

Ю.Г. Коленко, О.В. Каленська

Імунногістохімічні маркери в діагностиці різних форм червоного плоского лишая слизової оболонки порожнини рота

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, м. Київ, Україна

Мета дослідження: вивчення проліферативної активності епітеліоцитів за експресією антигену Ki-67 у хворих з різними формами червоного плоского лишая слизової оболонки порожнини рота.

Матеріал і методи. Було проведено комплексне клініко-лабораторне обстеження 187 пацієнтів, які страждають на червоний плоский лишай, у віці від 25 до 70-ти років, з яких 71 (37,97 %) чоловіків і 116 (62,03 %) жінок. Було проведено патогістологічне та імуногістохімічне дослідження тканини слизової оболонки порожнини рота з вогнищ ураження.

Результати дослідження. При комплексному клініко-лабораторному дослідженні 187 пацієнтів у 103 (55,08 %) спостерігалась гіперкератозна й у 84 (44,92 %) ерозивно-виразкова форма червоного плоского лишая. При червоному плоскому лишая слизової оболонки порожнини рота відзначались порушення процесів зроговіння, проліферації та диференціювання епітеліоцитів. Проліферативний потенціал епітеліоцитів слизової оболонки порожнини рота, якщо судити за експресією антигену Ki-67, якісно й кількісно відрізнявся в пацієнтів контрольної групи (здорові особи без патологістологічних ознак запалення слизової оболонки щоки) і хворих на червоний плоский лишай слизової оболонки порожнини рота.

Висновок. Проведене імуногістохімічне дослідження проліферативної активності епітеліоцитів слизової оболонки порожнини рота виявило достовірне підвищення відсоткового вмісту Ki-67 позитивно забарвлених ядер у хворих із червоним плоским лишаєм слизової оболонки порожнини рота.

Ключові слова: червоний плоский лишай, проліферативна активність, епітеліоцити, антиген Ki-67, слизова оболонка порожнини рота.

Червоний плоский лишай слизової оболонки порожнини рота – це хронічне запальне захворювання із тривалим рецидивуючим перебігом, що має різноманітні клінічні форми з високим ризиком виникнення злоякісної пухлини. Серед захворювань слизової оболонки порожнини рота червоний плоский лишай зустрічається у 30–35 % випадків [1, 5, 9]. Частота ізольованого ураження слизової оболонки порожнини рота, за даними різних авторів, варіює від 17 до 77 % [4, 5, 9].

Червоний плоский лишай слизової оболонки порожнини рота є важливою проблемою клінічної дерматології та стоматології, що пов'язано з наявністю важких форм захворювання, хронічним перебігом, труднощами діагностики атипичних клінічних форм дерматозу, низькою ефективністю застосованої терапії [2, 3, 6]. Незважаючи на недостатню вивченість етіології захворювання й суперечливі відомості про поширеність цієї патології у структурі захворювань слизової оболонки порожнини рота, думки фахівців однастайні, що медико-соціальна значущість проблеми полягає в постійному зростанні кількості хворих, «омолодженні» страждаючих на це захворювання, схильності до перетворення на злоякісну форму [2, 8].

Відомо, що ерозивно-виразкова форма червоного плоского лишая є попередником плоскоклітинного раку слизової оболонки порожнини рота, який займає шосте місце за частотою у світі серед злоякісних пухлин усіх локалізацій [11, 12]. Незважаючи на простоту діагностики патологічних процесів зовнішньої локалізації, визначення форми захворювань слизової оболонки, засноване тільки на клінічному обстеженні, часто призводить до діагностичних помилок. Відсоток запущених форм раку слизової оболонки порожнини рота через діагностичні помилки, за даними різних авторів, сягає 58,4–70 % [12].

У зв'язку з цим прогностична оцінка факторів ризику малігнізації, ефективне виявлення ознак малігнізації і своєчасне лікування передракових захворювань слизової оболонки порожнини рота залишаються актуальним завданням стоматології.

