

## Оптимізація комплексної терапії лейкоплакії слизової оболонки порожнини рота, зумовленої вірусом папіломи людини

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

**Мета:** обґрунтувати, розробити та оцінити алгоритм лікування лейкоплакії слизової оболонки порожнини рота при наявності антигенів папіломавірусу людини високого ризику HPV 16.

**Матеріали та методи.** Були досліджені біоптати слизової оболонки порожнини рота 82-х пацієнтів з лейкоплакією, у тому числі 42 жінок і 40 чоловіків. Середній вік хворих склав 62 роки. При проведенні гістологічного дослідження контролем слугував незмінений епітелій, який брали із прилеглих до лейкоплакії ділянок слизової. Виявлення тканинних антигенів здійснювали за допомогою поліклональних антитіл кроля до вірусу папіломи людини 16-го типу. Лікування: основна група — 15 пацієнтів з лейкоплакією слизової оболонки порожнини рота при наявності антигенів папіломавірусу людини високого ризику HPV 16, які лікувалися розробленим лікувально-профілактичним комплексом; контрольна група — 10 пацієнтів з лейкоплакією слизової оболонки порожнини рота при наявності антигенів папіломавірусу людини високого ризику HPV 16, які лікувалися за загальноприйнятою методикою.

**Результати.** У результаті ІГХ-дослідження епітелію слизової оболонки порожнини рота виявило особливості експресії білків, що характеризують проліферативні процеси та вірусні антигени при різних морфологічних проявах лейкоплакії, які показують реплікацію вірусу папіломи людини у проліферуючих клітинах багатоядерного плоского епітелію.

Розроблено лікувально-профілактичний комплекс для комплексної терапії лейкоплакії слизової оболонки порожнини рота при наявності антигенів папіломавірусу людини високого ризику HPV 16, який має високу ефективність.

**Висновок.** Отримані результати свідчать, що запропонований лікувально-профілактичний комплекс має високу ефективність при лікуванні лейкоплакії слизової оболонки порожнини рота при наявності антигенів папіломавірусу людини високого ризику HPV 16. Після його застосування післяопераційний період протікав без ускладнень, більш комфортно для оперованих пацієнтів, з малою вираженістю болювого синдрому й колатерального набряку та показники експресії білка P16<sup>INK4a</sup> і антигенів HPV16 значно знизилися. Усе це дозволяє вважати перспективним подальше впровадження даного лікувально-профілактичного комплексу у стоматологічну практику.

**Ключові слова:** лейкоплакія, слизова оболонка порожнини рота, імуногістохімія, вірус папіломи людини 16-го типу, лікувально-профілактичний комплекс

Незважаючи на значні успіхи у вивченні етіопатогенезу передракових захворювань слизової оболонки порожнини рота й оптимізацію профілактичних заходів, рак слизової оболонки порожнини рота, як і раніше, залишається глобальною актуальною проблемою, тому що є одним з частих захворювань в онкопатології [1, 2]. За своєю поширеністю він є шостим найпоширенішим видом раку у світі, й, на жаль, його частота зростає: річний приріст захворюваності становить приблизно 275000 випадків на рік [2]. Реальною профілактикою раку слизової оболонки порожнини рота є своєчасне виявлення та лікування передракових захворювань. Тому до постійних проблем практичної стоматології належать питання ретельного відбору хворих з підвищеним ризиком виникнення раку й контролю їх стану.

Загальновідомим є той факт, що протягом багатьох років таке захворювання слизової оболонки порожнини рота, як лейкоплакія, є тлом, на якому можливий розвиток раку [3, 4]. Лейкоплакія в даний час займає особливе місце у структурі захворювань слизової оболонки порожнини рота. Для вибору правильної тактики лікування цього захворювання необхідно знати та розуміти етіологічні та патогенетичні аспекти виникнення 1 перебігу цього процесу [5].

Особливе значення в індукції канцерогенезу надається вірусній інфекції, і ключовим вважається вірус папіломи людини, що має найбільший онкогенний потенціал [6–8]. Саме тому важливим етапом профілактики злоякісних новоутворень слизової оболонки порожнини рота є рання діагностика та ефективне лікування лейкоплакії при наявності антигенів папіломавірусу людини

високого ризику HPV 16 [9]. Таким чином, актуальність даної проблеми визначається перш за все тим, що не існує алгоритму діагностики та терапії лейкоплакії слизової оболонки порожнини рота при наявності антигенів папіломавірусу людини високого ризику HPV 16, що призводить до прогресу захворювання й розвитку раку слизової оболонки порожнини рота.

