованных на открытых для УФ излучения местах, даже при умеренном воспалении, не было признаков плоскоклеточной дифференцировки.

Отложение пигмента меланина при СК было неравномерным, при серийных срезах в центральных отделах опухоли можно было встретить усиленное отложение пигмента в клетках, а в краевых участках СК - почти полное его отсутствие. В 58,7% случаев (176СК) встречалась слабая пигментация. Меланин располагался в виде «шапочек» над апикальными полюсами ядер отдельных клеток и/или в виде единичных глыбок и меланофагов в дерме и строме опухоли (I тип пигментации). В 26,3% случаев (79СК) регистрировалась равномерная пигментация клеток, расположенных на дермоэпидермальной границе, с единичными меланофагами в дерме и строме опухоли или их полным отсутствием (II тип пигментации). В 15% случаев (45СК) была выраженная диффузная пигментация в виде большого количества меланина в клетках опухоли, а так же скопления меланина в виде глыбок и меланофагов в дерме и строме СК (III тип пигментации).

Корреляционной зависимости между исследуемыми группами и характером пигментации в опухоли выявлено не было. При анализе гистологических форм СК при раздраженном типе встречался исключительно I тип пигментации, что достоверно отличало его от других типов ($p=0,00001$). III тип пигментации встречался достоверно чаще при клональном типе (52,9%) по сравнению с акантотическим (13,9%) ($p=0,00001$) и не встречался при аденоидном и раздраженном ($p=0,0035$, $p=0,00001$ соответственно), а II тип был характерен

для аденоидного типа СК (38,1%) и для акантотического – (32,5%). На характер пигментации в опухоли влияло УФ излучение, и, в отличие от неизмененного эпидермиса, это была отрицательная взаимосвязь ($R=-0,23$, $p=0,00004$). Так, III тип пигментации встречался только в 3,7% случаев (4/109) при локализации СК на местах, подверженных УФ излучению, в отличие от закрытых - 21,5% (41/191) ($p=0,00001$). В то же время I тип пигментации в 73,4% случаев (80/109) встречался в СК, расположенных на подверженных избыточному УФ излучению местах ($p=0,0001$). Клинические наблюдения подтверждают данный факт - большинство наиболее сильно пигментированных СК находились у пациентов на коже живота и нижней трети спины.

Таким образом, при СК, в отличие от неизмененного эпидермиса, не происходило стимуляции меланогенеза под воздействием УФ излучения, что свидетельствует о нарушении эпидермального баланса между стимуляторами и ингибиторами меланогенеза. Необходимо учесть и факт более выраженной лимфоцитарно- моноцитарной реакции в опухолях, локализованных на подверженных излишнему УФ излучению местах ($p=0,00001$), что приводит к излишней экспрессии провоспалительных цитокинов. В наиболее пигментированных СК (III тип) ни в одном случае не было выраженной воспалительной реакции, тогда как при слабом воспалении II и III тип пигментации встречался в 89,9% и 84,4% случаев в отличие от I типа (67,1%) ($p=0,00001$, $p=0,015$).

Роговые кисты, один из патогномоничных признаков СК, были множественными в 63,7% случаев (наличие более 5 истинных кист на опухоль) и преобладали при всех гистологических типах, что не соответствует данным литературы об отсутствии роговых кист при аденоидных типах СК и их множественности при других формах (Elder DE et al, 2009). Отсутствие корреляций с клиническими факторами и между группами свидетельствует об индивидуальном характере формирования роговых кист в зависимости от скорости терминальной дифференцировки клеток опухоли.

Иммуногистохимическая характеристика себорейного кератоза

Для ИГХ-исследований были отобраны: 40СК акантотического и по 30 СК аденоидного, клонального и раздраженного типа (таблица 2), из них 63 СК были удалены с подверженных УФ излучению участков, 67 СК - с мест, чаще закрытых, не подвергающихся частому воздействию солнца.

Таблица 2 - Распределение гистологических типов себорейного кератоза в группах для ИГХ- исследования

Гистологический тип	Акантотический	Аденоидный	Клональный	Раздраженный
I группа	14	19	20	12
II группа	26	11	10	18

При сопоставлении с клиническими данными с нарушениями углеводного обмена в I группе было 15 (23,1%) пациентов, из них с СД 2 типа- 12пациентов, с НТГ- 3. Во II группе с нарушениями углеводного обмена было 53 человека (81,5%), из них с СД 2 типа - 32 пациента, с НТГ- 21человек.

Мы изучали взаимосвязь экспрессии всех маркеров с клиническими данными (возрастом, фототипом кожных покровов, локализацией СК, наличием нарушений углеводного обмена у пациентов), а так же морфологическими (гистологическим типом СК, характером воспаления и пигментации опухоли) по группам и внутри групп.

Иммуногистохимическое исследование себорейного кератоза с моноклональными антителами к p53

При ИХГ-исследовании с моноклональными антителами к p53 положительная реакция разной степени интенсивности регистрировалась в 66СК (50,7%). Гиперэкспрессия p53 в виде окраски более 30% клеток опухоли встречалась только во II группе в 12 СК (18,5%) ($p=0,0001$) (рисунок 1А). Значимых отличий в положительной экспрессии p53 или ее отсутствии между группами выявлено не было. Слабая корреляционная связь наблюдалась между экспрессией p53 и наличием нарушений углеводного обмена у пациентов ($R= 0,29$, $p=0,00098$). Так, гиперэкспрессия p53 встречалась только у пациентов с

нарушениями углеводного обмена ($p=0,0003$), тогда как у пациентов без нарушений углеводного обмена достоверно чаще встречалось отсутствие экспрессии p53 ($p=0,007$).

Экспрессия p53 значимо коррелировала с гистологическим типом СК ($R=0,42$ при $p=0,000001$). Так, гиперэкспрессия p53 встречалась только при раздраженном типе опухоли - в 12СК (40%), кроме того, достоверно выше была частота положительной экспрессии p53 в 10% - 30% клеток опухоли при аденоидном типе – в 21СК (70%), по сравнению с акантотическим – в 10 СК (25%) ($p=0,0002$), клональным - в 10СК (33,3%) ($p=0,0046$) и раздраженным- в 13СК (43,3%) ($p=0,034$).

Как гиперэкспрессия, так и положительная экспрессия p53 в 92,1% случаев (58/63СК) встречались в СК, локализованных у пациентов на местах, наиболее подверженных УФ излучению, что достоверно чаще, чем на закрытых - в 11,9% случаев (8/67СК) ($p=0,0003$, $p=0,000001$). Положительная корреляционная связь была высокозначимой ($R=0,79$, $p=0,0000001$). В настоящее время процесс индукции p53 при повреждениях ДНК в результате воздействия УФ наиболее изучен. УФ излучение является причиной истощения клеточных и ферментативных антиоксидантов (Pandel R. et al., 2013), кроме того, включает прямое воздействие на кератиноциты, приводя к индукции интерлейкинов IL-1 α , IL-6 и ФНО- α , и к инфильтрации кожи фагоцитами - продуцентами активных форм кислорода, что способствует оксидативному повреждению ДНК и активации транскрипционных факторов (Muller H.K. et al., 2013). На наш взгляд, при СК происходит накопление и стабилизация в ядре дикого типа p53, а не его мутантных форм, в результате увеличения жизни белка и возможности его детекции ИГХ-методом, что находит подтверждение в единичных работах зарубежных авторов [Mandinova A. et al, 2009]. Об этом свидетельствует так же отсутствие экспрессии в 49,3% СК и четкая взаимосвязь с УФ излучением. Кроме того, гиперэкспрессия p53 выявлялась только в СК раздраженного типа, с присутствием нейтрофильных лейкоцитов в воспалительном инфильтрате. При этом активированный p53 в СК запускает процессы, направленные

преимущественно на остановку клеточного цикла, а не на апоптоз - клетки опухоли продолжают терминальную дифференцировку, что особенно четко видно при раздраженном типе, где дифференцировка клеток идет иначе и шиповатые клетки преобладают над базалоидными. Возможно, что присутствие у пациента хронической гипергликемии, приводящей к увеличению аутоокисления глюкозы, участию ее в механизмах гликирования белков и увеличению количества свободных кислородных радикалов в эпидермисе, является дополнительным стимулом для активации p53. Однако отсутствие статистических различий в положительной экспрессии p53 в СК у пациентов с нарушениями и отсутствием нарушений углеводного обмена говорит о незначительной роли нарушений углеводного метаболизма в активации белка.

