

УДК 616.311-07

БИОМАРКЕРЫ В ДИАГНОСТИКЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ РТА

Казеко Л.А., Богомолова А.А., Летковская Т.А., Бич Т.А.

УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь

Актуальной и трудной задачей современной оральной мукологии остается дифференциальная диагностика заболеваний слизистой оболочки рта (СОР). В рамках исследования проведен морфометрический анализ биоптатов СОР 19 пациентов при помощи методики иммуногистохимического окрашивания. По результатам исследования установлено: для плоского лишая характерна высокая экспрессия CD3-клеток, что указывает на ведущую роль специфического клеточного иммунного ответа в развитии заболевания. При буллезных поражениях отмечается высокая активность В-лимфоцитов стромы (CD20) и Т-лимфоцитов эпителия (CD3), что обусловлено нарушением целостности базальной мембраны. Выявлены статистически значимые различия в экспрессии маркеров между группами, что подчеркивает особенности патогенеза. Иммуногистохимическое исследование биопсийного материала выступает ключевым методом дифференциальной диагностики и может стать основой для разработки новых методов экспресс-диагностики и патогенетической терапии.

Ключевые слова: аутоиммунные дерматозы; диагностика; воспалительный инфильтрат; кластеры дифференцировки; иммуногистохимическое исследование.

Введение. Актуальной и трудной задачей современной оральной мукологии остается дифференциальная диагностика заболеваний слизистой оболочки рта (СОР). Это связано с увеличением распространенности, риском малигнизации [1], ростом онкопатологии и возможностью перехода в жизнеугрожающее состояние (например, при пузырчатке) [2]. Характерна трудность дифференциальной и ранней диагностики, что связано со схожестью клинических проявлений, многообразием форм заболеваний.

Клиническое обследование не позволяет поставить точный диагноз, для его верификации требуются дополнительные методы диагностики. Наиболее точна из доступных методов морфологическая диагностика – исследование биопсийного материала [3]. Однако в случае буллезных дерматозов морфологическое исследование неинформативно из-за сложностей выполнения биопсии, отслойкой покрывки пузыря и невозможностью взятия всех слоев слизистой, что затрудняет диагностику [3].

В качестве исследуемой группы патологий нами выбрана группа аутоиммунных дерматозов – полиэтиологичных заболеваний с проявлениями на коже и слизистой оболочке рта, в основе их которых лежат механизмы разрушения структурных компонентов кожи и слизистой оболочки рта аутореактивными иммунными клетками. Нами изучены плоский лишай и буллезные дерматозы, поскольку

данные патологии склонны к малигнизации (риск озлокачествления поражений при плоском лишае составляет от 0,3 до 12,5 %, вероятность выше при эрозивно-язвенной, экссудативно-гиперемической и атрофической формах [1]), широко распространены (по данным ряда авторов, плоский лишай наиболее частое неинфекционное заболевание полости рта [1]) и возможность перехода в жизнеугрожающее состояние, требующее экстренной медицинской помощи (акантолитическая пузырчатка). Данные патологии требуют оперативной ранней и дифференциальной диагностики для назначения пациенту эффективного местного лечения и маршрутизации пациентов к врачам-специалистам для назначения системной терапии.

В литературе описаны различные методы диагностики аутоиммунных дерматозов (иммуноблоттинг, оптическая когерентная томография, контактная биомикроскопия [3], определение прямой аутофлуоресценции тканей, серологическая диагностика – непрямая РИФ, ИФА [3; 4], ультразвуковое дерматосканирование, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия), но их применение ограничено из-за дороговизны и недоступности [3].

Иммуногистохимическое исследование/ИГХ-исследование биопсийного материала считается «золотым стандартом» в дифференциальной диагностике аутоиммунных дерматозов [3]. Метод позволяет поставить диагноз

на основании качественного и количественного состава воспалительного инфильтрата [5].

В качестве диагностических маркёров при ИГХ-исследовании используются молекулы, экспрессирующиеся на поверхности клеток воспалительного инфильтрата, а также ферменты, участвующие в деструкции тканей слизистой оболочки. К последним относятся матриксные металлопротеиназы (ММР-2, ММР-9), нейтрофильная эластаза, играющие ключевую роль в разрушении межклеточных связей между базальной мембраной и базальным слоем эпителия при буллезном пемфигоиде [6]. При пузырчатке характерна экспрессия ММР-9, ММР-12, ADAM5 (дезинтегрин и металлопротеиназа) и снижение экспрессии TIMP3 (тканевого ингибитора металлопротеиназ), что ведет к образованию внутриэпителиальных пузырей [6]. При плоском лишае имеет место экспрессия ММР-9, повышение ее уровня может свидетельствовать о малигнизации поражений.