**Мета** дослідження – обґрунтувати, розробити та оцінити алгоритм лікування лейкоплакії слизової оболонки порожнини рота при наявності антигенів папіломавірусу людини високого ризику HPV 16.

### Матеріали та методи

Були досліджені біоптати слизової оболонки порожнини рота 82-х пацієнтів з лейкоплакією, у тому числі 42 жінок і 40 чоловіків. Середній вік хворих склав 62 роки. При проведенні гістологічного дослідження контролем слугував незмінений епітелій, який брали із прилеглих до лейкоплакії ділянок слизової. Гістологічну оцінку досліджуваного матеріалу проводили згідно із класифікацією ВООЗ (2005).

Матеріал фіксували в 10 % нейтральному формаліні (рН = 7,4) і після проведення на гістопроекторі зразки заливали в парафін з температурою плавлення 54°C. Для гістологічного та імуногістохімічного (ІГХ) дослідження готували серійні зрізи товщиною 5 мкм, які поміщали на скельця, укріті полі-L-лізином. Виявлення тканинних антигенів здійснювали за допомогою поліклональних антитіл кроля до вірусу папіломи людини 16-го типу (Thermoscientific) у розведенні 1:400 і моноклональних антитіл P16<sup>INK4a</sup> (clon EPR1473, EPITOMICS) – 1:200

і Ki-67 (Thermoscientific) – 1:100. Виявлення імунних комплексів проводили за допомогою системи детекції «UltraVision Quanto Detecton System HRP» (Thermoscientific), для чого зрізи дофарбовували гематооксилюном Майєра. Реакцію до вірусу папіломи людини 16-го типу та P16<sup>INK4a</sup> оцінювали якісно за клітинними зонами: у базальному, остистому й шипуватому клітинних шарах, при плоскоклітинному раку оцінювали також периферійну та центральну зони розподілу клітин пухлини. Індекс проліферації Ki-67 (ІП Ki-67) оцінювали також за клітинними зонами: визначали відношення кількості імунореактивних ядер клітин до загального числа ядер (у відсотках). Оцінку показників здійснювали у відповідних ділянках тканин. Підрахунок клітин проводили при збільшенні в 400 разів.

Лікування: основна група – 15 пацієнтів з лейкоплакією слизової оболонки порожнини рота при наявності антигенів папіломавірусу людини високого ризику HPV 16, які лікувались розробленим лікувально-профілактичним комплексом; контрольна група – 10 пацієнтів з лейкоплакією слизової оболонки порожнини рота при наявності антигенів папіломавірусу людини високого ризику HPV 16, які лікувались за загальноприйнятого методикою.

Усім пацієнтам з різними формами лейкоплакії було рекомендовано і проведено:

- професійну гігієну з обов'язковим навчанням і контролем гігієни протягом усього лікування, інтердентальна гігієна;
- санацію ротової порожнини (заміна старих та амальгамових пломб; видалення зубів, що не підлягають подальшому лікуванню й відновленню; зішліфування гострих країв зубів, а також раціональне протезування з використанням однорідних металів);
- усунення шкідливих звичок;
- функціональне виборче пришліфування;
- дієтотерапія (обмеження у прийомі гострої, гарячої, солоної, кислої їжі);
- консультацію лікарів інших спеціальностей з подальшим лікуванням за необхідності;
- обов'язковою умовою було взяття біопсії для гістологічного й імуногістохімічного дослідження.

Хірургічне лікування проводилося з використанням аргоноплазмової коагуляції. Перед хірургічним втручанням пацієнту рекомендували полоскати ротову порожнину розчином «Тантум Верде» протягом однієї хвилини.

**Загальне лікування:** прийом препарату «Ізопринозин» по дві таблетки три рази на день протягом десяти днів, прийом полівітамінного комплексу «Піковіт Форте» по одній таблетці два рази на день. При можливих болях відчуттях рекомендували прийом препарату «Кетарол» у дозі 10 мг одноразово.

Ізопринозин (інозіплекс) – препарат, який має імуностимулюючу і протівірусну дію. Ізопринозин здатний збільшувати сумарну кількість Т-лімфоцитів, а також підвищувати вироблення Т-лімфоцитами інтерлейкіну-2, Т-хелперів і клітин НК, покращувати співвідношення хелперів/супресорів. Ізопринозин має здатність блокувати розмноження вірусів за рахунок пошкодження генетичного апарату вірусних частинок, стимулювати активність макрофагів, активувати утворення цитокінів і проліферацію лімфоцитів.