***Иммуногистохимическое исследование себорейного кератоза с
мноклональными антителами к p63.***

При ИХГ-исследовании с моноклональными антителами к p63 положительная реакция регистрировалась в 107СК (82,3%), разной степени интенсивности. Гиперэкспрессия p63 в виде равномерной, диффузной окраски ядер более 30% клеток опухоли преобладала во II группе – 70,8% (46СК) (рисунок 1Б) против 29,2% (19СК) в I группе ($p=0,00001$). Тогда как отсутствие экспрессии встречалось достоверно чаще в I группе- 27,7% (18СК) к 7,7% (5СК) ($p=0,0025$). Слабая ядерная окраска 10%-30% клеток опухоли регистрировалась в 43,1% (28СК) в I группе и в 21,5% (14СК) во II группе ($p=0,007$), преимущественно в зоне дермоэпидермальной границы с уменьшением количества положительно окрашенных клеток к роговому слою.

Экспрессия p63 в опухоли значимо коррелировала с наличием нарушений углеводного обмена у пациентов ($R=0,82$, $p=0,0000001$). Гиперэкспрессия p63 в СК достоверно чаще регистрировалась у пациентов с нарушениями углеводного обмена, как при единичном, так и при множественном СК - в 89,7% случаев (при СД 2 типа - в 100% случаев, при НТГ - в 70,8%), по сравнению с 6,4% у пациентов без нарушений углеводного обмена ($p=0,00001$). Кроме того, отсутствие экспрессии p63 в СК встречалось исключительно у пациентов без нарушений

метаболизма углеводов -37,1% ($p=0,00001$).

В отличие от раздраженного типа СК, при котором всегда отмечалась положительная экспрессия p63 в 10-30% клеток (36,7%) или в более 30% клеток опухоли (63,3%), отсутствие экспрессии чаще регистрировалось при акантотическом (30%) и клональном типе (23,3%) ($p=0,0005$ и $p=0,0053$ соответственно), а так же при аденоидном типе (13,3%), не достигая статистической значимости. Если рассматривать положительную экспрессию p63 в 10-30% клеток опухоли и гиперэкспрессию, то достоверных различий не было ни для одного гистологического типа, что свидетельствует об отсутствии роли p63 в формировании определенного гистологического типа СК.

Важно отметить, что гиперэкспрессия p63 наблюдается преимущественно при базально-клеточной карциноме, плоскоклеточной карциноме кожи, ротоглотки, шейки матки, легких и свидетельствует о плохом прогнозе заболевания (Muzio L.L. et al. 2005; Lin Z et al., 2006; Iacono M.L. et al., 2011). Однако, кроме транскрипционной активности, белок p63 активно участвует в метаболизме глюкозы и липидов в клетках (Napolì M. et al., 2013). Выявленная в нашем исследовании взаимосвязь между экспрессией p63 в СК и наличием нарушений углеводного обмена у пациентов в обеих группах подтверждает его ведущую роль в регуляции метаболических процессов в клетках опухоли. На наш взгляд, гиперэкспрессия p63 в СК обусловлена повышением преимущественно транскрипционно- неактивных Δ DN-формы p63, что находит подтверждение в исследованиях Seo EY с соавт. (2012). Это является компенсаторным механизмом из-за значительного нарушения клеточного гомеостаза, в качестве необходимого фактора стабилизации гликолиза, однако в то же время приводит к снижению дифференцировки клеток и ингибированию апоптоза.

Имеются данные, что Δ DN-формы белка p63 функционируют как природные ингибиторы p53, подавляющие его транскрипционную активность по доминантно-негативному механизму (Stiewe T. et al. 2007; Копнин Б.П. с соавт., 2008). Мы провели сравнение экспрессии белков p53 и p63 и обнаружили, что в

СК гиперэкспрессия p53 всегда сочеталась с гиперэкспрессией p63, что было достоверно чаще, чем при отсутствии экспрессии p53 -37,5% ($p=0,00001$) или экспрессии p53 в 10-30% клеток опухоли -53,7% ($p=0,002$). Так же отсутствие p63 достоверно чаще было отмечено при отсутствии p53 -29,7% ($p=0,023$), чем при экспрессии p53 в 10-30% клеток- 7,4% ($p=0,00001$). Таким образом, можно говорить не о замещении функций или ингибировании одного белка другим, а скорее о нарушении баланса между белками p53 – семейства.

***Иммуногистохимическое исследование себорейного кератоза с
моноклональными антителами к EGFR***

Во всех исследуемых 130СК отмечалась положительная реакция с моноклональными антителами к EGFR, окрашивались мембраны клеток опухоли, гранулярное окрашивание цитоплазмы не учитывалось. Гиперэкспрессия EGFR в виде диффузной, равномерной окраски более 30% клеток опухоли преобладала у пациентов II группы - в 50СК (76,9%) (рисунок 1В) против 20СК (30,8%) I группы ($p=0,00001$). Слабая экспрессия EGFR в виде окраски мембран 10-30% клеток опухоли, расположенных ближе к дермоэпидермальной границе, преобладала в СК у пациентов I группы (69,2% к 23,1% соответственно).

Между экспрессией EGFR и наличием нарушений углеводного обмена у пациентов в обеих группах присутствовала статистически значимая высокая степень корреляции ($R=0,82$, $p=0,0000001$). Так, у лиц с нарушением углеводного обмена гиперэкспрессия EGFR наблюдалась в 92,6% случаев (63 пациента), из них у 39/44 с сопутствующим СД2 типа (85,7%) и у всех 24 пациентов с НТГ (100%), тогда как у лиц без нарушений углеводного обмена - всего в 11,3% случаях (7 пациентов) ($p=0,00001$).

Достоверные различия в экспрессии EGFR при разных гистологических типах СК встречались только во II группе в виде увеличения частоты встречаемости гиперэкспрессии EGFR при аденоидном типе (100%) в отличие от клонального (50%) ($p=0,012$) и раздраженного (66,7%) ($p=0,04$) и при акантотическом (84,6%) в отличие от клонального ($p=0,046$).

При всех гистологических типах СК гиперэкспрессия EGFR преобладала у пациентов II группы, что соответствует данным по группам. Корреляционной зависимости между экспрессией EGFR и гистологическим типом СК выявлено не было, что свидетельствует об отсутствии его значимого участия при формировании определенных гистологических форм опухоли.

Таким образом, на экспрессию EGFR в опухоли влияет наличие у пациентов инсулинорезистентности. Это подтверждает и статистически значимая зависимость между экспрессией протеина p63 и EGFR. Так, гиперэкспрессия EGFR присутствовала при гиперэкспрессии p63 в 86,1% случаев, что достоверно чаще, чем при отсутствии (17,4%) или экспрессии p63 в 10-30% клетках опухоли (23,8%) ($p=0,00001$, $p=0,00001$).

По данным литературы, гиперэкспрессия EGFR в СК присутствует при синдроме Лезера-Трела, способствуя росту и распространению элементов под влиянием продуцируемых злокачественными новообразованиями внутренних органов эндогенных медиаторов роста -TGF- α и EGF (Ponti G. et al. 2010). Выявленная взаимосвязь нарушений экспрессии EGFR в СК с изменениями углеводного обмена у пациентов позволяет по новому взглянуть на роль факторов роста в нарушениях клеточного цикла при формировании опухоли без сопутствующего онкологического заболевания.

