

<https://doi.org/10.25208/0042-4609-2018-94-4-15-20>

Сравнительное изучение экспрессии протеина Ki67 при красном плоском лишае слизистой оболочки полости рта и лейкоплакии

Молочкова Ю. В., Хлебникова А. Н.* , Молочков В. А., Гуревич Л. Е., Молочков А. В.

ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского» 129110, Российская Федерация, г. Москва, ул. Щепкина, д. 61/2

Красный плоский лишай слизистой оболочки полости рта (КПЛ СОПР) внесен в категорию потенциально злокачественных заболеваний. По характеру пролиферативной активности клеток доброкачественные процессы отличаются от злокачественных. **Целью** настоящего исследования явилось сравнительное изучение пролиферативной активности в клетках КПЛ СОПР, лейкоплакии и плоскоклеточного рака СОПР.

Материалы и методы. В работе использовались биоптаты 16 больных КПЛ СОПР, 13 — лейкоплакией, 7 — плоскоклеточным раком СОПР. Иммуногистохимическое исследование проводили с моноклональными антителами к Ki67.

Результаты. Средний индекс Ki67 в клетках КПЛ составлял $9,3 \pm 2,3$ %. Пролиферирующие клетки располагались исключительно в базальном слое эпидермиса. В клетках лейкоплакии средний индекс Ki67 составлял $20,5 \pm 6,1$ %, пролиферирующие клетки располагались в базальном слое и нижних отделах шиповатого (надбазально) слоя эпидермиса. В плоскоклеточном раке средний индекс Ki67 составлял $57,4 \pm 2,04$ %. Пролиферирующие клетки располагались диффузно по всем клеточным комплексам от нижних до высоких слоев эпидермиса. Различия уровня пролиферации носили достоверный характер в паре лейкоплакия / КПЛ СОПР ($p = 0,003$) и плоскоклеточный рак / КПЛ СОПР ($p < 0,001$), в паре плоскоклеточный рак / лейкоплакия различия были не достоверны ($p = 0,211$).

Заключение. Различия в уровне пролиферации и характере распределения пролиферирующих клеток в эпидермисе могут быть использованы для дифференциальной диагностики КПЛ СОПР слизистой полости рта и лейкоплакии.

Ключевые слова: **красный плоский лишай, слизистая оболочка полости рта, лейкоплакия, плоскоклеточный рак, индекс Ki67, локализация пролиферирующих клеток**

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Для цитирования: Молочкова Ю. В., Хлебникова А. Н., Молочков В. А., Гуревич Л. Е., Молочков А. В. Сравнительное изучение экспрессии протеина Ki67 при красном плоском лишае слизистой оболочки полости рта и лейкоплакии. Вестник дерматологии и венерологии. 2018;94(4):15–20. <https://doi.org/10.25208/0042-4609-2018-94-4-15-20>



Comparative study of Ki67 protein expression in oral lichen planus and leukoplakia

Yulia V. Molochkova, Albina N. Khlebnikova*, Vladimir A. Molochkov, Larisa E. Gurevich, Anton V. Molochkov

M. F. Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute
Shchepkina str., 61/2, Moscow, 129110, Russian Federation

Oral lichen planus (OLP) is included in the category of potentially malignant diseases. Benign processes are differentiated from malignant ones by the nature of cell proliferative activity.

The aim of the present study was the comparative study of proliferative activity in OLP and leukoplakia cells, as well as the cells of oral squamous cell carcinoma.

Materials and methods. Biopsy specimens from 16 patients with OLP, 13 with leukoplakia, and 7 with oral squamous cell carcinoma were investigated. Immunohistochemical studies were performed using Ki67 monoclonal antibodies.

Results. The average Ki67 index in OLP cells was 9.3 ± 2.3 %. Proliferating cells were located exclusively in the basal epidermis layer. In leukoplakia cells, the average Ki67 index was 20.5 ± 6.1 %; the proliferating cells were located in the basal layer and lower parts of the spinous (suprabasal) layer of the epidermis. In squamous cell carcinoma, the average Ki67 index was 57.4 ± 2.04 %. Proliferating cells were located diffusely over all cell complexes from the lower to the highest layers of the epidermis. Differences in the proliferation level were significant for the leukoplakia/OPL pair ($p = 0.003$) and squamous cell carcinoma/OPL pair ($p < 0.001$), while for squamous cell carcinoma/leukoplakia pair the difference was not significant ($p = 0.211$).

