

УДК 616-091:616.516:616.311

**ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КРАСНОГО ПЛОСКОГО
ЛИШАЯ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА****Загородняя Е.Б., Оскольский Г.И., Лушникова Е.Л., Непомнящих Л.М., Щеглов А.В.***НИИ региональной патологии и патоморфологии СО РАМН,
Новосибирск, e-mail: pathol@soramn.ru*

Выявлены особенности пролиферативных процессов в эпителии очагов поражения при красном плоском лишае слизистой оболочки полости рта. Отмечено повышение количественного содержания Ki-67 положительно окрашенных ядер в эпителии слизистой оболочки щеки пациентов с красным плоским лишаем слизистой оболочки полости рта, наиболее значительно при эрозивно-язвенной форме по сравнению с типичной. Включение индуктора интерферона в схему комплексного лечения красного плоского лишая способствует снижению пролиферативной активности эпителиоцитов и, как следствие, уменьшению выраженности патоморфологических изменений слизистой оболочки щеки.

Ключевые слова: красный плоский лишай, слизистая оболочка полости рта, пролиферация эпителия, индекс Ki-67

**IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF LICHEN RUBER PLANUS
OF THE ORAL MUCOSA****Zagorodnyaya E.B., Oskolskii G.I., Lushnikova E.L., Npomnyashchikh L.M.,
Shcheglov A.V.***Research Institute of Regional Pathology and Pathomorphology SD RAMS,
Novosibirsk, e-mail: pathol@soramn.ru*

The features of the proliferative status of epithelial lesions in lichen planus of the oral mucosa were investigated. An increase in the quantitative content of Ki-67 positively stained nuclei in the epithelium of the buccal mucosa of patients with lichen planus of the oral mucosa was revealed. The highest index of Ki-67-positive nuclei was seen in erosive-ulcerative form of lichen ruber planus of the oral mucosa as compared with the typical form. The inclusion of interferon inductor in the scheme of complex treatment of lichen ruber planus helps to reduce the proliferative activity of epitheliocytes and, as a consequence, reduce the severity of pathologic changes in oral mucosa.

Keywords: lichen ruber planus, oral mucosa, epithelium proliferation, Ki-67 index

В связи с обострением экологических проблем и возрастанием антигенной нагрузки на организм человека, приводящей к структурно-функциональным нарушениям, особый интерес представляют изменения в иммунной системе при красном плоском лишае (КПЛ) слизистой оболочки полости рта (СОПР). Благодаря современным методам исследования удалось выявить закономерности развития лихеноидно-тканевой реакции при КПЛ, в основе которой лежат нарушения иммунитета, характеризующиеся как гиперчувствительность замедленного типа. В связи с этим коррекция иммунитета приобретает особое значение [1, 6].

К одному из подходов к иммунотерапии КПЛ СОПР можно отнести применение экзогенных интерферонов (реаферона, интерлока) и интерферогенов (ридостина, неовира). Учитывая важную роль иммуногенетической составляющей в патогенезе КПЛ, перспективной представляется разработка комплексной схемы лечения данного заболевания с включением в нее, наряду с традиционными методами лечения, иммуномодуляторов, которые повышают функциональную активность иммунной системы. Перспективной и новой группой иммуномодулирующих препаратов являются

индукторы интерферона, сочетающие антибактериальные, противовирусные и иммунокорректирующие свойства [2].

В последнее десятилетие особое внимание в патогенезе КПЛ исследователи уделяют проблеме состояния пролиферативной активности клеток эпителия. С помощью иммуногистохимического метода выявлены значительные различия в индексе меченых ядер у больных КПЛ и доказана связь повышенной экспрессии Ki-67 с прогрессированием заболевания [5]. Процессы пролиферации более выражены в эпителии очагов КПЛ СОПР по сравнению с нормальной слизистой оболочкой [7, 9, 10]. Изменения пролиферативной активности эпителия СОПР происходят, в том числе, и при других стоматологических заболеваниях, что отмечено в многочисленных работах отечественных и зарубежных авторов [3, 4, 8].