Иммуногистохимическое исследование себорейного кератоза с моноклональными антителами к p16

При ИГХ- исследовании положительная реакция с моноклональными антителами к p16 наблюдалась во всех СК в виде цитоплазматического окрашивания более 50% клеток опухоли. Окраска была неравномерной. Так, при выраженном диффузном окрашивании (гиперэкспрессии) (рисунок 1Г) встречались отдельные группы клеток со слабой окраской, или ее отсутствием. Экспрессия p16 в СК зависела от возраста ($R=0,21, p=0,019$), воздействия избыточного УФ излучения ($R=0,35, p=0,000038$) и наличия у пациентов нарушений углеводного обмена ($R=0,43, p=0,0000001$) - факторов, приводящих к ускоренному старению клеток. Именно в группе с множественным СК, где

достоверно возраст пациентов был выше, чем при единичном СК ($64,9 \pm 7,1$ и $62,1 \pm 8,6$ соответственно) и нарушения углеводного обмена встречались достоверно чаще (89,3% и 10,7% соответственно), гиперэкспрессия p16 регистрировалась в 75,4% случаев (49СК) в отличие от 14 СК (21,5%) у пациентов I группы ($p=0,00001$). У пациентов с сопутствующими нарушениями углеводного обмена гиперэкспрессия p16 регистрировалась в 69,1% случаев (47 пациентов): из них у 36/44 - с СД2 типа (81,8%) и у 11/24 с НТГ (45,8%) в отличие от пациентов без нарушений метаболизма углеводов - в 25,8% случаев (16/62) ($p=0,00001$), достигая статистической значимости в I группе. Таким образом, именно сопутствующий СД 2 типа играл основную роль в накоплении белка p16 в клетках СК, тогда как наличие НТГ не являлось значимым фактором усиления экспрессии.

Гиперэкспрессия p16 достоверно чаще регистрировалась при гиперэкспрессии p63 (72,3%), чем при экспрессии p63 в 10-30% клеток (28,6%) или ее отсутствии (17,4%) ($p=0,00001$), что еще раз подтверждает влияние нарушений метаболизма глюкозы на скорость накопления стареющих клеток в опухоли. Кроме того, при множественном СК ни в одном случае не было сочетания в опухоли слабой экспрессии p16 и EGFR, тогда как в I группе, при единичном СК слабая экспрессия p16 сочеталась со слабой экспрессией EGFR в 76,5% случаев. Была отмечена достоверная тенденция к более частому сочетанию выраженной экспрессии EGFR с выраженной экспрессией p16 (в 66,7%), чем со слабой экспрессией p16 (41,8%) ($p=0,004$).

При локализации СК на местах, подверженных избыточному влиянию УФ излучения гиперэкспрессия p16 в СК встречалась достоверно чаще, в 42СК (66,7%) тогда как слабая экспрессия – в 21СК (31,3%) ($p=0,0001$). Эта зависимость находит подтверждение и при анализе сочетания экспрессии p16 и p53- гиперэкспрессия p16 достоверно чаще встречалась при гиперэкспрессии p53 (100%), чем при экспрессии p53 в 10-30% клеток опухоли или ее отсутствии - в 57,4% и 31,2% случаев ($p=0,003$, $p=0,00001$).

Гиперэкспрессия p16 достоверно чаще регистрировалась при раздраженном типе СК - в 22СК (73,3%), в отличие от остальных гистологических типов - акантотического – в 18 СК (45%), аденоидного- в 13 СК (43,3%) и клонального - в 9 СК (30%) ($p=0,026, p=0,018, p=0,0008$ соответственно), однако при анализе гистологических форм в группах достигала статистической значимости только во II группе в сравнении раздраженного типа с акантотическим и клональным. Гиперэкспрессия p16 преобладала во II группе вне зависимости от гистологического типа опухоли, что свидетельствует об отсутствии значимого влияния p16 на формирование определенного гистологического типа и его роль в формировании множественных поражений.

Гиперэкспрессия p16 в эпителиальных клетках человека в настоящее время рассматривается как маркер прогрессирования опухоли и показатель ее злокачественности (Genders R. E. et al., 2017 ;Vent J. et al, 2017) или в качестве маркера клеточного старения (Liu Y. et al., 2009; Donati P. et al., 2013). Учитывая результаты нашего исследования, экспрессия p16 в СК свидетельствует об активации супрессорной активности и ускоренном старении клеток, что находит подтверждение и в работах Nakamura S с соавт. (2003), Hillen LM с соавт. (2017).

У лиц пожилого возраста, при сочетании хронической гипергликемии и избыточном воздействии УФ излучения образуется повышенное количество свободных радикалов, что приводит к окислительному стрессу: повреждению ДНК, изменению внеклеточного матрикса и накоплению поврежденных белков, способствуя возникновению локального старения тканей с ускоренной эрозией теломер. У пациентов с множественным СК, учитывая сопутствующие нарушения метаболизма, происходит более выраженное и ускоренное старение кератиноцитов, что приводит к снижению выработки факторов роста (EGF, TGF и др), изменению чувствительности кератиноцитов к их воздействию и компенсаторному увеличению количества рецепторов факторов роста на поверхности клеток, что нашло отражение в наибольшей частоте гиперэкспрессии p16 и EGFR именно во II группе.

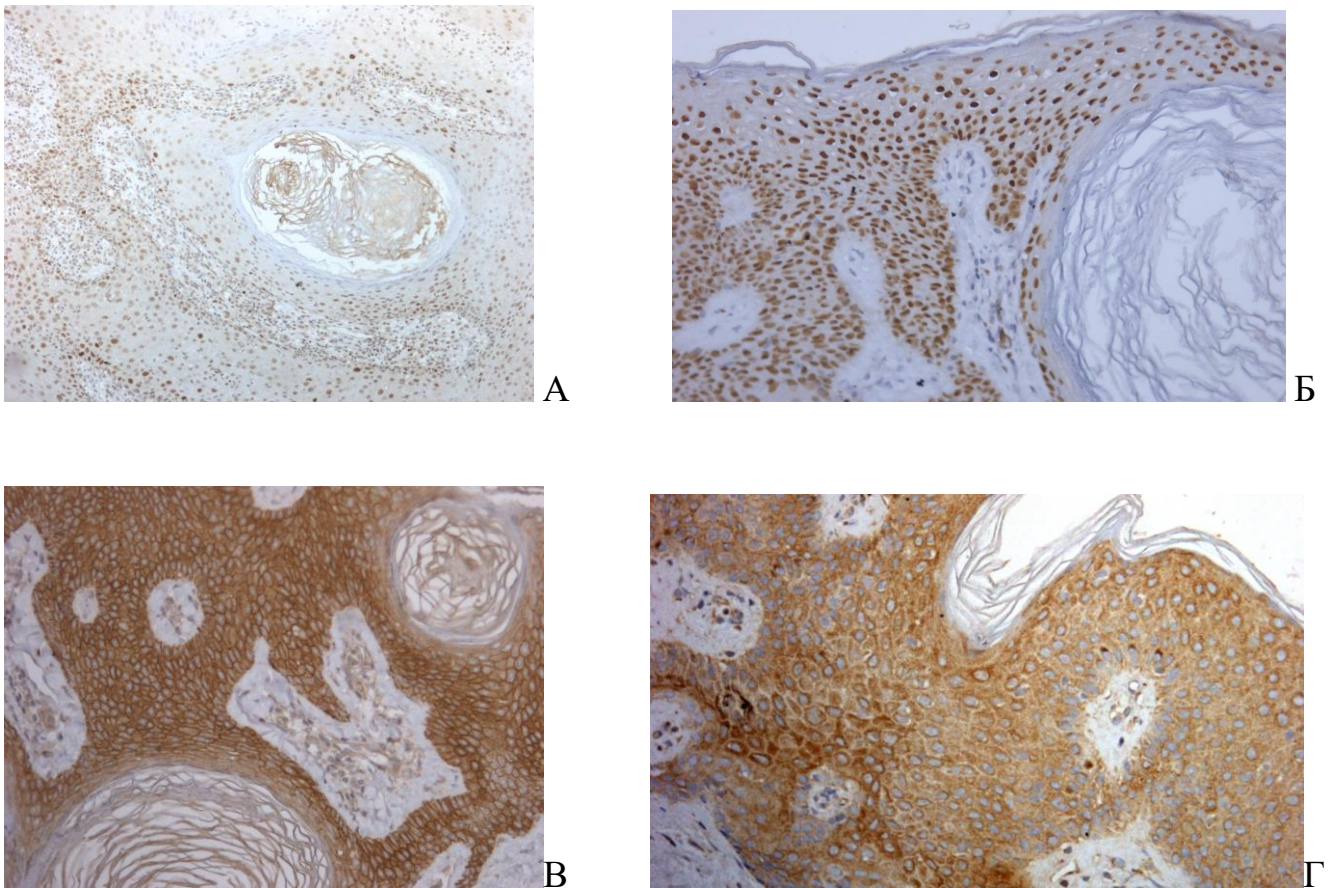


Рисунок 1 – Экспрессия маркеров клеточного цикла в СК.