Данные молекулы выделяются клетками воспалительного инфильтрата, в частности лимфоцитами и макрофагами. Для определения качественного и количественного состава инфильтрата, распределения клеток в слизистой оболочке используются маркеры на поверхности клеток, к ним относят кластеры дифференцировки (CD-рецепторы). Данные молекулы участвуют в выполнении основной функции клеток, применяются для определения принадлежности клеток к популяции, степени и стадии их дифференцировки [3]. Использование моноклональных антител к CD-рецепторам при ИГХ-исследовании биопсийного материала доступный метод исследования (по сравнению с другими маркерами) и может способствовать разработке методов экспресс-диагностики аутоиммунных дерматозов и методов патогенетической терапии, направленных на отдельные звенья клеточного и гуморального иммунного ответа. Применение моноклональных антител для лечения аутоиммунных дерматозов нашло место в дерматологии (препараты ритуксимаб и омализумаб). Эффективность патогенетической терапии сопоставима с базовой гормональной терапией, однако имеет меньше побочных эффектов и ведет к более длительной ремиссии [7].

Цель исследования – определить количественный состав воспалительного инфильтрата

та в биоптатах слизистой оболочки рта пациентов с аутоиммунными дерматозами.

Нами сформулированы следующие **задачи** исследования:

1. Отобрать биоптаты слизистой оболочки рта пациентов с аутоиммунными дерматозами и сформировать две группы на основании клинической и гистологической картины;
2. Провести ИГХ-исследование биоптатов СОР на искомые маркёры в выделенных группах;
3. Рассчитать показатели экспрессии маркёров CD3, CD20 и CD68 в исследуемых группах в строме и эпителии.

Материалы и методы. Проведено клинико-морфологическое одноцентровое ретроспективное исследование. Нами изучена база морфологических заключений пациентов с заболеваниями СОР (70 случаев), отобрано 19 заключений, соответствующих критериям включения в исследование, с клиническим и гистологическим диагнозом: плоский лишай, буллезный пемфигоид и вульгарная пузырчатка. Отобранные пациенты были разделены на две группы в соответствии с диагнозом (табл. 1). Буллезная форма плоского лишая включена в обе группы, поскольку для нее характерны признаки обеих групп патологии.

Таблица 1 – Состав исследуемых групп

Группа	Патология	Количество биоптатов
Плоский лишай/ПЛ	ПЛ, типичная форма	6
	ПЛ, буллезная форма	2
	ПЛ, эрозивно-язвенная форма	4
	ПЛ, атипичная форма	1
Буллезные поражения/БП	ПЛ, буллезная форма	2
	Буллезный пемфигоид	4

В качестве материала для исследования использованы биоптаты СОР пациентов с проявлениями аутоиммунных дерматозов в полости рта, проходившими лечение на кафедре консервативной стоматологии УО БГМУ. Проведено ИГХ-исследование на серийных парафиновых срезах с использованием моноклональных антител к CD3, CD20 и CD68 на базе кафедры патологической анатомии и судебной медицины с курсом повышения квалификации и переподготовки УО «Белорусский государственный медицинский университет». ИГХ-исследование проводили в соответствии с протоколами, созданными в процессе от-