Conclusion. The differences in the proliferation level and in the nature of the proliferating cell distribution through the epidermis can be applied in the differential diagnosis of OLP and leukoplakia.

Keywords: lichen planus, oral mucosa, leukoplakia, squamous cell carcinoma, Ki67 index, localization of proliferating cells

Conflict of interest: the authors state that there is no potential conflict of interest requiring disclosure in this article.

For citation: Molochkova Yu. V., Khlebnikova A. N., Molochkov V. A., Gurevich L. E., Molochkov A. V. Comparative study of Ki67 protein expression in oral lichen planus and leukoplakia. Vestnik Dermatologii i Venerologii. 2018;94(4):15–20. <https://doi.org/10.25208/0042-4609-2018-94-4-15-20>

■ Красный плоский лишай (КПЛ) — подострое или хроническое заболевание кожи и слизистых оболочек. Популяционная частота КПЛ слизистой оболочки полости рта (СОПР) при КПЛ в различных регионах мира варьирует от 0,1 до 4 %, что позволяет расценивать это заболевание как самое частое аутоиммунное поражение подобной локализации. Типичный КПЛ СОПР характеризуется сетчатым (синоним: ретикулярным) типом, представленным мелкими пятнами белого цвета, которые, постепенно сливаясь, образуют полосы, дуги и кольца. Сетчатый тип встречается в 78 % случаев. КПЛ СОПР поражает, как правило, щеки, дорзальную поверхность языка, реже мягкое и твердое небо. Среди атипичных форм КПЛ СОПР выделяют: гиперкератотическую, экссудативно-гиперемическую, эрозивно-язвенную, буллезную, атрофическую, инфильтративную. При этом клинические проявления КПЛ СОПР с годами могут приобретать клиническое сходство с лейкоплакией. Относительно частоты злокачественной трансформации КПЛ СОПР нет единого мнения [1]. Однако анализ 38 исследований, посвященных изучению КПЛ СОПР, в котором были суммированы результаты наблюдений за 16 032 пациентами, показал, что трансформация в рак наблюдалась у 243 (1,5 %) больных [2, 3]. Рак *in situ* по данным G. P. Vombescaги и соавт. развился в 8 из 327 случаев КПЛ СОПР, что составляло 2,4 % [4]. Трансформация КПЛ СОПР в рак в 47,6 % случаев развилась на фоне атрофической, эрозивной или буллезной формы. При злокачественной трансформации КПЛ СОПР в 50,2 % поражен язык, в 42,9 % — слизистая оболочка щек и в 8,4 % — десны [4]. Учитывая эти данные, Всемирная организация здравоохранения внесла КПЛ СОПР в категорию потенциально злокачественных заболеваний [1].

Пролиферативная активность клеток — показатель интенсивности роста ткани. Как правило, она имеет низкие показатели при доброкачественных процессах и резко возрастает при злокачественных. Предраковые процессы, характеризующиеся диспластическими изменениями в эпителии, по уровню пролиферации превосходят воспалительные и гиперпластические состояния. Ранее было показано, что по уровню пролиферативной активности клеток КПЛ СОПР достоверно отличается от лейкоплакии и плоскоклеточного рака СОПР [5]. Данные различия было предложено использовать в сложных случаях дифференциальной диагностики, а также для прогнозирования течения КПЛ СОПР.

Целью настоящего исследования явилось сравнительное изучение пролиферативной активности клеток в клетках КПЛ СОПР, лейкоплакии и плоскоклеточного рака той же локализации, а также разработка на этой основе критериев дифференциальной диагностики.

Материалы и методы

В работе использовались биоптаты 36 больных КПЛ СОПР, лейкоплакией, плоскоклеточным раком СОПР. Среди 16 больных КПЛ СОПР в 6 случаях диагностирована эрозивно-язвенная, в 5 — гипертрофическая, в 3 — экссудативно-гиперемическая, в 2 — атрофическая формы. Веррукозная лейкоплакия диагностирована в 13 случаях, плоскоклеточный рак СОПР — в 7. Биоптат диаметром 0,5 см получали под местной анестезией 2 % раствором лидокаина, фиксировали в 10 % растворе формалина. Материал заливали в парафин по

обычной методике. Серийные срезы депарафинировали по стандартной схеме, затем окрашивали гематоксилином и эозином. В работе также использовали архивный биопсийный материал.