А) экспрессия p53 в ядрах более 30% клеток. СК, раздраженный тип. x100;
Б) экспрессия p63 в ядрах более 30% клеток опухоли. СК, акантотический тип. x200;
В) экспрессия EGFR в опухоли, выраженная диффузная окраска мембран более 30% клеток. СК, акантотический тип. x200
Г) Выраженная экспрессия p16 в более 50% клеток опухоли. СК, акантотический тип. X200.
Иммунопероксидазный метод.

***Иммуногистохимическое исследование себорейного кератоза с
 моноклональными антителами к p27.***

Положительная реакция с моноклональными антителами к p27 регистрировалась в 38 СК (29,2%), была диффузной и не превышала 10-30% клеток опухоли, с наибольшей концентрацией положительно окрашенных ядер в верхних отделах опухоли, а также в строме опухоли и нижележащей дерме в виде интенсивного окрашивания клеток лимфоцитарно -моноцитарного ряда.

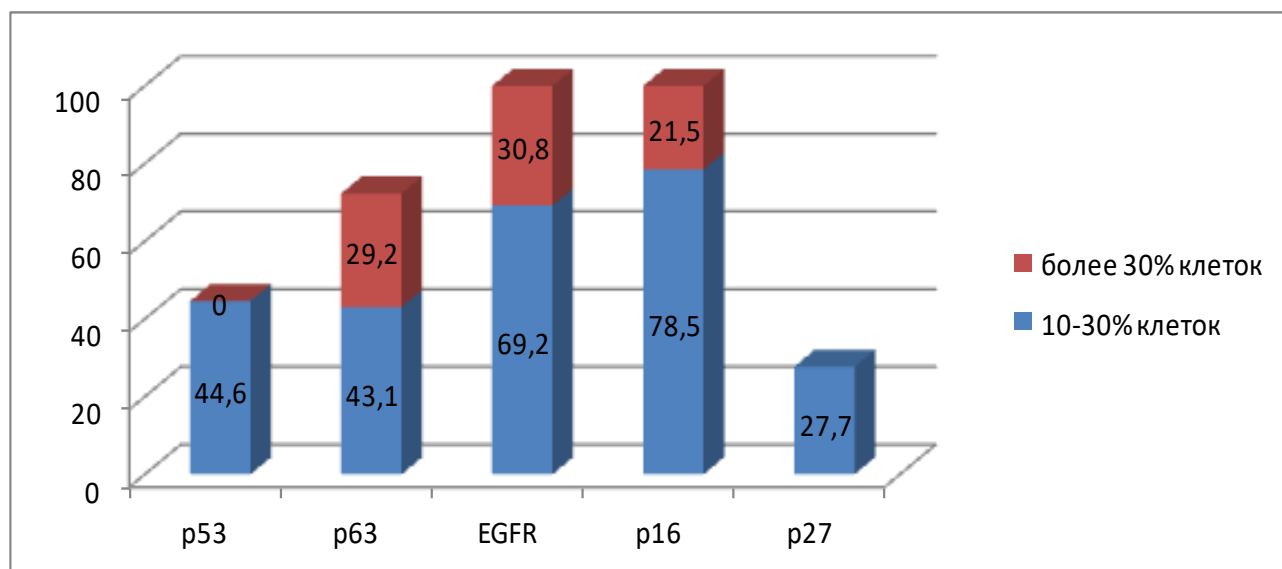
Межгрупповых различий, статистически значимых, в положительной экспрессии p27 в опухоли выявлено не было. Однако во II группе достоверно чаще встречалось отсутствие экспрессии -43,1% к 63,1% в I группе ($p=0,017$).

Экспрессия p27 в СК достоверно чаще встречалась при раздраженном типе - 19СК (63,3%) по сравнению с акантоическим – в 3 СК (7,5%) ($p= 0,0001$), аденоидным в 10СК (33,3%) ($p=0,019$) и клональным- в 6СК (20%) ($p= 0,0007$) и коррелировала с местом локализации опухоли ($R= 0,81$, $p=0,0000001$). Так, в 96,7% случаев СК с положительной экспрессией p27 располагались на местах, подверженных избыточному УФ излучению. Так же прослеживалась взаимосвязь с наличием в опухоли выраженного воспаления ($R=0,57$, $p=0,0000001$).

Индукция экспрессии p27 в СК, на наш взгляд, происходила в результате активации p53 и являлась одним из механизмов остановки клеток в G0 фазе для устранения повреждений ДНК, связанных с УФ излучением и воздействием других экзогенных факторов. Положительная экспрессия p27 в клетках опухоли присутствовала при гиперэкспрессии p53 в 100% случаев, что достоверно чаще, чем при экспрессии p53 в 10-30% клеток (46,3%) или ее отсутствии (1,6%) ($p=0,0005$ и $p=0,00001$ соответственно).

Таким образом, результаты проведенного исследования выявили значительные статистически достоверные различия в экспрессии изучаемых белков клеточного цикла при единичном и множественном СК (Рис.2).

А



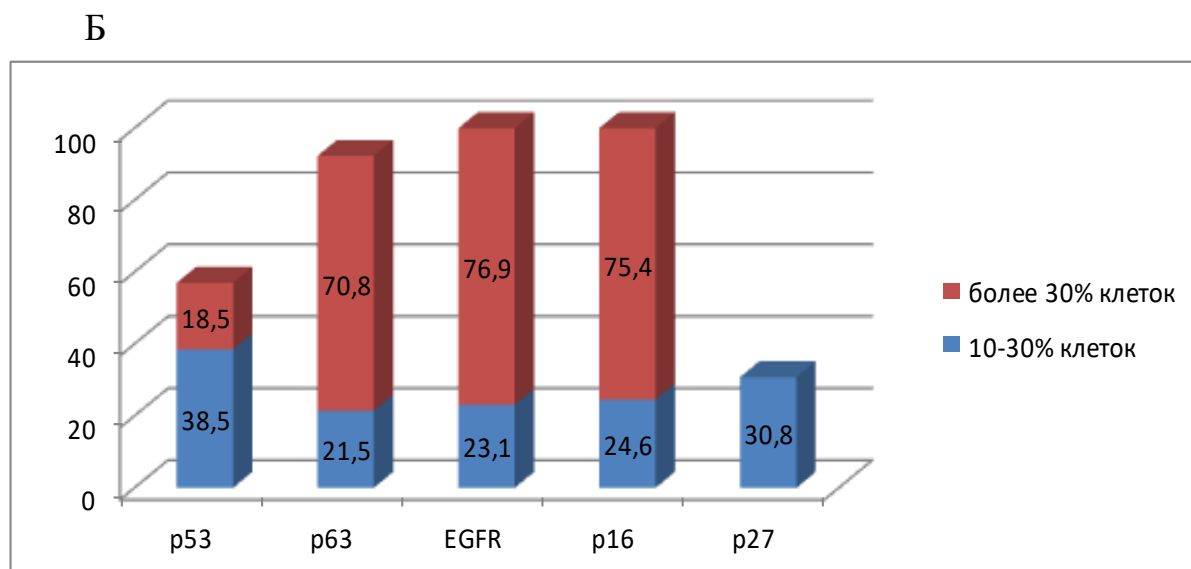


Рисунок 2- Экспрессия изучаемых белков клеточного цикла при СК: А – группа 1, Б – группа 2

Иммуноморфологическое исследование себорейного кератоза с моноклональными антителами к Ki-67.