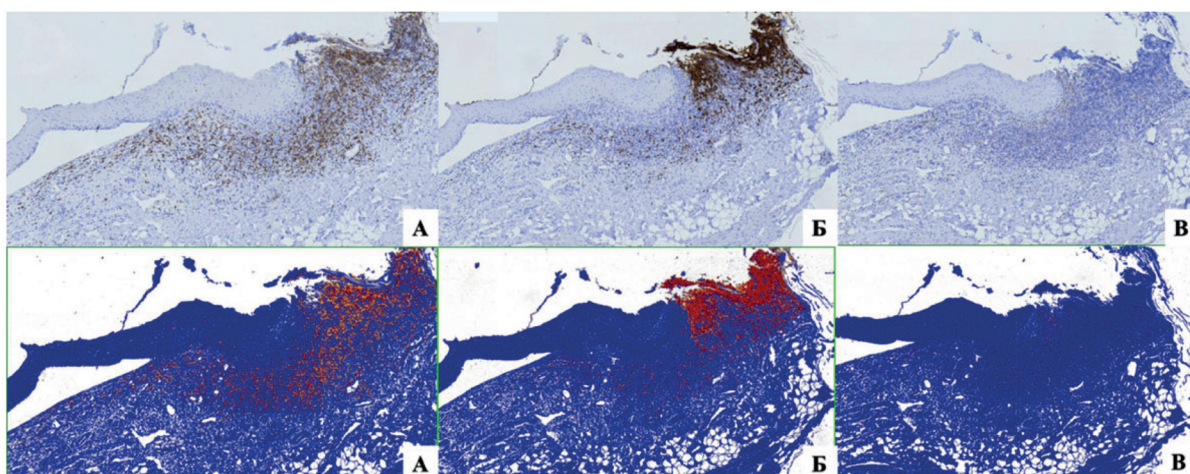


Рис. 1. Сканы биоптатов СОР при буллезном пемфигоиде (верхний ряд – ИГХ-окрашивание, нижний – ИГХ-окрашивание после морфометрического анализа): А – CD3, Б – CD20, В – CD68. Хромоген – диаминобензидин, контрокрашивание гематоксилином Майера. А–В – увеличение 100

работки, для каждого первичного антитела установлено время экспозиции в демаскировочном буфере, оптимальное pH, оптимальное разведение и время экспозиции с диаминобензидином. Морфометрический анализ включал в себя сканирование препаратов с применением цифрового слайд-сканера и последующий анализ экспрессии маркера в материале ткани десны с использованием AperioImageScope v.12.4.0.5043. Статистический анализ выполнен с использованием программного обеспечения Statistica 10.

При проведении компьютерного морфометрического анализа изображения состоят из пикселей. Коричневые, красные, оранжевые, желтые пиксели позитивны и представляют собой места скопления клеток, экспрессирующих искомые маркеры. Синие пиксели негативны, в участках нужные клетки отсутствуют (рис. 1).

Для каждой группы были рассчитаны показатели экспрессии. Позитивность – отношение числа позитивных пикселей к общему числу позитивных и негативных пикселей, %. Общая интенсивность ИГХ-реакции – отношение суммы интенсивностей негативных и позитивных пикселей к общему числу позитивных и негативных пикселей. Сравнение показателей проводилось по критерию Манна–Уитни, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. При типичной форме плоского лишая наибольшие показатели наблюдаются для CD3-клеток, что объ-

ясняется ключевой ролью клеточного иммунного ответа в развитии плоского лишая.

Эрозивно-язвенная форма характеризуется высокой экспрессией еще и стромальных В-лимфоцитов. Это связано с их ролью в гуморальной деструкции тканей СОР (рис. 2).

При атипичной форме ПЛ значения экспрессии клеток воспалительного инфильтрата ниже, чем при других патологиях. Буллезная форма плоского лишая, как и другие буллезные поражения, характеризуется повышенной экспрессией эпителиальных CD3 и стромальных CD20 (рис. 3).

Ранее установлено, что экспрессия Т-лимфоцитов при плоском лишае определяется на всю глубину слизистой с преобладанием в строме. Уровень В-лимфоцитов в эпителии невысокий, значительно выражен в строме. Предположительно, CD20-клетки участвуют в поддержании воспаления при аутоиммунных дерматозах. Не последнюю роль в патогенезе ПЛ играют нарушения иммунного статуса (снижение факторов, регулирующих популяцию мононуклеаров и иммунный ответ (иммуноглобулины, интерлейкины и др.) [1].

Для буллезного пемфигоида характерно наличие в воспалительном инфильтрате высокой экспрессии стромальных Т- и В-лимфоцитов и эпителиальных Т-лимфоцитов. Аналогичный состав воспалительного инфильтрата наблюдается и при вульгарной пузырчатке, однако значения экспрессии ниже, чем при других буллезных поражениях (рис. 4).