### Результати дослідження

ІГХ-дослідження епітелію слизової оболонки порожнини рота виявило особливості експресії білків, що характеризують проліферативні процеси та вірусні антигени при різних морфологічних проявах лейкоплакії, які показують реплікацію вірусу папіломи людини у проліферуючих клітинах багатошарового плоского епітелію.

Проведені дослідження показали, що при різних морфологічних варіантах лейкоплакії від гіперплазії з гіперкератозом до плоскоклітинного раку в епітеліальних клітинах багатошарового плоского епітелію виявляються антигени вірусу папіломи людини високого онкогенного ризику HPV16 і білки, асоційовані з HPV (P16<sup>INK4a</sup>). Білок P16<sup>INK4a</sup> гальмує формування пухлин за рахунок блокування циклінозалежної кинази (cdk4) за рахунок блокування cdk4- і cdk6-викликаного pRb фосфорилування, що призводить до гальмування E2F-залежної транскрипції, і здійснення клітинного циклу від точки порівняння G1 до S [10]. Пригнічення експресії гену P16<sup>INK4a</sup> за рахунок гіперметилування або мутації часто спостерігають у більшості ракових клітинних ліній і первинних пухлин людини. Таким чином, підвищена експресія гену P16<sup>INK4a</sup> є непрямим маркером HPV, що відображає порушення механізмів, які контролюють клітинну проліферацію і характеризує персистенція інфекції з високим ризиком розвитку неоплазії.

При різних морфологічних варіантах лейкоплакії в епітеліальних клітинах багатошарового плоского епітелію слизової оболонки рота виявлена підвищена проліферативна активність клітин з експресією у клітинних ядрах білка Ki-67 і маркерів, які безпосередньо (HPV16) або побічно (P16<sup>INK4a</sup>) пов'язані з вірусом папіломи людини.

Виходячи із клінічних і лабораторних проявів лейкоплакії слизової оболонки порожнини рота при наявності антигенів папіломавірусу людини високого ризику HPV 16, було розроблено алгоритм лікування та проліковано основну групу пацієнтів.

При використанні запропонованого лікувально-профілактичного комплексу вже на 1-у добу після операції відсутність больового синдрому відзначали 12 (80,0 %) пацієнтів основної групи. І тільки три (30,0 %) пацієнти контрольної групи фіксували відсутність болю на 3-й день після операції. Причому, як правило, скарги на біль були в пацієнтів при локалізації елементів у ділянці рухомої частини слизової оболонки присінку ротової порожнини з поширенням на перехідну складку. Незважаючи на те що всім хворим в післяопераційний період було рекомендовано уникати прийому подразнюючої та твердої їжі, саме цей факт слугував у більшості випадків причиною інтенсивного больового синдрому (рис. 1).

У 12 (80,0 %) пацієнтів основної групи вже на 3-ю добу в зоні оперативного втручання спостерігалася тільки легка гіперемія, а в контрольній групі – в одного (10,0 %). На 5-у добу у 13 (86,67 %) пацієнтів основної групи слизова оболонка в зоні оперативного втручання набувала звичайне забарвлення, а в контрольній – у трьох (30,0 %) пацієнтів (рис. 2).

У шістьох (60,0 %) пацієнтів контрольної групи на 3-ю добу після операції спостерігалася значна кількість фібринозного нальоту на поверхні рани, а в 14 (93,33 %)

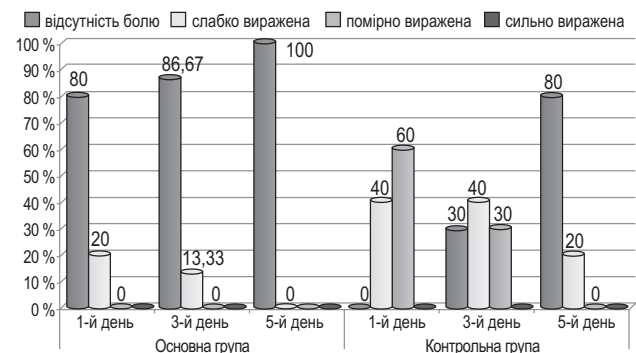


Рис. 1. Розподіл пацієнтів основної та контрольної груп спостереження залежно від ступеня вираженості больового синдрому.