ИГХ- исследование с моноклональными антителами к Ki-67 у пациентов с СК выявило низкую пролиферативную активность клеток опухоли, только в ряде случаев сопоставимую с пролиферативной активностью нормального эпидермиса. Процент пролиферирующих клеток опухоли находился в пределах от 3,0% до 11,3% (средняя величина $5,6 \pm 2,3\%$), с преимущественной локализацией пролиферирующих клеток очагами в области папилломатозных выростов опухоли. В неизмененном эпидермисе, прилегающем к опухоли, положительная реакция с моноклональными антителами к Ki-67 присутствовала в 7,3 - 9,0% (средняя величина $8,3 \pm 0,8\%$) клетках базального слоя, то есть выше в 1,5 раза, чем в СК ($p=0,023$).

Статистически значимых различий при сравнении величины экспрессии Ki-67 между группами выявлено не было, а так же взаимосвязи с наличием у пациентов нарушений метаболизма углеводов. Скорее всего, инсулин меняет митотическую активность в нормальных клетках, а опухолевые клетки СК не реагируют в полной степени на сигналы в силу «старения». Этим объясняется и снижение репаративной способности тканей при наличии СД 2 типа у пациентов.

Так же не было найдено значимой корреляции между выраженностью экспрессии EGFR и уровнем экспрессии Ki-67, что свидетельствует об отсутствии участия EGFR в повышении пролиферативной активности клеток СК.

Наибольший процент пролиферирующих клеток регистрировался при раздраженном типе ($8,5 \pm 4,8\%$) по сравнению с акантотическим, аденоидным и клональным ($p=0,0000001$), вне зависимости от группы. Причем наименьшая пролиферативная активность была во II группе при акантотическом типе ($3,8 \pm 0,8\%$) по сравнению с аденоидным ($p=0,000002$), клональным ($p=0,000005$) и раздраженным ($p=0,0000001$).

Увеличение пролиферативной активности клеток при раздраженном типе СК можно объяснить присутствием выраженной воспалительной реакции в опухоли и расположением на местах, подверженных избыточной инсоляции, учитывая выявленную корреляционную зависимость между уровнем Ki-67, воспалением ($R=0,60$, $p=0,0000001$) и локализацией СК на местах, подверженных избыточному УФ излучению ($R=0,57$, $p=0,0000001$). Однако, при данном гистологическом типе СК достоверно чаще регистрировалась гиперэкспрессия p16 (73,3%) - протеина, участвующего в снижении пролиферативной активности клеток при старении, в сочетании в 100% случаев с гиперэкспрессией p53. В работах Conscience I. с соавт. (2006), Harvey N. T. с соавт. (2013), Kalegowda IY. С соавт. (2017) такая ассоциация маркеров характеризует болезнь Боуэна и плоскоклеточный рак и является диагностическим критерием злокачественной природы опухоли.

Таким образом, учитывая описание в литературе клинических случаев малигнизации СК, не исключена возможность злокачественной трансформации именно раздраженного типа СК при дальнейшем влиянии неблагоприятных факторов (травы, УФ излучения, неадекватной терапии). Другие рассматриваемые морфологические варианты СК – акантотический, аденоидный и клональный имеют одинаковый прогноз развития, роста и отсутствие риска злокачественной трансформации.

Учитывая выявленные при гистологическом и ИГХ-исследовании

достоверные отличия раздраженного гистологического типа от других рассматриваемых типов СК, нами предложена гистологическая классификация опухолей.

1. Обычный (простой) себорейный кератоз
2. Себорейный кератоз с плоскоклеточной дифференцировкой

***Иммуногистохимическое исследование себорейного кератоза с
моноклональными антителами к Melan A***

Меланоциты в СК по данным ИХГ- исследования с моноклональными антителами к Melan A составляли всего 0,7-5% клеток опухоли, что значительно отличалось от прилежащего к опухоли неизмененного эпидермиса, в котором положительная реакция регистрировалась в 10,7%-14,3% клеток ($p=0,001$). Межгрупповых различий не было выявлено. Окрашивались клетки опухоли, расположенные диффузно, неравномерно, преимущественно на дермо-эпидермальной границе.

Для описания экспрессии Melan A мы выделили СК с содержанием менее 3% меланоцитов и от 3% до 5%.

Экспрессия Melan A в более 3% клеток опухоли достоверно преобладала при аденоидном - 14 СК (46,7%) и раздраженном типе - 15СК (50%) по сравнению с акантотическим типом - 5СК (12,5%) ($p=0,0007$ и $p=0,007$ соответственно) и, не достигая статистической значимости, с клональным - 9СК (30%).

Как и в здоровой коже (Вольф К. с соавт, 2012) наибольшее количество меланоцитов (более 3% клетках опухоли) регистрировалась исключительно в СК, локализованных на подверженных УФ излучению участках - в 68,2% случаев, тогда как на закрытых от солнечного излучения участках ни в одном случае количество положительно окрашенных клеток опухоли не превышало 3% ($p=0,00001$). Вызывает интерес и факт отрицательной взаимосвязи содержания меланоцитов в опухоли и характера пигментации ($R=-0,24$ при $p=0,006$). Так, в наиболее пигментированных опухолях количество меланоцитов не превышало 3

% (при II типе пигментации - в 77,4%, при III типе пигментации- в 100%). Это достоверно отличалось от содержания меланоцитов при I типе пигментации ($p=0,032$, $p=0,0003$ соответственно), при котором в 43,4% содержание меланоцитов было наибольшим (3%- 5% клеток).

На выживание меланоцитов, их дендритность, меланогенез и экспрессию рецепторов на клеточной поверхности значительное влияние оказывают сигналы от клеток опухоли, как и в нормальном эпидермисе - от кератиноцитов, причем большинство сигналов индуцируется УФ облучением. Однако, при СК увеличение количества меланоцитов в опухоли, как и локализация на местах, подверженных повышенному УФ излучению, не сопровождалось усилением пигментации. Наоборот, была выявлена отрицательная корреляционная взаимосвязь. Наиболее вероятной причиной накопления значительного количества пигмента, причем неравномерно распределенного в опухоли, при почти полном отсутствии меланоцитов является не увеличение синтеза, а его накопление в результате «старения» клеток СК, снижения их функциональной активности, что приводит к нарушениям эпидермального баланса между стимуляторами и ингибиторами меланогенеза - паракринными цитокинами. Об этом свидетельствуют и данные литературы об излишней экспрессии в СК ФНО – α и других провоспалительных цитокинов, ингибиторов меланогенеза, в сочетании с повышенным содержанием эндотелина 1- известного митогена для меланоцитов и стимулятора меланогенеза (Manaka L. et al, 2001).

Таким образом, характер пигментации являлся своеобразным показателем «возраста» опухоли, отражающим степень выраженности нарушений в процессах терминальной дифференцировки.

Иммуногистохимическое исследование себорейного кератоза с моноклональными антителами к HPV (6,11,18 типы).

В результате проведенного ИГХ-исследования с моноклональными антителами к наиболее часто встречающимся типам ВПЧ в кожных новообразованиях (HPV 6,11,18) положительная реакция присутствовала в 3 СК

(2,3%), в виде единичных, четко окрашенных клеток, расположенных в центральных отделах опухоли, ближе к роговому слою. В прилежащем к опухоли неизмененном эпидермисе положительная реакция с антителами к HPV отсутствовала. Учитывая результаты ИГХ- исследования, отсутствие характерных гистологических признаков вирусной инфекции и регресса опухолей от проводимой противовирусной терапии пациентам с сопутствующими множественными вульгарными бородавками, роль в патогенезе СК HPV 6,11,18 типов не подтвердилась.