Вирішення діагностичних труднощів більшість авторів бачать у допоміжних методах діагностики (цитологічне дослідження, хейлостоматоскопія, біомікроскопія, оптична когерентна томографія) [7]. Однак ці методи досить суб'єктивні, оскільки мають лише описовий характер якісних змін в уражених тканинах. Одним зі способів кількісної оцінки морфологічних змін є визначення імуногістохімічних маркерів.

Запровадження в повсякденну практику сучасних морфологічних методів верифікації пухлин дозволило значно покращити якість діагностики та лікування злоякісних новоутворень. Методичні можливості сучасної молекулярної онкології розширились, у даний час за допомогою імуногістохімічного дослідження можна встановити не тільки гістологічний діагноз пухлини, а й дати їй морфофункціональну характеристику з точки зору агресивності і прогнозу передракових уражень і вже розвинутого онкологічного захворювання [10, 13, 14].

Епітелій слизової оболонки ротової порожнини є locus praedilectionis формування ракових пухлин. Зовнішні фактори (травматичні вузли оклюзії, гострі краї реставрацій, невдалі ортопедичні конструкції, нераціональна індивідуальна гігієна ротової порожнини, запально-деструктивні ураження пародонту) поряд з генетичними (спадковими) факторами можуть відігравати визначальну роль у виникненні раку даної локалізації. У розвиток плоскоклітинного раку слизової оболонки порожнини рота можуть бути залучені пошкодження в механізмах контролю процесів гіперплазії епітелію і плоскоклітинної метаблазії.

Морфологічні особливості епітелію слизової оболонки порожнини рота у процесі малігнізації пов'язані зі зміною в наборі маркерів диференціювання (перш за все цитокератинового фенотипу епітеліального пласта), а також маркерів проліферації Ki-67.

Мета дослідження – вивчення проліферативної активності епітеліоцитів за експресією антигену Ki-67 у хворих з різними формами червоного плоского лишая слизової оболонки порожнини рота.

Матеріал і методи

Для досягнення поставленої мети було проведено комплексне клініко-лабораторне обстеження 187 пацієнтів, які страждають на червоний плоский лишай, у віці від 25 до 70-ти років, з яких 71 (37,97 %) чоловіків і 116 (62,03 %) жінок, які звернулися на кафедру терапевтичної стоматології у стоматологічний центр НМУ імені О.О. Богомольця із 2010 по 2015 р. Тривалість захворювання складала від 3 місяців до 9-ти років (у середньому $2,18 \pm 0,47$ року).

Із груп спостереження були виключені особи з важкими супутніми соматичними (серцево-судинні, ендокринні, нервові, імунологічні, психічні, онкологічні, захворювання крові) та інфекційними захворюваннями на стадії загострення патологічного процесу. Критерієм виключення були також вагітність і лактація, наявність захворювань слинних залоз, наркотична та алкогольна залежність, а також стадія ремісії червоного плоского лишая слизової оболонки порожнини рота.

На першому рівні діагностичного процесу значну допомогу надавали інтерактивне з'ясування скарг, а також анамнез захворювання й життя пацієнта. Даний етап клінічного обстеження допомагає не тільки припустити причину розвитку патології, а і правильно трактувати дані об'єктивного обстеження.

Клінічне обстеження хворих на червоний плоский лишай слизової оболонки порожнини рота проводили відповідно до рекомендацій ВООЗ, традиційно починаючи зі з'ясування скарг (біль, відчуття печіння, сухості, дискомфорту в ротовій порожнині, наявність парестезій й т. д.), їх характеру, інтенсивності, тривалості. Інтерактивний контакт з пацієнтом припускав кількісний психометричний аналіз його суб'єктивних відчуттів (скарг) на основі використання візуально-аналогових шкал. Так, наприклад, для отримання суб'єктивного враження пацієнта про вираженість більшого симптому пропонувалось оцінити біль (спонтанний або індукований прийомом їжі) у балах від 0 до 4–5.

Далі з'ясовували анамнестичні дані: час появи перших симптомів захворювання, його прояви, причини, які, на думку хворого, сприяли виникненню захворювання (стресові фактори, прийом медикаментозних препаратів, перенесені захворювання, стоматологічні втручання). Звертали увагу на тривалість захворювання, характер його перебігу, частоту рецидивів.

При зборі анамнезу життя приділяли увагу наявності супутньої патології та перенесеним захворюванням, проявам алергічних реакцій, лікарській терапії в анамнезі й у даний час, шкідливим звичкам, особливостям професійної діяльності, району проживання, сімейному стану.

При огляді звертали увагу на зовнішній вигляд хворого, ретельно оглядали шкірні покриви (обличчя, область передпліччя, гомілок і т. ін.), оцінювали колір, зволоженість, наявність патологічних елементів (папул, ерозій, екскоріацій тощо), вивчали стан нігтьових пластин, волосся, кон'юнктиви очей. При огляді особи особливу увагу приділяли стану червоної облямівки губ, її кольору, ступеню зволоженості, чіткості контурів лінії Клейна, наявності патологічних елементів, оглядали кути рота на наявність тріщин, заїд, кірок, нальоту.

Про огляді ротової порожнини звертали увагу на її гігієнічний стан, стан твердих тканин зубів і пародонту, наявність ортопедичні конструкції (вид протеза, його повноцінність, у разі незнімних протезів – вид сплаву, наявність корозії).

Особливу увагу приділяли оцінці стану слизової оболонки порожнини рота, відзначали її колір, зволоженість, рельєф поверхні, наявність набряклості, патологічних елементів ураження. Детально оцінювали елементи ураження, їх локалізацію, кількість, форму, розміри, чіткість контурів, виразність перифокального запалення. У разі виразкових елементів оцінювали їх глибину, стан дна, країв, наявність інфільтрації в основі. Уточнювали можливість травматизації слизової гострими краями зубів, протезами, контакти з металевими конструкціями в ротовій порожнині. При візуальному огляді звертали увагу не тільки на маніфестні зміни стану слизової оболонки порожнини рота (ерозії, виразки, пухирці тощо), а й на початкові форми її ураження (тонкі зміни рельєфу, сухість, утрата блиску, помутніння слизової та ін.).

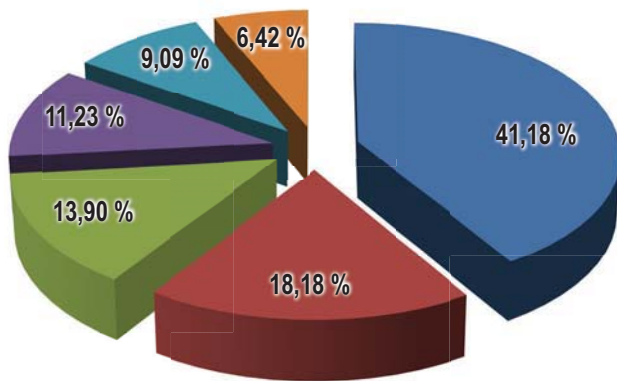
Для патогістологічного та імуногістохімічного дослідження тканини фіксували в 10 %-у нейтральному формаліні (рН = 7,4). Після його проведення на гістопроекторі заливали в парафін з температурою плавлення 54°C для гістологічного та імуногістохімічного дослідження (ІГХ). Серійні зрізи товщиною 5 мкм розміщували на скляних пластинках, укривих полі-L-лізіном. Виявлення тканинних антигенів проводили за допомогою моноклональних антитіл мишей до K8 (TS1, «Thermoscientific») і Ki-67 (MM1, «Thermoscientific»). Виявлення імунних комплексів проводили за допомогою системи детекції UltraVision Quanto Detecton System HRP («Thermoscientific»), зрізи дофарбовували гематоксиліном Майєра. Індекс проліферації за Ki-67 (ІП Ki-67) визначали відношенням кількості імунореактивних ядер клітин до загальної кількості ядер у відсотках. Дані маркери виявляли у ста клітинах чотирьох шарів епітелію (першого – базального у клітинах, що безпосередньо прилягають до базальної мембрани, і трьох наступних). Оцінку показників здійснювали у відповідних ділянках тканин. Підрахунок клітин проводили при збільшенні в 400 разів.

Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою програми Statistica 6.0. стандартними методами. Ураховуючи ненормальний розподіл отриманих статистичних показників, порівняння двох незалежних груп здійснювали непараметричним методом за допомогою U-критерію Манна-Уїтні. Достовірними вважать відмінності середніх при рівні статистичної значущості $p < 0,01$.

Результати дослідження

При комплексному клініко-лабораторному дослідженні 187 пацієнтів із клінічним діагнозом червоного плоского лишая слизової оболонки порожнини рота у 103 (55,08 %) спостерігалась гіперкератозна й у 84 (44,92 %) ерозивно-виразкова форма червоного плоского лишая. При цьому найчастішою була локалізація на слизовій оболонці щік – у 77-и (41,18 %) хворих. У 34 (18,18 %) і 26 (13,90 %) хворих відзначали локалізацію в ретромолярному просторі й на слизовій спинки та бічних поверхнях язика. Слизова оболонка твердого та м'якого піднебіння (21 хворий – 11,23 %), губ (17 хворих – 9,09 %) і дно ротової порожнини (12 хворих – 4,5 %) були уражені значно рідше. У 33 (17,65 %) пацієнтів висипання виявлялись одночасно в кількох ділянках (найчастіше в ділянці щік, ретромолярному просторі та на язичці) (рис. 1).

Площа осередків ураження на слизовій оболонці щік складала в середньому $14,6 \text{ мм}^2$, на слизовій оболонці бокових поверхнях язика – $8,2 \text{ мм}^2$, на слизовій оболонці



- локалізація на слизовій оболонці щік
- локалізація в ретромолярному просторі
- локалізація на слизовій спинки та бокових поверхнях язика
- слизова оболонка твердого та м'якого піднебіння
- слизова оболонка губи
- дно порожнини рота

Рис. 1. Розподіл пацієнтів за локалізацією вогнищ ураження червоного плоского лишая на слизовій оболонці порожнини рота.

ретромолярного простору – 5,8 мм², на слизовій оболонці твердого піднебіння – 12,3 мм² і на слизовій оболонці альвеолярного відростка – 15,8 мм².

При червоному плоскому лишая слизової оболонки порожнини рота відзначались порушення процесів зроговіння, проліферації і диференціювання епітеліоцитів. Проліферативний потенціал епітеліоцитів слизової оболонки порожнини рота, якщо судити за експресією антигену Ki-67, якісно й кількісно відрізнявся в пацієнтів контрольної групи (здорові особи без патологогістологічних ознак запалення слизової оболонки щоки) і хворих на червоний плоский лишай слизової оболонки порожнини рота. Аналіз результатів виявив достовірно більш високий вміст мічених Ki-67 клітин в епітеліальних шарах з осередків ураження слизової оболонки у хворих на червоний плоский лишай слизової оболонки порожнини рота двох форм (типової та ерозивно-виразкової) порівняно з контрольною групою. Реєструвались індивідуальні відмінності цитоархітекτονіки та регенеративного потенціалу епітеліоцитів слизової оболонки порожнини рота. У незмінній слизовій оболонці позитивно забарвлені Ki-67 ядра виявлялись тільки в базальних епітеліоцитах генеративного шару з частотою $17,32 \pm 0,39 \%$. У хворих на червоний плоский лишай слизової оболонки порожнини рота індекс мічених клітин був достовірно у 2,9 рази вище і становив $44,8 \pm 1,1 \%$ ($p < 0,05$). Слід зазначити також «розмивання» або розширення меж проліферативного пулу епітеліоцитів у хворих на червоний плоский лишай слизової оболонки порожнини рота, тобто мічені клітини зустрічались у більш високих шарах, зокрема в шипуватому шарі.

Установлено відмінності у значенні показників індексу мічених ядер при порівнянні типової й ерозивно-виразкової форм червоного плоского лишая слизової оболонки порожнини рота (рис. 2, 3).

Найбільша проліферативна активність в епітелії осередків ураження слизової оболонки щоки виявлена у хворих з ерозивно-виразковою формою ($51,24 \pm 1,29 \%$) на відміну від аналогічних показників при типовій формі червоного плоского лишая слизової оболонки порожнини рота ($37,64 \pm 1,36 \%$), виявлені відмінності були достовірно у 3,3 і 2,6 рази ($p < 0,05$) вище порівняно із групою здорових осіб ($13,67 \pm 0,84 \%$) відповідно.

Таким чином, у хворих з червоним плоским лишаєм слизової оболонки порожнини рота до початку лікування морфологічно відзначалось порушення процесів зроговіння, проліферації та диференціювання епітеліоцитів. Можна припустити, що частота виявлення і ступінь підвищення вмісту Ki-67 позитивно забарвлених ядер в епітелії слизової оболонки порожнини рота пов'язані із клінічною формою даної патології.

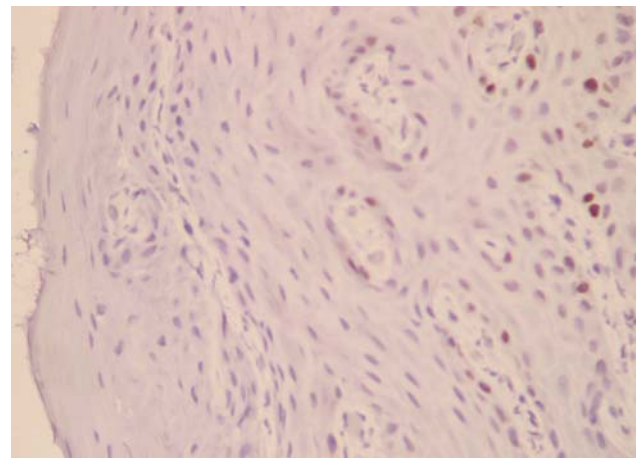


Рис. 2. Біоптат слизової оболонки хворого К. **Діагноз:** гіперкератозна форма червоного плоского лишая слизової оболонки порожнини рота. **Проліферативна активність клітин епітелію згідно з експресією ядерного білка Ki-67 при типовій формі червоного плоского лишая слизової оболонки порожнини рота. Забарвлення ДАБ-гематоксіліном Майєра. Зб.: об. 20, ок. 10.**

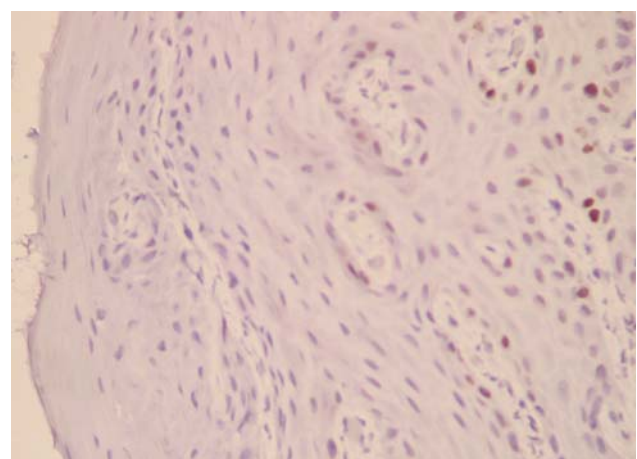


Рис. 3. Біоптат слизової оболонки хворого Т. **Діагноз:** ерозивно-виразкова форма червоного плоского лишая слизової оболонки порожнини рота. **Проліферативна активність клітин епітелію згідно з експресією ядерного білка Ki-67 при ерозивно-виразковій формі червоного плоского лишая слизової оболонки порожнини рота. Забарвлення ДАБ-гематоксіліном Майєра. Зб.: об. 20, ок. 10.**

Висновок

Проведене імуногістохімічне дослідження проліферативної активності епітеліоцитів слизової оболонки порожнини рота виявило достовірне підвищення відсоткового вмісту Ki-67 позитивно забарвлених ядер у хворих із червоним плоским лишаям слизової оболонки порожнини рота.

Установлено відмінності в інтенсивності мічення ядер епітеліоцитів Ki-67 залежно від клінічної форми червоного плоского лишая слизової оболонки порожнини рота: вищий рівень експресії Ki-67 в епітелії осередків ураження слизової оболонки виявлено при ерозивно-виразковій формі захворювання.

ЛІТЕРАТУРА

1. Белева Н.С. Совершенствование диагностики и комплексного лечения в системе диспансеризации больных красным плоским лишаям слизистой оболочки полости рта: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Пермь, 2010. – 26 с.
2. Гилева, О.С., Либик Т.В., Позднякова А.А. Предраковые заболевания в структуре патологии слизистой оболочки рта // Проблемы стоматологии. – 2013. – №2. – С. 3–9.
3. Самойлова О.П. Оценка эффективности местной терапии в комплексном лечении больных красным плоским лишаям слизистой оболочки полости рта на фоне первичного гипотиреоза: Автореф. дис. канд. мед. наук. – Иркутск, 2008. – 22 с.
4. Попова Л.Г., Петрова Т.Г., Кожевникова В.Ф. Комплексная терапия предраковых форм красного плоского лишая // Современные стоматологические технологии: сборник научных трудов 9-й (юбилейной) научно-практической конференции с международным участием, посвященной 20-летию стоматологического факультета АГМУ. – Барнаул: Издательство Алтайск. ун-та, 2010. – С. 209–213.
5. Anuradha C.H., Reddy B.V., Nandan S.R., Kumar S.R. Oral lichen planus // A review. N-Y. State Dent J. – 2008. – Vol. 74, № 4. – P. 66–68.
6. Au J., Patel D., Campbell J.H. Oral lichen planus // Oral Maxillofacial Surg. Clin. N. Am. – 2013. – Vol. 25. – P.93–100.
7. Auluck A., Pai K.M. Oral lichenoid lesions // Br. Dent. J. – 2005. – Vol. 199, № 4. – P. 188.
8. Carrozzo M., Thorpe R. Oral lichen planus: a review // Minerva Stomatol. – 2009. – Vol. 58, № 10. – P. 519–537.
9. Jaafari-Ashkavandi Z. Oral mucocutaneous diseases: clinicopathologic analysis and malignant transformation // J. Craniofac. Surg. – 2011. – Vol. 22, № 3. – P. 949–951.
10. Juneja M. Histochemical analysis of pathological alterations in oral lichen planus and oral lichenoid lesions // J. Oral Sci. – 2006. – N 4. – P. 185.
11. Laeijendecker R., Van Joost T., Kuizinga M.C. et al. Premalignant nature of oral lichen planus // Acta Derm. Venereol. – 2005. – Vol. 85, № 6. – P. 516–520.
12. Liu Y., Messadi D.V., Wu H., Hu S. Oral lichen planus is a unique disease model for studying chronic inflammation and oral cancer // Med. Hypotheses. – 2010. – Vol. 75, № 6. – P. 492–494.
13. Mattila R., Alanen K., Syrjinen S. Immunohistochemical study on topoisomerase II alpha, Ki-67 and cytokeratin-19 in oral lichen planus lesions // Arch. Dermatol. Res. – 2007. – Vol. 298, № 8. – P. 381–388.
14. Taniguchi Y. et al. Epithelial cell proliferation in oral lichen planus // Cell Prolif. – 2002. – Vol. 35, № 1. – P. 103–109.