Рис. 2. Характеристика стану слизової оболонки ротової порожнини в зоні оперативного втручання пацієнтів основної та контрольної груп спостереження.

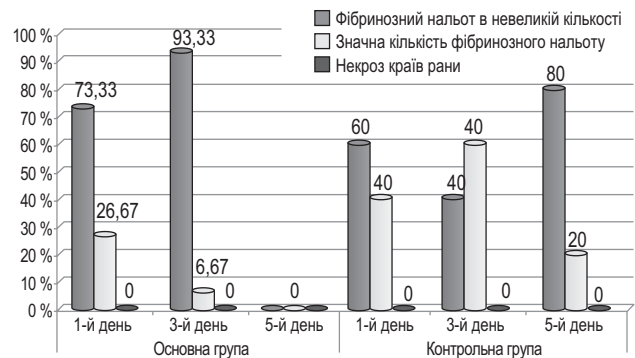


Рис. 3. Розподіл пацієнтів основної та контрольної груп спостереження залежно від стану поверхні рани.

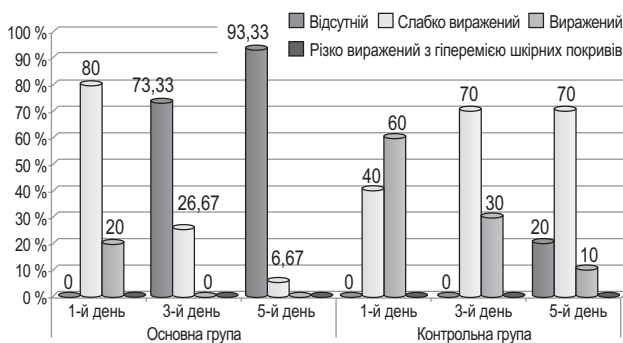


Рис. 4. Характеристика колатерального набряку оточуючих м'яких тканин пацієнтів основної та контрольної груп спостереження.

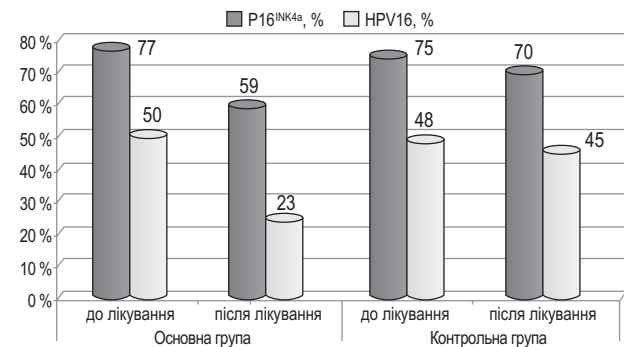


Рис. 5. Показники експресії білка P16<sup>INK4a</sup> та антигенів HPV16 в епітелії пацієнтів контрольної й основної груп після лікування.

пацієнтів основної групи в цей самий час – фібринозний наліт в невеликій кількості. На 5-у добу в усіх пацієнтів основної групи відбулась епітелізація (рис. 3).

Слабо виражений колатеральний набряк на 1-й день після операції висічення слизової оболонки порожнини рота визначався у 12 (80,0 %) пацієнтів. При цьому в контрольній групі – у чотирьох (40,0 %) пацієнтів. На 3-й день слабо виражений колатеральний набряк зберігався тільки в чотирьох (26,67 %) пацієнтів основної групи, а в 11-ти (73,33 %) пацієнтів він повністю зник. На 5-й день у 14-ти (93,33 %) пацієнтів основної групи явища колатерального набряку не встановлені, а в контрольній групі тільки у двох (20,0 %) пацієнтів (рис. 4).

Таким чином, після застосування запропонованого лікувально-профілактичного комплексу післяопераційний період протікав без ускладнень, більш комфортно для оперованих пацієнтів, з малою вираженістю больового синдрому й колатерального набряку.

Площа поверхні рани в пацієнтів основної групи на 3-й день зменшилась в 1,5 разу, а на 5-й – у 3,2 разу порівняно з початковим рівнем, а в пацієнтів контрольної групи – в 0,8 і 2,1 разу відповідно. Звільнення рани від опікового струпа й повна епітелізація в пацієнтів основної групи спостерігались на 5,1±0,5 доби, а в пацієнтів контрольної групи – на 7,5±0,4-х доби.