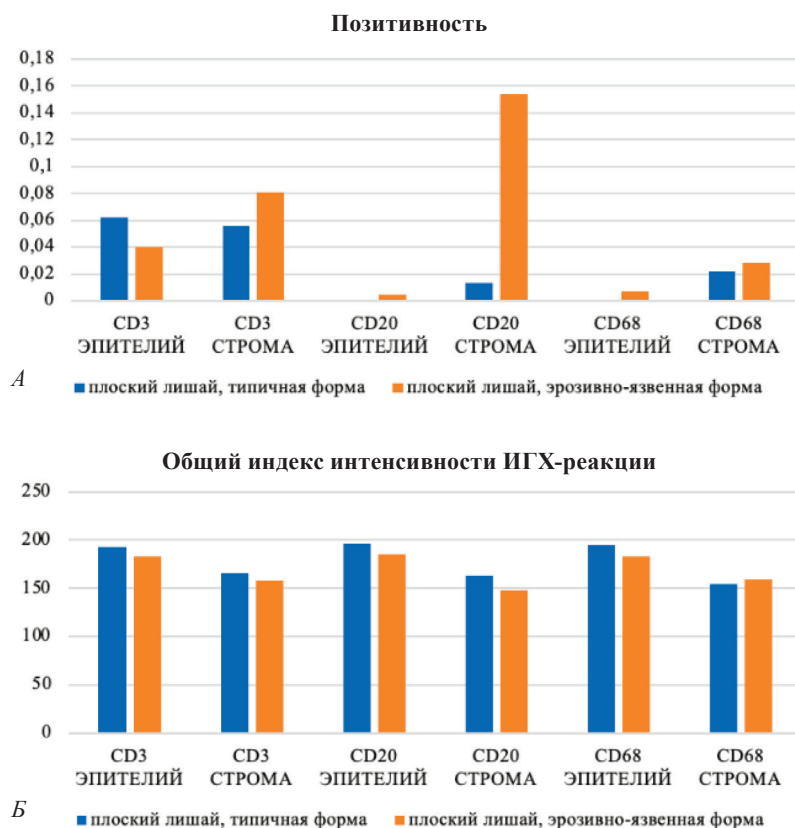


Рис. 2. Экспрессия CD3, CD20 и CD68 при типичной и эрозивно-язвенной формах плоского лишая слизистой оболочки рта: А – позитивность; Б – общий индекс интенсивности ИГХ-реакции

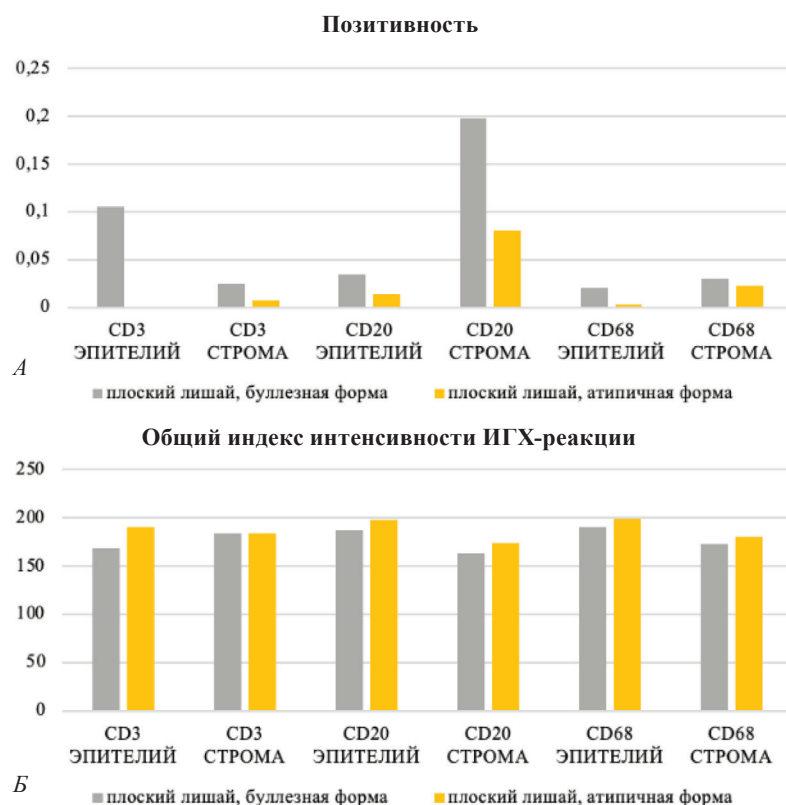


Рис. 3. Экспрессия CD3, CD20 и CD68 при буллезной и атипичной формах плоского лишая: А – позитивность; Б – общий индекс интенсивности ИГХ-реакции