При КПЛ СОПР морфологически в эпителии наблюдали гиперкератоз, паракератоз, акантоз (в ряде случаев в виде «зубьев пилы»), утолщение зернистого слоя, вакуольную дистрофию клеток базального слоя, а также диффузный лимфогистиоцитарный инфильтрат в субэпителиальном слое. В верхних отделах дермы по границе с эпителием в ряде случаев — скопления коллоидных телец. В двух случаях отмечали очаговую гиперплазию клеток базального слоя с укрупнением ядер. При экссудативно-гиперемической форме имелся дефект эпителия.

При веррукозной лейкоплакии морфологически отмечали в эпителии гиперкератоз и вакуольную дегенерацию клеток, реже встречались паракератоз, акантоз и дискератоз, в области дермо-эпидермального соединения — лимфогистиоцитарный инфильтрат. В половине случаев в эпителии наблюдали признаки дисконформации клеток с незначительным клеточным полиморфизмом и гиперхроматозом ядер отдельных клеток, располагающихся в нижних его отделах.

Высокодифференцированный ороговевающий плоскоклеточный рак характеризовался наличием клеточных тяжей, погружающихся в дерму. Имелись патологические митозы. В клеточных пластах — большое количество «роговых жемчужин».

Иммуногистохимическое исследование проводили в соответствии со стандартным протоколом. Парафиновые срезы наносили на стекла с адгезивным покрытием, депарафинировали по стандартному протоколу. Срезы, погруженные в цитратный буфер, инкубировали в микроволновой печи при мощности 690 Вт 2 раза по 5 минут. Срезы охлаждали 20 минут при комнатной температуре, подсушивали и наносили первичные антитела. Для определения уровня пролиферации использовали моноклональные антитела к протеину Ki67 (DAKO, разведение 1:200). Использовались соответствующие позитивные и негативные контроли — иммунные и не иммунные сыворотки. Срезы промывались в буфере, подсушивались, затем на них наносились EnVision (anti-mouse и anti-rabbit, фирмы DAKO, Дания) на 30–40 минут. Для визуализации реакции наносился DAB+ (3, 3'-диаминобензидин), что позволяло получать специфическую коричневую окраску. Затем срезы окрашивали гематоксилином Майера.

Уровень пролиферации оценивался с помощью индекса, который вычислялся как среднее от числа меченых ядер на 100 учтенных ядер (при учете 500–1000 клеток). Подсчет меченых ядер проводился в репрезентативных полях зрения с относительно равномерным распределением клеток, сверху вниз и слева направо. Клетки на периферии срезов, где чаще всего наблюдалось фоновое окрашивание, не учитывались.

Для статистической обработки данных использовался критерий Крускала — Уоллиса с дальнейшими попарными сравнениями. Полученные различия считались достоверными при значениях $p \leq 0,05$.

Результаты

Индекс пролиферации Ki67 в клетках КПЛ варьировал от 6 до 13 %; средний индекс составлял $9,3 \pm 2,3$ %. Пролиферирующие клетки располагались ис-

ключительно в базальном слое эпидермиса (рис. 1). В клетках лейкоплакии индекс Ki67 варьировал от 10 до 30 %; средний индекс составлял $20,5 \pm 6,1$ %. Клетки, экспрессирующие Ki67, располагались в 10 случаях в базальном слое и нижних отделах шиповатого (надбазально) слоя эпидермиса (рис. 2), в трех случаях только в базальном слое. В плоскоклеточном раке индекс Ki67 варьировал от 35 до 85 %, среднее значение составляло $57,40 \pm 2,04$ %. Пролiferирующие клетки располагались диффузно по всем клеточным комплексам от нижних до высоких слоев эпидермиса (рис. 3) в шести случаях, в одном — клетки определяли в базальных и надбазальных отделах.

При попарных сравнениях уровня пролиферации различия носили достоверный характер в паре лейкоплакия / КПЛ СОПР ($p = 0,003$) и плоскоклеточный рак / КПЛ СОПР ($p < 0,001$), в паре плоскоклеточный рак / лейкоплакия различия были не достоверны ($p = 0,211$).