Аналіз показників експресії білка P16<sup>INK4a</sup> та антигенів HPV16 ядер клітин епітелію виявив виражену тенденцію до нормалізації проліферативної активності в пацієнтів, які отримували запропонований лікувально-профілактичний комплекс. Так, на тлі проведеної терапії показники експресії білка P16<sup>INK4a</sup> та антигенів HPV16 значно знизились (рис. 5).

Отримані результати свідчать, що запропонований лікувально-профілактичний комплекс має високу ефективність при лікуванні лейкоплакції слизової оболонки

порожнини рота при наявності антигенів папіломавірусу людини високого ризику HPV 16, що дозволяє вважати перспективним подальше впровадження даного лікувально-профілактичного комплексу у стоматологічну практику.

### Висновки

При різних морфологічних варіантах лейкоплакції в епітеліальних клітинах багатоядерного плоского епітелію слизової оболонки рота виявлена підвищена проліферативна активність клітин з експресією у клітинних ядрах білка Ki-67 і маркерів, які безпосередньо (HPV16) або побічно (P16<sup>INK4a</sup>) пов'язані з вірусом папіломи людини. При гіперплазії з гіперкератозом виявляють тільки білок P16<sup>INK4a</sup>, при плоскоклітинній інтраепітеліальній неоплазії з гіперкератозом і плоскоклітинному раку – P16<sup>INK4a</sup> та антигени вірусу папіломи людини високого ризику (HPV16).

Розроблено лікувально-профілактичний комплекс для комплексної терапії лейкоплакції слизової оболонки порожнини рота при наявності антигенів папіломавірусу людини високого ризику HPV 16.

Отримані результати свідчать, що запропонований лікувально-профілактичний комплекс має високу ефективність при лікуванні лейкоплакції слизової оболонки порожнини рота при наявності антигенів папіломавірусу людини високого ризику HPV 16. Після його застосування післяопераційний період протікав без ускладнень, більш комфортно для оперованих пацієнтів, з малою вираженістю больового синдрому й колатерального набряку та показники експресії білка P16<sup>INK4a</sup> та антигенів HPV16 значно знизились. Усе це дозволяє вважати перспективним подальше впровадження даного лікувально-профілактичного комплексу у стоматологічну практику.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Feller L., Lemmer J. Field cancerization and oral leukoplakia. In: Dakubo G.D., ed. Field cancerization: basic science and clinical applications. – Ontario, Canada: Nova Science; 2011: 95–111.
2. Sciubba J.J. Oral cancer: the importance of early diagnosis and treatment // Am. J. Clin. Dermatol. – 2001; 2 (4): 239–51.
3. Rhodus N.L. Oral cancer and precancer: improving outcomes // Compendium of Continuing Education in Dentistry. – 2009. – Vol. 30, № 8. – P. 486–488.
4. Рабинович О.Ф., Бабиченко И.И., Рабинович И.М., Островский А.Д., Того-нидзе А.А. Оптимизация диагностики различных форм лейкоплакии // Стоматология. 2012; 3: 20–22.
5. Kalmar J.R. Advances in the detection and diagnosis of oral precancerous and cancerous lesions // Oral Maxillofac. Surg. Clin. N. Am. – 2006. – Vol. 18. – P. 465–482.
6. Kelloff G.J., Sullivan D.C., Baker H. Workshop on imaging science development for cancer prevention and preemption // Cancer Biomark. – 2007. – Vol. 3. – P.1–33.
7. Dietrich T., Reichart P.A., Scheifele C. Clinical risk factors of oral leukoplakia in a representative sample of the US population // Oral Oncology. – 2004; 40 (2): 158–63.
8. Acay R., Rezende N., Fontes A., Aburad A., Nunes F., Sousa S. Human papillomavirus as a risk factor in oral carcinogenesis: a study using in situ hybridization with signal amplification // Oral Microbiol. Immunol. – 2008; 23 (4): 271–4.
9. Ковязин В.А., Григорьян А.С., Катушкина А.А., Бабиченко И.И. Особенности экспрессии белка Ki-67 при лейкоплакии и плоскоклеточном раке слизистой оболочки полости рта // Стоматология. – 2010; 6: 4–6.
10. Feller L., Lemmer J. Oral leukoplakia as it relates to HPV infection: a review // Int. J. Dent. – 2012; 2012: 540561. doi: 10.1155/2012/540561.

### Оптимизация комплексной терапии лейкоплакии слизистой оболочки полости рта, обусловленной вирусом папилломы человека

*А.В. Борисенко, Ю.Г. Коленко*

**Цель:** обосновать, разработать и оценить алгоритм лечения лейкоплакии слизистой оболочки полости рта при наличии антигена папилломавируса человека высокого риска HPV 16.