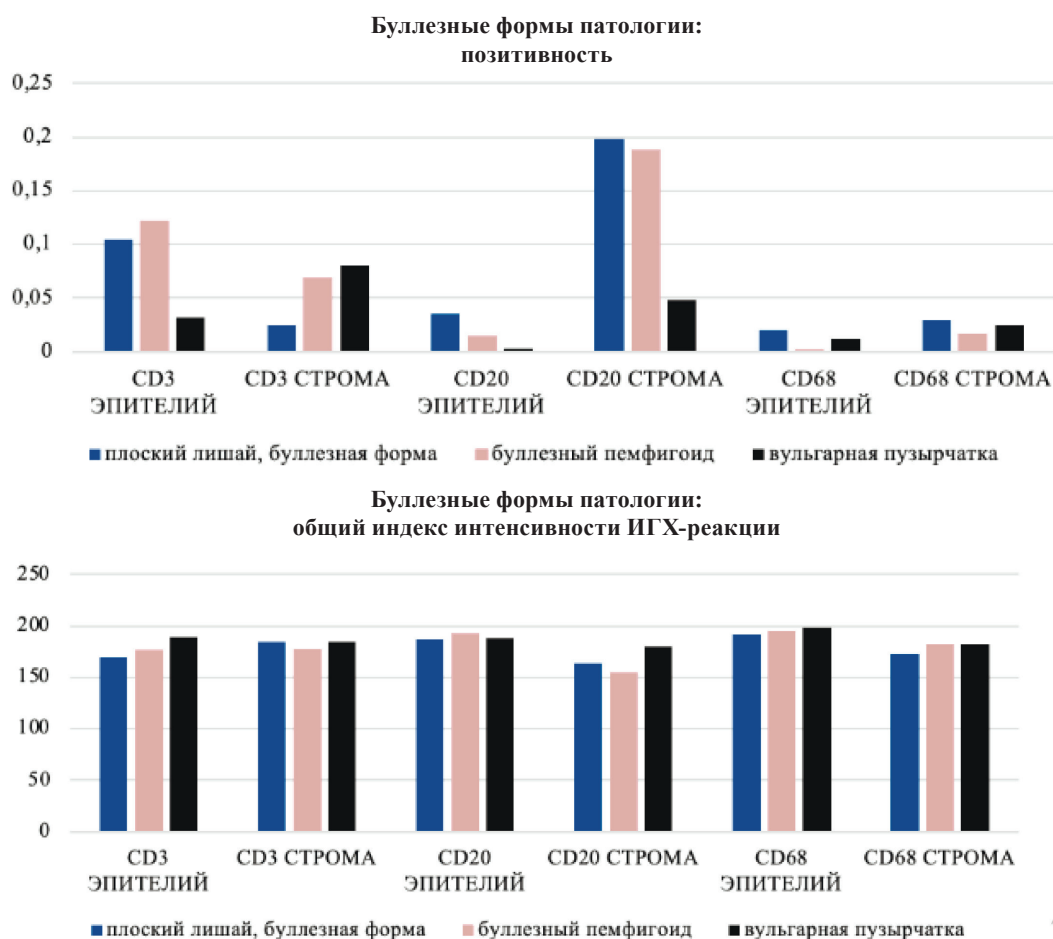


Рис. 4. Экспрессия CD3, CD20 и CD68 в группе буллезных поражений: А – позитивность; Б – общий индекс интенсивности ИГХ-реакции

Стромальная экспрессия В-лимфоцитов при буллезном пемфигоиде и буллезной форме ПЛ связана с их участием в антиген-зависимом разрушении базальной мембраны. Активность Т-лимфоцитов выше в эпителии. При вульгарной пузырчатке максимальная экспрессия характерна для стромальных CD3. Это связано с развитием акантолиза и участием Т-лимфоцитов в этом процессе путем разрушения межклеточных связей. Рядом исследователей отмечается высокая экспрессия Т-лимфоцитов, поскольку они стимулируют В-клетки к продукции антител. При буллезном пемфигоиде описывается инфильтрат, представленный преимущественно CD4-клетками, предполагаемо аутореактивными Т-хелперами [5].

При сравнении показателей по критерию Манна-Уитни между двумя группами выявлены статистически значимые различия (табл. 2).