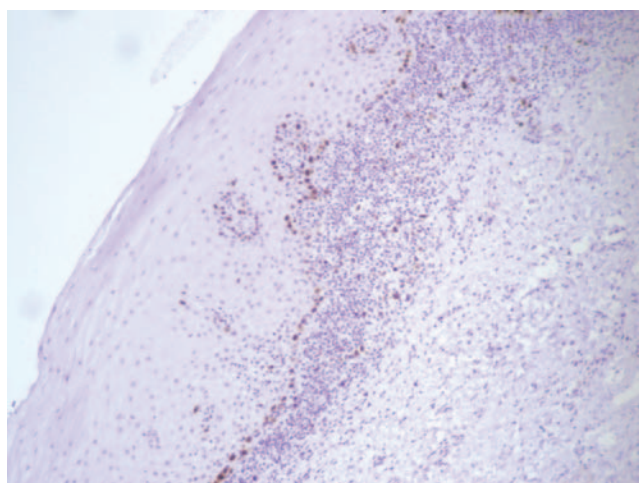


Рис. 1. КПЛ СОПР. Экспрессия Ki67 в базальном слое эпидермиса. Иммуногистохимическая реакция, ПАП-метод, окраска DAB-гематоксилин Майера. Ув. $\times 200$
Fig. 1. OPL. Ki67 expression in the epidermis basal layer. Immunohistochemical reaction, PAP method, Mayer's DAB-hematoxylin staining. $\times 200$ magn.

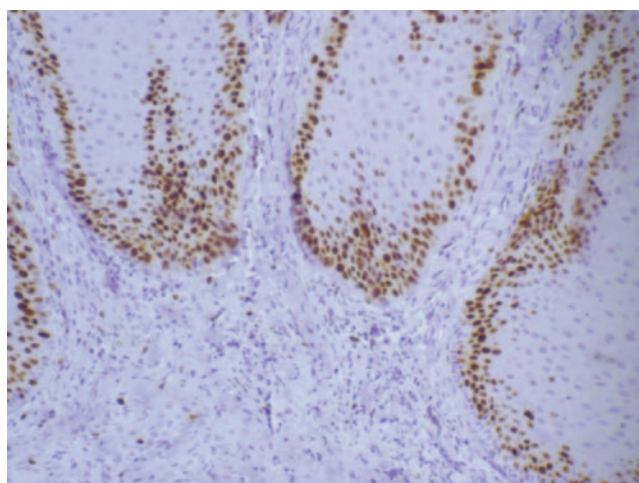


Рис. 2. Лейкоплакия. Экспрессия Ki67 в базальном слое эпидермиса и надбазально. Иммуногистохимическая реакция, ПАП-метод, окраска DAB-гематоксилин Майера. Ув. $\times 400$
Fig. 2. Leukoplakia. Ki67 expression in the epidermis basal and suprabasal layers. Immunohistochemical reaction, PAP method, Mayer's DAB-hematoxylin staining. $\times 400$ magn.

Обсуждение

Пролiferативная активность клеток является объективным показателем усиления роста тканей. Она значительно выше в злокачественных опухолях по сравнению с предраковым и воспалительным процессом [6]. Ее уровень помогает в ряде случаев провести дифференциальную диагностику между доброкачественными изменениями и предраком, а последний отличить от злокачественного процесса. При изучении уровня пролиферации с помощью индекса Ki67 клетки КПЛ СОПР имели средний индекс $9,3 \pm 2,3$ %. В более ранних исследованиях индекс Ki67 при данном заболевании варьировал от 13 до 20 % [7, 8]. Индекс пролиферации клеток лейкоплакии составлял $20,5 \pm 6,1$ %. Различия в уровне пролиферации между КПЛ и лейкоплакией носили достоверный характер ($p = 0,003$). Проведя сравнительное исследование с антителами к PCNA F. de Sousa и соавт. наблюдали аналогичные различия в уровне пролиферации между КПЛ и лейкоплакией [5]. Из 24 случаев КПЛ СОПР 14 (58,33 %) экспрессировали PCNA, тогда как при дисплазии СОПР из 24 случаев 20 (83,33 %) давали положительную реакцию, при этом различия носили статистически достоверный характер ($p = 0,031$). Значительно более высокий характер пролиферации отмечался большинством исследователей в плоскоклеточном раке (до 91,67 %) [5, 7], аналогичная тенденция была установлена и нами — индекс Ki67 при плоскоклеточном раке полости рта составлял $57,4 \pm 2,04$ % ($p < 0,001$).