Анализируя данные литературы, мы нашли единичные сообщения, касающиеся иммуногистохимической характеристики пролиферирующих клеток воспалительно-инфильтрата при КПЛ СОПР. Изучение уровня пролиферативной активности эпителиоцитов у больных КПЛ СОПР было проведено без учета степени тяжести воспалительного процесса [7, 9, 10]. Данных по

определению пролиферативной активности по экспрессии антигена Ki-67 в эпителиоцитах слизистой оболочки щеки в зависимости от клинической формы КПЛ СОПР в отечественной литературе мы не встретили.

Цель исследования: сравнительное изучение пролиферативной активности эпителиоцитов по экспрессии антигена Ki-67 у больных КПЛ СОПР до и после лечения с включением в комплексную терапию иммуномодулятора.

Материал и методы исследования

Иммуногистохимическое исследование биоптатов очагов поражения слизистой оболочки щеки проводили у 23 больных (10 мужчин и 13 женщин – 43,5 и 56,5% соответственно) с клиническими формами КПЛ СОПР: типичной ($n = 12$) и эрозивно-язвенной ($n = 11$). Длительность заболевания составила в среднем $1,8 \pm 0,44$ года. В качестве иммуномодулятора пациентам назначали препарат «Неовир» (натрия 10-метилен-карбоксилат-9-акридин), относящийся к группе низкомолекулярных синтетических индукторов интерферона (фармацевтическая фирма «АСГЛ – Исследовательские лаборатории», Санкт-Петербург). Контрольную группу составили 15 практически здоровых лиц без воспалительных поражений слизистой оболочки полости рта, из них 8 (53,3%) мужчин и 7 (46,7%) женщин.

Пролиферативную активность клеточных популяций в слизистой оболочке щеки оценивали в возрастной группе от 36 до 60 лет (зрелый возраст, второй период) с помощью иммуногистохимического метода (Ki-67 антиген), учитывая возрастные изменения слизистой оболочки полости рта.

Исследовали биоптаты слизистой оболочки щеки размерами $2,0 \times 2,0$ мм. У больных КПЛ иссечение фрагмента слизистой оболочки щеки производили из очагов поражения вблизи границы здоровой ткани. Процедуру биопсии осуществляли под местной анестезией (2%-й раствор лидокаина). Для стандартизации обследования и исключения влияния циркадных ритмов на показатели пролиферации забор биоптатов осуществляли с 9 до 11 часов [4]. В качестве «здорового контроля» использовали биоптаты слизистой оболочки щеки пациентов без патоморфологических признаков в СОПР.

Для иммуногистохимического исследования образцы фиксировали в течение суток в 10%-м растворе нейтрального формалина на фосфатном буфере pH 7,5, обрабатывали по общепринятым методикам с заливкой в гистовакс. На микротоме Leica изготавливали серийные срезы толщиной 5–6 мкм, которые монтировали на предметные стекла, обработанные 0,01%-м раствором поли-L-лизина (Poly-L-Lyzine solution 0,01%, Sigma USA). Демаскировку антигена осуществляли в 10%-м растворе Epitope Retrieval Solution pH 6 (NovocastraTM) при температуре 95°C на водяной бане в течение 30 мин.

Дальнейшее иммуногистохимическое окрашивание для выявления Ki-67 позитивных клеток проводили с помощью набора NovoLink (Polimer Detection System). В качестве первичных антител использовали RTU-Ki67-MM1 (NovocastraTM). Конечный продукт положительно окрашенных ядер визуализировали 3,3-диаминобензидинтетрахлоридом (DAB), срезы

докрашивали гематоксилином. В результате обработки препаратов выявлялись ядра пролиферирующих клеток, находившихся в S-фазе, в которой наблюдается максимальный синтез Ki-67. Подсчет индекса меченых ядер, отражающего уровень экспрессии антигена Ki-67, осуществляли в микроскопе Leica при увеличении 400. Индекс меченых Ki-67 ядер определяли после просмотра не менее 1500 ядер регенераторной зоны и выражали в процентах.