Иммуногистохимические маркеры в диагностике различных форм красного плоского лишая слизистой оболочки полости рта

Ю.Г. Коленко, О.В. Каленская

Цель исследования: изучение пролиферативной активности эпителиоцитов по экспрессии антигена Ki-67 у больных с различными формами красного плоского лишая слизистой оболочки полости рта.

Материал и методы. Было проведено комплексное клинично-лабораторное обследование 187 пациентов, страдающих красным плоским лишаям, в возрасте от 25 до 70-ти лет, из которых 71 (37,97 %) мужчина и 116 (62,03 %) женщин. Было проведено патогистологическое и иммуногистохимическое исследование ткани слизистой оболочки полости рта из очагов поражения.

Результаты исследования. При комплексном клинично-лабораторном исследовании 187 пациентов у 103 (55,08 %) наблюдалась гиперкератозная и у 84 (44,92 %) эрозивно-язвенная форма красного плоского лишая. При красном плоском лишаям слизистой оболочки полости рта отмечались нарушения процессов ороговения, пролиферации и дифференцирования эпителиоцитов. Проллиферативный потенциал эпителиоцитов слизистой оболочки полости рта, если судить по экспрессии антигена Ki-67, качественно и количественно отличался у пациентов контрольной группы (здоровые лица без патологических признаков воспаления слизистой оболочки щеки) и пациентов с красным плоским лишаям слизистой оболочки полости рта.

Вывод. Проведенное иммуногистохимическое исследование пролиферативной активности эпителиоцитов слизистой оболочки полости рта выявило достоверное повышение процентного содержания Ki-67 положительно окрашенных ядер у больных с красным плоским лишаям слизистой оболочки полости рта.

Ключевые слова: красный плоский лишай, пролиферативная активность, эпителиоциты, антиген Ki-67, слизистая оболочка полости рта.

Immunohistochemical markers in the diagnosis of different forms lichen ruber planus of the oral mucosa

Y. Kolenko, O. Kalenskaya

Aim: to study the proliferative activity of epithelial cells on the Ki-67 antigen expression in patients with different forms of lichen ruber planus of the oral mucosa.

Material and methods. It was carried out a comprehensive clinical and laboratory examination of 187 patients with lichen ruber planus in age from 25 to 70 years, of which 71 (37.97 %) male and 116 (62.03 %) women. It was conducted histopathological and immunohistochemical study of mucosal tissues from oral cavity lesions.

Results of the study. In complex clinical and laboratory study of 187 patients, 103 (55.08 %) was observed hyperkeratotic and 84 (44.92 %) erosive and ulcerative form of lichen ruber planus. Disturbances of keratinization processes, proliferation and differentiation of epithelial cells were revealed from lichen ruber planus of the oral mucosa. The proliferative capacity of epithelial cells of the oral mucosa, as measured by the expression of Ki-67 antigen, both qualitatively and quantitatively different from the control group (healthy persons), and patients with lichen ruber planus of the oral mucosa.

Conclusion. Immunohistochemical study of the proliferative activity of epithelial cells of the oral mucosa showed significant increase in the percentage of Ki-67 content of positively stained nuclei in patients with lichen ruber planus of the oral mucosa.

Key words: lichen ruber planus, proliferative activity, epithelial cells, antigen Ki-67, oral mucosa.

Ю.Г. Коленко – Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, м. Київ, Україна.

О.В. Каленська – канд. мед. наук, завідувач патологоанатомічного відділення КЛ «Феофанія» ДУС.