Клинические и иммуногистохимические особенности себорейного кератоза у пациентов при динамическом наблюдении

В процессе динамического наблюдения с 2013 по 2017 год у всех пациентов было отмечено появление новых СК, однако множественные опухоли (более 20СК) возникли у 66 человек (22%) : достоверно чаще во II группе - 36% (54 пациента) к 8% (12 пациентов) в I группе ($p=0,00001$).

Появление множественных новых СК у пациентов было четко взаимосвязано с наличием сопутствующих нарушений углеводного обмена. Новые опухоли у пациентов с нарушениями углеводного обмена возникали толчкообразно, в течение 5-6 недель в большом количестве, после чего на несколько месяцев процесс затихал, что предположительно было связано с колебаниями глюкозы крови (гипергликемией и гиперинсулинемией). Очаги СК локализовались в крупных складках кожи, сочетались с множественными ФП в отличие от пациентов без нарушений углеводного обмена, для которых было характерно постепенное появление единичных новых опухолей, преимущественно на коже спины и лице, отмечалось усиление гиперкератоза и умеренный рост имеющихся СК.

У 37 пациентов, у которых отмечалось прогрессирование процесса в виде появления множественных опухолей, в СК наблюдалась гиперэкспрессия p63, p16 и EGFR, что не встречалось в СК лиц с отсутствием прогрессирования процесса.

Для выявления прогностических факторов, влияющих на появление множественных СК, мы провели корреляционный анализ и выявили факторы, коэффициент корреляции которых $>0,5$ (таблица 3).

Таблица 3 - Факторы, влияющие на прогрессирование себорейного кератоза (появления множественных новых опухолей)

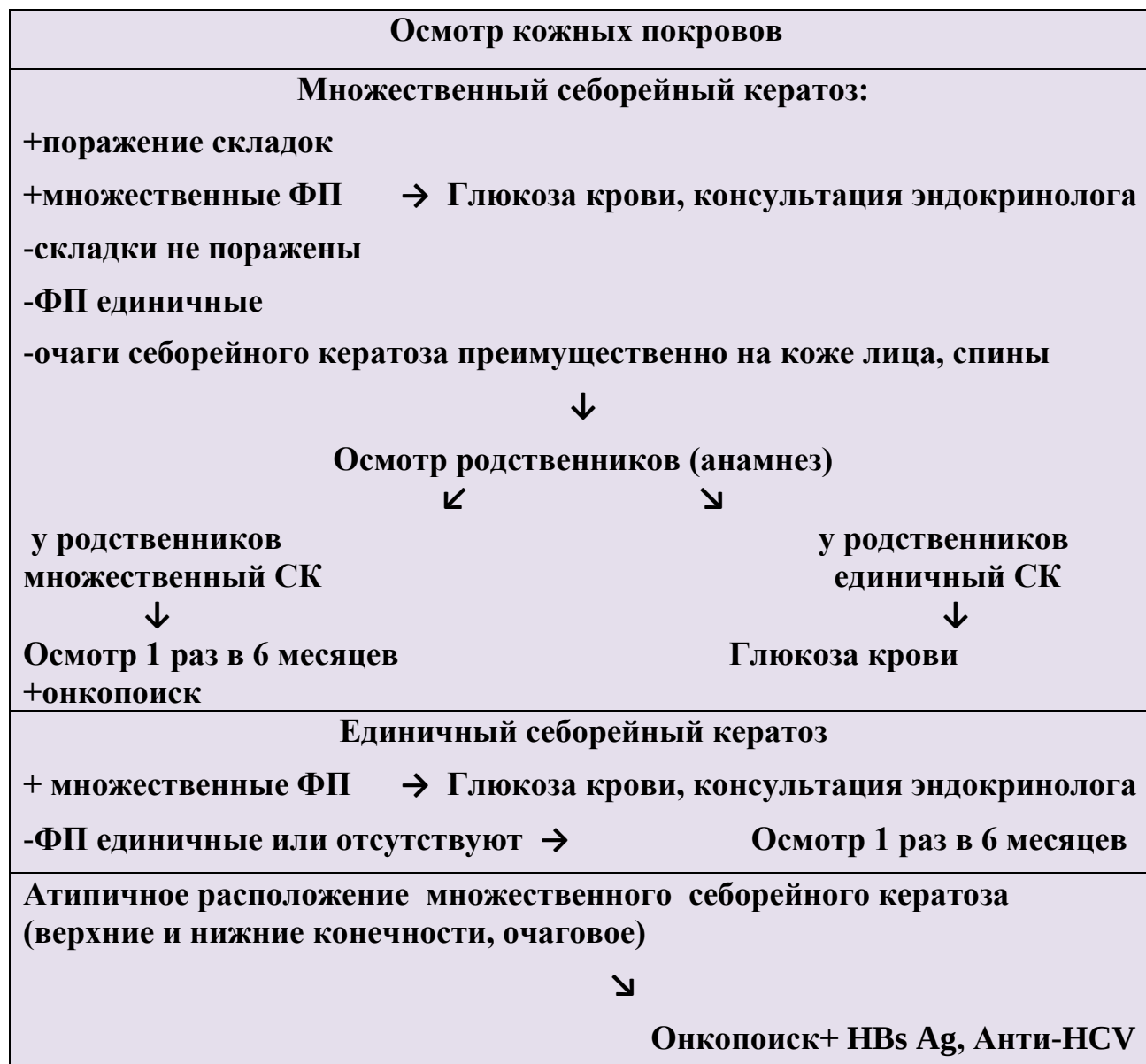
Факторы	Коэффициент корреляции	
	R	p
Кол-во ФП	0,61	0,0001
Эндокринные нарушения (СД+НТГ)	0,61	0,0001
Экспрессия p63	0,58	0,0001
Экспрессия EGFR	0,60	0,0001
Экспрессия p16	0,66	0,0001

Проведенный многофакторный логистический регрессионный анализ позволил получить значимую модель и формулу для вычисления индекса появления множественных СК. Для анализа практической ценности прогноза на основе вычисленного индекса нами была построена ROC-кривая, на которой мы определили точку отсечения между появлением и отсутствием множественных СК, равной 0, в которой наблюдается оптимальное соотношение чувствительности и специфичности (95,5% и 68,0% соответственно).

При значении индекса менее 0 частота появления множественных СК составила 3/162(1,9%), при значении 0 и более – 63/138(45,7%) ($p=0,00001$). При выборе границы индекса $=0$ чувствительность составила 95,5%, специфичность 67,9%, точность 74,0%, положительное прогностическое значение 45,7% и отрицательное прогностическое значение 98,1% при прогнозировании появления множественных СК.

Таким образом, проведенный статистический анализ подтвердил результаты клинических и морфологических исследований и позволил разработать алгоритм диагностики СК.

Алгоритм диагностики себорейного кератоза



Наиболее важным прогностическим фактором прогрессирования процесса является наличие у пациентов нарушений углеводного обмена и множественных ФП, а также гиперэкспрессия p16, p63 и EGFR в опухоли. Учитывая тот факт, что появление множественных СК в короткий промежуток времени в литературе трактуется почти исключительно как паранеопластический процесс (синдром Лезера-Трела) (Ponti G. et al, 2010), выявленные нами изменения клинической картины СК и их взаимосвязь с нарушениями углеводного обмена при отсутствии онкологической патологии у пациентов позволит врачам разных специальностей

заподозрить развитие инсулинорезистентности и СД 2 типа у пациентов на начальных этапах заболевания.