Таблица 2 – Значения критерия Манна-Уитни, полученные при сравнении показателей исследуемых групп

	Маркер	Позитивность	Общая интенсивность ИГХ-реакции
Эпителий	CD3	0,051803078	0,027620811
	CD20	0,001345047	0,102770109
	CD68	5,93455E-06	0,116320039
Строма	CD3	0,003463759	0,006285813
	CD20	0,008385228	0,07918111
	CD68	0,018621272	0,001054677

Заключение. Воспалительный инфильтрат при аутоиммунных дерматозах характеризуется высокой экспрессией стромальных Т- и В-лимфоцитов и эпителиальных Т-лимфоцитов при снижении макрофагальной защиты. По рассчитанным показателям экспрессии иммунных клеток имеются статистически значимые различия, что указывает на отличительные особенности патогенеза и морфогенеза данных состояний. Иммуногистохимическая

диагностика играет важное значение в диагностике аутоиммунных дерматозов. Планируется дальнейшее изучение темы для

разработки доступных и эффективных методов диагностики заболеваний на ранних стадиях.

Список цитированных источников

1. *Active inflammatory biomarkers in oral lichen planus* / A. Santarelli [et al.] // *International J. of Immunopathology and Pharmacology*. – 2015. – Vol. 28. – P. 562–568.
2. *Fang, H. The role of T cells in pemphigus vulgaris and bullous pemphigoid* / H. Fang, Q. Li, G. Wang // *Autoimmunity Reviews*. – 2020. – Vol. 19, iss. 11. – P. 1–9.
3. *Современные методы дифференциальной диагностики истинной (аутоиммунной) пузырчатки и буллезного пемфигоида* / С.Б. Ткаченко // *Рос. журнал кожных и венерических болезней*. – 2015. – No 3. – С. 17–22.
4. *Тихоновская, И.В. Субэпидермальные буллезные дерматозы. Часть II. Буллезный пемфигоид, пемфигоид слизистых оболочек, приобретенный буллезный эпидермолиз* / И.В. Тихоновская, М.А. Катина // *Вест. Витебс. гос. мед. ун-та*. – 2019. – Т. 18. – No 3. – С. 7–15.
5. *T regulatory cells and other lymphocyte subsets in patients with bullous pemphigoid* / T. Gambichler [et al.] // *Clinical and Experimental Dermatology*. – 2017. – Vol. 42. – Iss. 6. – P. 632–637.
6. *Cirillo, N. A Scoping Review of the Role of Metalloproteinases in the Pathogenesis of Autoimmune Pemphigus and Pemphigoid* / N. Cirillo, S.S. Prime // *Biomolecules*. – 2021. – No. 117 – 10 p.
7. *Ритуксимаб в лечении ребенка с вульгарной пузырчаткой: клиническое наблюдение* / Н. Н. Мурашкин [и др.] // *Вопр. современной педиатрии*. – 2022. – Т. 21. – No 5. – С. 407–413.

BIOMARKERS IN THE DIAGNOSIS OF DISEASES OF THE ORAL MUCOSA

**Kazeko Lyudmila Anatolyevna, Bogomolova Anastasia Alexandrovna,
Letkovskaya Tatiana Anatolyevna, Bich Tatiana Alexandrovna**

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Diagnosis of diseases of the oral mucosa (ODS), such as autoimmune dermatoses (lichen planus, bullous pemphigoid, vulgar pemphigus), remains a difficult task due to the similarity of clinical manifestations and the risk of malignancy. The study analyzed biopsy samples from 19 patients using immunohistochemical markers (CD3, CD20, CD68) to assess the composition of the inflammatory infiltrate. The results showed that CD3 cell expression prevails in lichen planus, which confirms the leading role of cellular immunity in pathogenesis. Bullous lesions are characterized by high activity of stromal B-lymphocytes (CD20) and epithelial T-lymphocytes (CD3), which is associated with the destruction of the basement membrane. Statistically significant differences in the expression of markers between the groups were revealed, which highlights the features of pathogenesis. Immunohistochemical examination of biopsy material is a key method of differential diagnosis and can become the basis for the development of new methods of rapid diagnosis and pathogenetic therapy of autoimmune dermatoses.

Key words: autoimmune dermatoses; diagnosis; inflammatory infiltrate; differentiation clusters; immunohistochemical study.