**Материалы и методы.** Были исследованы биоптаты слизистой оболочки полости рта 82-х пациентов с лейкоплакией, в том числе 42 женщин и 40 мужчин. Средний возраст больных составил 62 года. При проведении гистологического исследования контролем служил неизмененный эпителий, который брали из прилегающих к лейкоплакии участков слизистой. Выявление тканевых антигенов осуществляли с помощью поликлональных антител кролика к вирусу папилломы человека 16-го типа. Лечение: основная группа – 15 пациентов с лейкоплакией слизистой оболочки полости рта при наличии антигенов папилломавируса человека высокого риска HPV 16, которые лечились разработанным лечебно-профилактическим комплексом; контрольная группа – 10 пациентов с лейкоплакией слизистой оболочки полости рта при наличии антигенов папилломавируса человека высокого риска HPV 16, которые лечились по общепринятой методике.

**Результаты.** В результате ИГХ-исследования эпителия слизистой оболочки полости рта выявлены особенности экспрессии белков, характеризующих пролиферативные процессы и вирусные антигены при различных морфологических проявлениях лейкоплакии, которые показывают репликацию вируса папилломы человека в пролиферирующих клетках многослойного плоского эпителия.

Разработан лечебно-профилактический комплекс для комплексной терапии лейкоплакии слизистой оболочки полости рта при наличии антигенов папилломавируса человека высокого риска HPV 16, который имеет высокую эффективность.

**Вывод.** Полученные результаты свидетельствуют, что предложенный лечебно-профилактический комплекс обладает высокой эффективностью при лечении лейкоплакии слизистой оболочки полости рта при наличии антигенов папилломавируса человека высокого риска HPV 16. После его применения послеоперационный период протекал без осложнений, более комфортно для оперированных пациентов с малой выраженностью болевого синдрома и коллатерального отека и показатели экспрессии белка P16<sup>INK4a</sup> и антигенов HPV16 значительно снизились. Все это позволяет считать перспективным дальнейшее внедрение данного лечебно-профилактического комплекса в стоматологическую практику.

**Ключевые слова:** лейкоплакия, слизистая оболочка полости рта, иммуногистохимия, вирус папилломы человека 16-го типа, лечебно-профилактический комплекс.

### Optimization of complex therapy of oral leukoplakia caused by the human papilloma virus

*A. Borisenko, Yu. Kolenko*

**Objective:** to justify, develop and evaluate an algorithm of treatment of oral leukoplakia in the presence of antigen human papillomavirus high-risk HPV 16.

**Materials and methods.** The biopsy material of the oral mucosa of 82 patients with leukoplakia was studied, including 42 women and 40 men. The average age of patients was 62 year. At carrying out histological examination unmodified epithelia, which were taken from the adjacent to leukoplakia areas of mucous membrane, were used as control. Identification of the tissue antigens was performed using polyclonal rabbit antibodies to human papillomavirus type-16. Treatment: the main group – 15 patients with oral leukoplakia with the presence of antigens of high-risk human papillomavirus HPV 16, who were treated developed medical and preventive complex; the control group – 10 patients with oral leukoplakia with the presence of antigens of high-risk human papillomavirus HPV 16, who were treated by the standard technique.

**Results.** As a result of immunohistochemical (IHC) study of oral mucosa epithelium has revealed features of protein expression that characterizes the proliferative processes and viral antigens during different morphological manifestations of leukoplakia showing human papilloma virus replication in proliferating cells of stratified squamous epithelium.

A medical and preventive complex for the complex treatment of oral leukoplakia in the presence of antigens of high-risk human papillomavirus HPV 16 has been found, which has a high efficiency.

**Conclusion.** The results indicate that the proposed therapeutic and preventive complex is highly effective in the treatment of oral leukoplakia with the presence of high-risk human papillomavirus antigens HPV 16. After its application the postoperative period was uneventful, more comfortable for the patients operated with low severity of pain and collateral edema and protein expression indicators P16<sup>INK4a</sup> and HPV16 antigens decreased significantly. All of this allows us to consider the further implementation of this promising medical and preventive complex in the dental practice.

**Key words:** leukoplakia, oral mucosa, immunohistochemistry, human papilloma virus type 16, medical and preventive complex.

*А.В. Борисенко – Національний медичний університет імені О.О. Богомольця*

*Ю.Г. Коленко – Національний медичний університет імені О.О. Богомольця*