Заключение

Таким образом, СК является доброкачественной, первично- множественной эпителиальной опухолью кожи, этиологически гетерогенным заболеванием, с генетически детерминированным нарушением регуляции клеточного цикла, приводящим к преждевременному, локальному старению клеток, которое, в совокупности с нарастанием метаболических нарушений, приводит к нарушениям терминальной дифференцировки клеток.

В исследовании было выявлено, что при СК превалирует активность генов–супрессоров, в частности p16INK4a, в сочетании с низкой пролиферативной активностью клеток опухоли. «Старение» клеток и метаболические нарушения приводят к снижению их функциональной активности и утрате способности клеток СК реагировать на внешние митогенные и другие стимулирующие эффекты факторов роста, в них так же подавлена экспрессия сигнальных молекул и эндогенных пептидов, необходимых для пролиферации и дифференцировки. Гиперэкспрессия p63, p16 и EGFR в опухоли, достоверно преобладающая в СК при множественных опухолях, в сочетании с присутствием в клинической картине множественных ФП и нарушений углеводного обмена, является прогностическим фактором прогрессирования процесса.

Выводы

1. СК является гетерогенным, генетически детерминированным заболеванием, на клинические проявления которого влияют возраст и нарушения углеводного обмена. Множественный СК с преимущественным поражением крупных складок кожи, со склонностью к слиянию в сплошные линейные поверхностные очаги и в сочетании с множественными ФП достоверно чаще встречается у пациентов с СД 2 типа и НТГ ($p=0,00001$).
2. При акантотическом, клональном и аденоидном типе опухоли как при единичном, так и при множественном СК отсутствуют значимые различия в

проявлении основных гистологических признаков и экспрессии маркеров клеточного цикла - p53, p63, p16, p27 и маркеров пролиферации EGFR и Ki-67, что свидетельствует об их едином патогенезе и позволяет отнести их к типичному (обычному) СК.

3. Формирование СК с очагами плоскоклеточной дифференцировки (раздраженного типа) происходит при участии хронического УФ излучения ($p=0,00001$) и присутствия нейтрофильных лейкоцитов в строме опухоли. Характерно повышение экспрессии p53 (40%) и p27 (65,3%), инициирующих апоптоз, наряду с активацией супрессорной активности в виде гиперэкспрессии p16 (73,3%) и увеличения пролиферативной активности клеток (Ki-67- $8,5 \pm 4,8\%$), что свидетельствует о возможной малигнизации опухоли и позволяет на основании достоверных отличий выделить раздраженный тип в отдельную гистологическую форму СК.
4. Нарушение экспрессии маркера клеточного цикла p16 в виде расширения его экспрессии при единичном СК и гиперэкспрессии при множественном СК является ведущим в патогенезе опухоли и свидетельствует о старении клеток на молекулярном уровне. Достоверное преобладание при множественном СК гиперэкспрессии p16, EGFR и p63 ($p=0,00001$) отражает нарушения клеточного цикла в результате наступающих метаболических изменений в клетках опухоли, что приводит к прогрессированию заболевания.
5. Положительная экспрессия белка p53 преимущественно в СК, подверженных избыточному УФ излучению (в 92,1%), при наличии выраженного и умеренного воспаления ($p=0,00001$), а так же в сочетании с положительной экспрессией p27 в клетках опухоли свидетельствует об отсутствии нарушений транскрипционной активности p53 при СК.
6. На основании ИГХ-исследования с моноклональными антителами к Ki-67 выявлена низкая пролиферативная активность клеток СК (средняя величина $5,6 \pm 2,3\%$), достоверно отличающаяся от неизмененного эпидермиса (средняя величина $8,3 \pm 0,8\%$) ($p=0,023$). Корреляционной зависимости между уровнем пролиферации и степенью выраженности экспрессии в клетках опухоли EGFR у

лиц как с единичным, так и множественным СК не было выявлено, что свидетельствует о снижении ответа клеток на стимуляцию фактором роста в силу старения.

7. Количество меланоцитов при СК было достоверно снижено (0,7-5% клеток опухоли) при ИГХ- исследовании с моноклональными антителами к Melan A по сравнению с неизмененным эпидермисом (10,7%-14,3% клеток) ($p=0,001$). Учитывая наименьшее количество меланоцитов (менее 3% клеток опухоли) в наиболее пигментированных СК ($p=0,0003$), а так же отсутствие активации меланогенеза в опухоли под воздействием УФ излучения, в том числе в наиболее распространенных на подверженных солнцу местах раздраженных и аденоидных формах СК, свидетельствует о накоплении пигмента в связи с его замедленной утилизацией из-за старения и снижения метаболизма клеток опухоли.
8. Присутствие экспрессии HPV только в 2,3% СК в сочетании с отсутствием морфологических признаков вирусной инфекции свидетельствует об отсутствии значимой роли ВПЧ в патогенезе заболевания.
9. Прогностическим фактором прогрессирования заболевания являлась гиперэкспрессия p16, EGFR, и p63 в СК, которая достоверно чаще встречалась у пациентов с СД2 типа и НТГ (69,1%, 92,6%, 89,7%) ($p=0,00001$), что свидетельствует о роли хронической гипергликемии в нарушениях клеточного цикла и более быстром старении клеток.

Практические рекомендации

1. Многообразие клинических проявлений СК, возможность имитации им злокачественных новообразований кожи, высокий процент расхождений клинического и патогистологического диагнозов делает необходимым проведение гистологического исследования для верификации диагноза во всех случаях.
2. Наличие генетической отягощенности у лиц как с единичным, так и множественным СК диктует проведение генеалогического анализа с целью прогнозирования дальнейшего распространения процесса.

3. Выявление у пациента при осмотре множественных ФП, расположенных в одной или более анатомических областях, в сочетании с множественными СК, расположенными в виде линейных, сливающихся очагов в крупных складках кожи, свидетельствует о высокой вероятности наличия нарушений углеводного обмена и диктует необходимость консультации и обследования у эндокринолога.
4. В морфологическом заключении необходимо указывать на наличие или отсутствие в опухоли очагов плоскоклеточной дифференцировки, учитывая значение данного фактора для возможной малигнизации СК.
5. Применение панели из моноклональных антител к EGFR, p63 и p16 рекомендовано для пациентов с множественным СК и ФП для прогнозирования клинического течения заболевания в дальнейшем.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Александрова А.К.** Себорейный кератоз и вульгарные бородавки у пациента с вульгарным ихтиозом / А.К. Александрова, В.А. Смольяникова, А.С. Тертычный // **Кубанский научный медицинский вестник**. – 2014. – №4 (146). – С. 150-153.
2. **Александрова А.К.** Роль морфологического исследования в дифференциальной диагностике себорейного кератоза / А.К. Александрова, В.А. Смольяникова // **Материалы IV Московского Форума «Дерматовенерология и косметология: синтез науки и практики»**. – М., 2014. – С. 3.
3. **Александрова А.К.** Клинический случай сочетания меланомы и множественного себорейного кератоза у пациентки с гепатитом С / А.К. Александрова, В.А. Смольяникова, О.К. Александрова // **Материалы IV Московского Форума «Дерматовенерология и косметология: синтез науки и практики»**. – М., 2014. – С. 3-4.
4. **Александрова А.К.** Себорейный кератоз: современные представления о патогенезе / А.К. Александрова, В.А. Смольяникова // **Вестник дерматологии и венерологии**. – 2014. – Т.90. – №4. – С. 28-34

5. **Александрова А.К.** Инсулинорезистентность и себорейный кератоз /А.К. Александрова, В.А. Смольяникова // **Вестник дерматологии и венерологии.** – 2015. – Т91. – №5. – С. 73-78.
6. **Александрова А.К.** Разноцветный лишай и себорейный кератоз у пациента с инсулинорезистентностью /А.К. Александрова, В.А. Смольяникова, А.С. Тертычный // **Успехи медицинской микологии.** Том 14. Материалы III международного микологического форума. – М.: Нац. акад. микол., 2015. – С.14-15.
7. **Александрова А.К.** Взаимосвязь нарушений углеводного обмена и клинических проявлений себорейного кератоза/А.К. Александрова, В.А. Смольяникова / Материалы IX Российской научно-практической конференции «Санкт-Петербургские дерматологические чтения».– СПб.: Изд-во «Человек и его здоровье», 2015. – С.12-13.
8. **Александрова А.К.** Клинические особенности себорейного кератоза/А.К. Александрова, В.А. Смольяникова // Тезисы научных работ XV Всероссийского съезда дерматовенерологов и косметологов. – М., 2015. – С. 2
9. **Александрова А.К.** Современные представления о роли в клеточном цикле белков ингибиторов циклин-зависимых киназ p16 и p27/ А.К. Александрова, В.А. Смольяникова // **Кубанский научный медицинский вестник.** – 2016. – №1(156). – С. 7-10.
10. **Александрова А.К.** Особенности экспрессии белка p27 при разных формах себорейного кератоза /А.К. Александрова, Г.И. Суколин, В.А. Смольяникова // **Российский журнал кожных и венерических болезней.** – 2016. – Т.19. – №5. – С. 283-286.
11. **Александрова А.К.** Болезнь Хейли-Хейли и множественный себорейный кератоз на фоне инсулинорезистентности: клинический случай/ А.К. Александрова, В. А. Смольяникова// **Кубанский научный медицинский вестник.** – 2016. – № 5 (160). – С.158-161.

12. **Alexandrova AK.** Protein p16 role in seborrheic keratosis/ Alexandra K. Alexandrova, Vera A. Smolyannikova, Varvara A. Filatova, Olga K. Alexandrova // Our Dermatology online journal. – 2016. – Vol.7. – №4.- P.377-380.
13. **Alexandrova A.K.** Expression of Protein p16 in seborrheic keratosis / Alexandra K. Alexandrova, Vera A. Smolyannikova // Abstracts. Annual International Conference on Research, Education and Teaching by Russian Academics. – Athens, Greece, 2016. – P.17-18.
14. **Александрова А.К.** Особенности экспрессии p27 при разных гистологических типах себорейного кератоза. / А.К. Александрова, В.А.Смольяникова //Сборник тезисов X Юбилейной научно-практической конференции дерматовенерологов и косметологов «Санкт-Петербургские дерматологические чтения». – СПб.: Изд-во «Человек и его здоровье», 2016. – С.3.
15. **Александрова А.К.** Экспрессия p16 у пациентов с себорейным кератозом. / А.К.Александрова, В.А.Смольяникова, О.К.Александрова // Сборник тезисов научных работ XXXIII Научно-практической конференции с международным участием «Рахмановские чтения: от дерматологии А.И.Поспелова до наших дней-170лет». – М., 2016. – С.10-11.
16. **Александрова А.К.** Экспрессия рецепторов эпидермального фактора роста у пациентов с себорейным кератозом /А.К. Александрова, В.А. Смольяникова, Е.С.Фоминых // Сборник тезисов VI Межрегионального форума «Дерматовенерология и косметология: синтез науки и практики».–М.,2016.– С.35.
17. **Смольяникова В.А.** Экспрессия рецептора эпидермального фактора роста при наличии инсулинорезистентности у пациентов с себорейными кератомами / В.А. Смольяникова, **А.К. Александрова** // **Архив патологии.** – 2017. – Т. 79. – № 4. – С.18-21.
18. Smolyannikova VA. Multiple seborrheic keratosis in a patient with familial benign pemphigus/ V. A. Smolyannikova , **A.K. Alexandrova** // Our Dermatology online Journal. – 2017. – Vol. 8. – №3. – P.289-292.
19. **Александрова А.К.** Особенности экспрессии белка p53 при разных гистологических типах себорейного кератоза / А.К. Александрова, В.А.

Смолянникова// Сборник тезисов X Международного форума дерматовенерологов и косметологов. – М., 2017.- С.53.

20.**Alexandrova A.K.** Impact of insulin resistance on epidermal growth factor receptors in patients with seborrheic keratosis. / A. Alexandrova, V. Smolyannikova, V. Filatova // Abstracts of 29th European Congress of Pathology. – Virchows Archiv. – 2017. – Vol. 471 (Suppl 1). – PS 06-023.

21.**Александрова А.К.** Особенности экспрессии белка p63 при разных гистологических типах себорейного кератоза / А.К. Александрова, В.А. Смолянникова // Материалы V съезда Российского общества патологоанатомов с международным участием. – Челябинск, 2017.– С. 22.

22. **Александрова А.К.** Особенности течения себорейного кератоза у пациентов с нарушением углеводного обмена. /А.К. Александрова, В.А. Смолянникова // **Вестник дерматологии и венерологии.** – 2018. – Т. 94. – №5. – С. 33-38.

23. **Александрова А.К.** Себорейный кератоз как неизменный спутник старения. Современный взгляд на этиологию и патогенез / А.К. Александрова, В.А. Смолянникова, В.А. Филатова // Пространство и время. – 2018. – №1-2(31-32). – С. 315-321.

24. **Александрова А.К.** Клинические особенности множественного себорейного кератоза при нарушениях углеводного обмена / А.К. Александрова, В.А. Смолянникова, В.А. Филатова // Сборник тезисов XI Международного форума дерматовенерологов и косметологов. – М., 2018. – С.50.

25.Rudenko E. Protein p16 role in seborrheic keratosis / E. Rudenko, V. Smolyannikova, **A. Alexandrova**, V.Filatova // Abstracts of 30th European Congress of Pathology. – Virchows Archiv. – 2018. – Vol.473. (Suppl 1) – PS-07-014.

26. Смолянникова В.А. К вопросу о морфологических особенностях себорейного кератоза / В.А. Смолянникова, **Александрова А.К.** // **Клиническая и экспериментальная морфология.** – 2019. – Т. 8. – №2. – С. 21-27.

27.**Александрова А.К.** Особенности пигментации себорейного кератоза / А.К. Александрова, В.А. Смолянникова // **Вестник дерматологии и венерологии.** – 2019. – Т. 95. – №3. – С. 10-15.

28. **Александрова А.К.** Гиперэкспрессия белка p63 у пациентов с себорейным кератозом при сопутствующих нарушениях углеводного обмена /А.К. Александрова, В. А. Смольяникова// **Кубанский научный медицинский вестник** . – 2019. – Т. 26. – № 4. – С. 18-25.
29. **Александрова А.К.** К вопросу о пигментации себорейных кератом / А.К. Александрова, В.А. Смольяникова // Сборник тезисов XXXVI Научно-практической конференции с международным участием «Рахмановские чтения. Московской дерматологической школе 150лет: от истоков до современной дерматовенерологии и косметологии». – М., 2019. – С.18-19.
30. **Александрова А.К.** Морфологические особенности себорейного кератоза / А.К. Александрова // Сборник тезисов научной конференции с международным участием, посвященной 170-летию кафедры патологической анатомии им. академика А.И. Струкова ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М.Сеченова Минздрава России. – М.: Изд-во Сеченовского Университета, 2019г. – С. 10-11.
31. Смольяникова В.А. Особенности экспрессии Melan A при себорейном кератозе / В.А. Смольяникова, **А.К. Александрова** // Сборник научных трудов Всероссийской конференции, посвященная 160-летию кафедры патологической анатомии ВМедА им. С.М. Кирова. «Патологическая анатомия: традиции и современность». – СПб.: ВМедА, 2019. – С. 124-126.
32. Смольяникова В.А. Нарушение экспрессии белков-регуляторов клеточного цикла при себорейном кератозе / В.А. Смольяникова, **А.К. Александрова** // **Архив патологии**. – 2020. – Т.82. – № 2. – С.30-34.
33. **Александрова А.К.** К вопросу о клинических и иммуногистохимических особенностях инвертирующего фолликулярного кератоза /А.К.Александрова, В.А.Смольяникова. В.А. Филатова // **Клиническая дерматология и венерология**.- 2020.-Т.19.- №3.- С.312-316.