Статистическую обработку результатов осуществляли с вычислением среднего значения, ошибки среднего. Значимость различий определяли по критерию Стьюдента. Различия считали статистически достоверными, если достигнутый уровень значимости (p) не превышал принятого критического уровня значимости, равного 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

При КПЛ СОПР до начала лечения отмечались нарушения процессов ороговения, пролиферации и дифференцировки эпителиоцитов. Пролиферативный потенциал эпителиоцитов СОПР, если судить по экспрессии антигена Ki-67, качественно и количественно различался у пациентов контрольной группы (здоровые лица без патоморфологических признаков воспаления слизистой оболочки щеки) и больных КПЛ СОПР. Анализ результатов выявил достоверно более высокое содержание меченых Ki-67 клеток в эпителиальном пласте из очагов поражения слизистой оболочки щеки у больных КПЛ СОПР двух форм (типичной и эрозивно-язвенной) по сравнению с контрольной группой. Регистрировались индивидуальные отличия цитоархитектоники и регенераторного потенциала эритроцитов СОПР. В неизменной слизистой оболочке положительно окрашенные Ki-67 ядра выявлялись только в базальных эпителиоцитах генеративного слоя с частотой $15,48 \pm 0,41\%$. У больных КПЛ СОПР индекс меченых клеток был достоверно в 2,9 раза выше и составлял $45,0 \pm 1,0\%$ ($p < 0,05$). Следует отметить также «размывание» или расширение границ пролиферативного пула эпителиоцитов у больных КПЛ СОПР, то есть меченые клетки встречались в более высоких слоях, в частности, в шиповатом слое.

При сравнении типичной и эрозивно-язвенной форм КПЛ СОПР установлены существенные различия индекса меченых ядер. Наибольшая пролиферативная активность эпителиоцитов в очагах поражения слизистой оболочки щеки обнаружена у больных с эрозивно-язвенной формой ($50,66 \pm 1,34\%$), при типичной форме КПЛ СОПР этот показатель был ниже ($39,81 \pm 1,17\%$). Индексы меченых клеток при эрозивно-язвенной и типичной формах КПЛ были выше соответственно в 3,3 и

2,6 раза ($p < 0,05$), чем в контрольной группе ($15,48 \pm 0,41\%$). Полученные данные позволяют заключить, что частота выявления Ki-67 положительно окрашенных ядер в эпителии слизистой оболочки щеки тесно связана с клинической формой КПЛ СОПР.

Сравнительный патоморфологический и иммуногистохимический анализ биоптатов слизистой оболочки щеки одних и тех же больных до и после традиционной терапии с использованием иммуномодулятора выявил положительную динамику морфологических изменений. Это, прежде всего, касалось количества и размеров инфильтратов в слизистой. Лимфоцитарная инфильтрация сохранялась в основном вокруг мелких сосудов, очаги свободнолежащих инфильтратов практически исчезли. Явления акантоза, гипер- и паракератоза также подверглись существенной регрессии. На фоне лечения традиционными методами без применения иммуномодулятора мы не наблюдали уменьшения выраженности гиперкератоза и паракератоза, сохранялась зернистость цитоплазмы клеток в верхних отделах шиповидного слоя эпителия, а также выраженная лимфоцитарная инфильтрация подэпителиальной зоны.