Нам также удалось выявить значительные отличия в локализации клеток, экспрессирующих Ki67, при КПЛ СОПР и лейкоплакии. Во всех случаях КПЛ клетки локализовались исключительно в базальном слое эпидермиса, тогда как при лейкоплакии в 10 случаях из 13 — в базальном и нижних отделах шиповатого слоя (надбазально). При плоскоклеточном раке пролиферирующие клетки встречались во всех слоях эпидермиса. В нормальном эпидермисе пролиферировали только

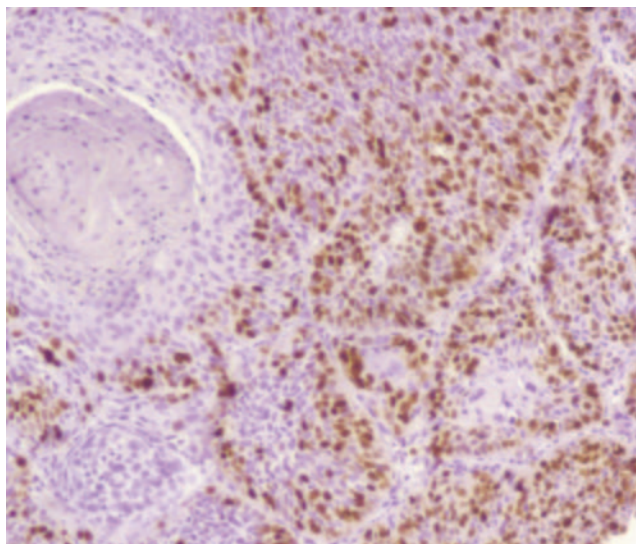


Рис. 3. Плоскоклеточный рак СОПР. Диффузное распределение клеток, экспрессирующих Ki67. Иммуногистохимическая реакция, ПАП-метод, окраска DAB-гематоксилин Майера. Ув. $\times 400$
Fig. 3. Oral squamous cell carcinoma. Diffuse distribution of Ki67 expressing cells. Immunohistochemical reaction, PAP method, Mayer's DAB-hematoxylin staining. $\times 400$ magn.

базальные клетки, аналогичная картина при КПЛ СОПР свидетельствовала о доброкачественном характере процесса. Вовлечение же в пролиферацию надбазальных слоев эпидермиса при лейкоплакии указывало на диспластические изменения клеток и возможность наступления злокачественной трансформации.

В литературе встречаются противоречивые данные о разнице уровня пролиферации клеток различных клинических форм КПЛ СОПР [9–11]. При этом одни авторы не находили достоверных различий в индексе Ki67 при ретикулярной и атрофически-эрозивной формах [10]. В то же время R. S. Promod и соавт. при изучении пролиферации с помощью антител к PCNA в эрозивно-язвенной и типичной формах показали, что индекс составлял 66,8 и 17 % соответственно [11]. При этом в эрозивно-язвенной форме пролиферирующие клетки распределялись в базальном и шиповатом слоях эпидермиса, тогда как в типичной — преимущественно в базальном [11]. На основании этих данных авторы делают вывод о более высокой возможности наступления злокачественной трансформации при эрозивно-яз-

венной форме по сравнению с типичной. В нашем исследовании не было различий в уровне пролиферации и распределении клеток, экспрессирующих Ki67, между различными формами КПЛ, что было связано со значительным преобладанием в группе изучения типичной и гипертрофической форм и всего двух случаев эрозивно-язвенной формы КПЛ СОПР.

Заключение

По уровню пролиферативной активности клеток и характеру их распределения в эпидермисе КПЛ СОПР лейкоплакия и плоскоклеточный рак той же локализации отличаются друг от друга. Средний индекс Ki67 составлял $9,3 \pm 2,3$, $20,5 \pm 6,1$ и $57,4 \pm 2,04$ % соответственно ($p < 0,001$). Клетки, экспрессирующие Ki67, располагались при КПЛ СОПР исключительно в базальном слое эпидермиса, при лейкоплакии — в базальном и нижних отделах шиповатого (надбазально), при плоскоклеточном раке — во всех слоях эпидермиса. Выявленные различия могут быть полезны для дифференциальной диагностики КПЛ СОПР и лейкоплакии. ■