Анализ изменений индекса меченых Ki-67-ядер эпителиоцитов выявил выраженную тенденцию к нормализации пролиферативной активности у больных, получавших дополнительно к традиционной терапии иммуномодулятор: индекс пролиферации значительно снизился (в 2 раза) и составил $22,09 \pm 1,05\%$. Изменилась и локализация Ki-67 позитивных клеток – меченые эпителиоциты размещались только в двух первых рядах от базальной мембраны. Уменьшалось также количество пролиферирующих клеток в собственной пластинке слизистой оболочки. Эти данные позволяют заключить, что применение иммуномодулятора «Неовир» в комплексной терапии больных КПЛ СОПР приводит к уменьшению выраженности патоморфологических изменений СОПР и снижению пролиферативной активности эпителиоцитов в пораженных участках.

Заключение

Проведенное иммуногистохимическое исследование пролиферативной активности эпителиоцитов слизистой оболочки щеки выявило достоверное повышение процентного содержания Ki-67 положительно окрашенных ядер у больных КПЛ СОПР. Установлены различия в интенсивности меченых ядер эпителиоцитов Ki-67 в зависимости от клинической формы КПЛ СОПР: более высокий уровень экспрессии Ki-67

в эпителии очагов поражения слизистой оболочки щеки выявлен при эрозивно-язвенной форме заболевания.

Применение иммуномодулятора «Неовир» в комплексной терапии больных КПЛ СОПР приводит к снижению пролиферативной активности эпителиоцитов и, как следствие, уменьшению выраженности патоморфологических изменений в слизистой оболочке щеки.

Список литературы

1. Довжанский С.И., Слесаренко Н.А. Красный плоский лишай. – Саратов, 1990. – 176 с.
2. Ломоносов К.М., Иванов О.Л., Кладова А.А. Неовир в практике дерматовенеролога // Поликлиника. – 2007. – № 3. – С. 12–14.
3. Характеристика пролиферативной активности структур десны в онтогенезе человека / Д.В. Мацопа, Е.М. Козорез, К.М. Попова, Ю.Ю. Первов // Фундаментальные исследования: материалы научных конференций (Греция). – 2004. – № 5. – С. 121–122.
4. Оскольский Г.И., Радивоз М.И., Астахова А.Ю. Радиографический анализ пролиферации эпителия десны при хронических формах гингивита // Бюл. экспер. биол. – 1997. – № 10. – С. 473–476.
5. Симкачева М.В., Козулин Е.А., Тимошин С.С. Характеристика пролиферативного и цитокинового статуса больных красным плоским лишаем в процессе лечения тимодепрессином // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2006. – №4. – С. 56–57.
6. Служаев И.Ф., Оскольский Г.И., Загородняя Е.Б. Красный плоский лишай слизистой оболочки полости рта: клиника, лечение // Дальневосточный мед. журнал. – 2010. – № 2. – С. 132–136.
7. hTR RNA component as a marker of cellular proliferation in oral lichen planus / C.O. Flatharta, S. Flint, M. Toner, M. Mabruk // Asian Pac. J. Cancer Prev. – 2008. – Vol. 9. – P. 287–290.
8. Immunohistochemical localization of type IV collagen and laminin in denture stomatitis Le / P. Bars, P. Piloquet, A. Daniel, B. Giumelli // J. Oral. Path. Med. – 2001. – Vol. 30. – P. 98–101.
9. 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. – P. 381–388.
10. Pirki A., Biocina-lukenda D., Ceki-Arambasin A. et al. Tissue expression of proliferative antigens (PCNA and Ki-67) in oral lichen ruberrelated to clinical status // Coll. Antropol. – 2004. – Vol. 28. – P. 447–453.

Рецензенты:

Поляков Л.М., д.м.н., профессор, зав. лабораторией медицинской биотехнологии, зам. директора по научной работе НИИ биохимии Сибирского отделения РАМН, г. Новосибирск;

Любарский М.С., д.м.н., профессор, зав. отделом клинической морфологии, заместитель директора по научной работе НИИ клинической и экспериментальной лимфологии Сибирского отделения РАМН, г. Новосибирск.

Работа поступила в редакцию 21.09.2011.