Литература/References

- Gopalakrishnan A., Balan A., Kumar N. R., Haris P. S., Bindu P. Malignant potential of oral lichen planus: an analysis of literature over the past 20 years. *International J Applied Dental Sci.* 2016;2(2):1–5.
- Van der Meij E., Mast H., van der Waal I. The possible premalignant character of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a prospective five-year follow-up study of 192 patients. *Oral Oncology.* 2007;43(8):742–748.
- Van der Meij E., Schepman K.P., van der Waal I. The possible premalignant character of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a prospective study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003;96(2):164–167.
- Bombeccari G. P., Guzzi G., Tettamanti M., Gianni A. B., Baj A., Pallotti F. et al. Oral lichen planus and malignant transformation: a longitudinal cohort study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011;112:328–334.
- de Sousa F. A. C. G., Paradella T. C., Carvalho Y. R., Rosa L. E. B. Comparative analysis of cell proliferation ratio in oral lichen planus, epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2009;14(11):e563–567. DOI: 10.4317/medoral.14.e563
- Piggati F. M., Taveira L. A., Soares C. T. Immunohistochemical expression of bcl-2 and Ki67 in oral lichen planus and leukoplakia with different degrees of dysplasia. *Int J Dermatol.* 2015;54(2):150–155. DOI: 10.1111/ijd.12279
- De Sousa F. A. C. G., Paradella T. C., Carvalho Y. R., Rosa L. E. B. Immunohistochemical expression PCNA, p53, bax and bcl-2 in oral lichen planus and epithelial dysplasia. *J Oral Sci.* 2009;51(1):117–121.
- Rosa E. A., Lia E. N., Macedo S. B., de Amorim R. F. B. In situ carcinoma developed over oral lichen planus: a case report with analysis of BUB3, p16, p53, Ki67 and SOX4 expression. *J Appl Oral Sci.* 2015;23(4):442–447. DOI: 10.1590/1678-775720150058
- Bascones-Ilundaini C., Gonzales-Moles M. A., Esparza-Gomez G., Gil-Montoya J. A., Bascones-Martinez A. Importance of apoptotic mechanisms in inflammatory infiltrate of oral lichen planus lesions. *Anticancer Res.* 2006;26:357–362.
- Montebugholi L., Farnedi A., Marchetti C., Magrini E., Pession A., Foscini M. P. High proliferative activity and chromosomal instability in oral lichen planus. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2006;35(12):1140–1144. DOI: 10.1016/j.ijom.2006.07.018
- Pramod R. C., Pandit S., Desai D., Suresh K. V., Ingaleswar P. S., Shetty S. J., Ahamad S. Immunohistochemical assessment of proliferating cell nuclear antigen protein expression in plaque, reticular and erosive types of oral lichen planus. *Ann Med Health Sci Res.* 2104;4(4):598–602. DOI: 10.4103/2141-9248.139337

Информация об авторах

Юлия Владимировна Молочкова — к.м.н., старший научный сотрудник отделения дерматовенерологии и дерматоонкологии ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского»

Альбина Николаевна Хлебникова* — д.м.н., профессор, профессор кафедры дерматовенерологии и дерматоонкологии ФУВ ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского»; e-mail: alb9696@yandex.ru

Владимир Алексеевич Молочков — д.м.н., профессор, руководитель отделения дерматовенерологии и дерматоонкологии ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского»

Лариса Евсеевна Гуревич — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отделения патоморфологии ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского»

Антон Владимирович Молочков — д.м.н., профессор, заместитель директора по научной работе и международным связям ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского»

Information about the authors

Yulia V. Molochkova — Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Department of Dermatovenereology and Dermatologic Oncology, M. F. Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute

Albina N. Khebnikova* — Dr. Sci. (Med.), Prof., Department of Dermatovenereology and Dermatologic Oncology, M. F. Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute; e-mail: alb9696@yandex.ru

Vladimir A. Molochkov — Dr. Sci. (Med.), Prof., Departmental Head, Department of Dermatovenereology and Dermatologic Oncology, M. F. Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute

Larisa E. Gurevich — Cand. Sci. (Med.), Prof., Chief Researcher, Department of Pathomorphology, M. F. Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute

Anton V. Molochkov — Dr. Sci. (Med.), Prof., Deputy Director for Scientific Work and International Relations, M. F. Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute