

УДК 616.31-085: 616-002.2: 612.086.2

ББК Р.66std1-2

Л.Р. МУХАМЕДЖАНОВА, М.А. ЕГОРОВ

ВЛИЯНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ РЕГЕНЕРАТОРНОГО ПОТЕНЦИАЛА НА ЭПИТЕЛИЗАЦИЮ ДЕФЕКТОВ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ РТА И КРАСНОЙ КАЙМЫ ГУБ

Ключевые слова: регенераторный потенциал, биомаркер Ki-67, эпителизация хронической трещины губы, хроническая трещина губы.

Цель работы заключалась в изучении причин возникновения хронической трещины губы, а также в выявлении факторов, участвующих в хронизации данного процесса. Иммуногистохимическими методами были исследованы 70 пациентов (биоптаты тканей губы) на выявление степени экспрессии биологического маркера ki-67 в качестве показателя регенераторного потенциала мукозальных эпителиоцитов. Установлено, что пациенты,отягощенные воспалительно-деструктивными заболеваниями пародонта, имеющие полные губы, в большей степени подвержены хронизации трещины губы. Травматический фактор также может быть причиной трещины губы. Выявлено, что высокий уровень экспрессии биомаркера ki-67 в тканях красной каймы губы позволяет судить о высоком регенераторном потенциале, однако существует «красная зона», после которой данный процесс рассматривается как признак злокачественной трансформации.

L. MUKHAMEDZHANOVA, M. EGOROV

IMPACT OF INDICATORS OF REGENERATIVE POTENTIAL DEFECTS IN THE EPITHELIZATION OF THE MUCOUS MEMBRANE AND RED LIP LINE

Key words: regenerative potential biomarker Ki-67, epithelization of chronic crack of the lips, chronic crack of the lip.

The purpose of the work was to study the causes of chronic crack of the lip, as well as to identify factors involved in the chronicity of the process. With the help of immunohistochemical methods there were studied 70 patients (biopsy samples from the surface of the lips) to determine the degree of expression of the biomarker Ki-67 as an indicator of regenerative potential of epithelial cells of red lip line. It was found that patients burdened inflammatory and destructive periodontal disease, that have plush lips, the presence of traumatic agent in the oral cavity against the lips are more prone to chronic cracked lips. It was revealed that the highest rate of the biomarker Ki-67 in tissues of the red lip line of the lips gives an indication of the high regenerative potential, but there is a «red zone», after which the process should be seen as a sign of malignant transformation.

Повреждения травматического генеза различных типов эпителия слизистой оболочки рта и красной каймы губ являются одной из наиболее частых причин обращения за амбулаторной стоматологической помощью. К таким повреждениям можно отнести травму некачественно изготовленными ортопедическими конструкциями, острыми краями зубов, средствами гигиенического ухода за полостью рта. Наиболее «уязвимой» зоной представляется красная кайма губ, поскольку является пограничной между слизистой оболочкой рта и кожей периоральной области. Также красная кайма губ является эстетической зоной и, следовательно, социально значимой для многих пациентов. Этими причинами обусловлен интерес к проблеме оценки регенераторного потенциала мукозальных эпителиоцитов и прогнозирования течения хронической трещины губы. Учитывая, что, по данным статистики, наблюдается рост предраковых заболеваний полости рта [1, 2, 4, 5], актуальность разработки путей решения обозначенной проблемы неоспорима.

Целью исследования явилось изучение факторов, влияющих на скорость эпителизации хронической трещины губы.

Материалы и методы исследования. За период с 2007 г. по 2014 г. на клинической базе кафедры терапевтической стоматологии ГБОУ ВПО «Казанский ГМУ» Минздрава России (г. Казань) и ООО «Эксклюзив-Дент плюс» (г. Казань)

было обследовано 70 пациентов в возрасте от 18 до 87 лет, из них 46 мужчин и 23 женщины с хронической трещиной верхней и нижней губ. Гендерное соотношение в группе исследования было следующим: мужчины : женщины = 2 : 1. Данные пациенты составили группу исследования, критериями включения в которую были: наличие хронической трещины верхней и/или нижней губы, неотягощённый соматический и аллергологический анамнезы, согласие пациентов на участие в проведении исследований. Критериями исключения послужили: наличие в анамнезе травматических повреждений и хирургических вмешательств на тканях красной каймы губы, повлекшие за собой рубцовые изменения; наличие в анамнезе косметологических вмешательств с целью изменения объёма (полноты) губ; приём психотропных лекарственных препаратов, изменяющих дискриминационную чувствительность (как проявление их побочного эффекта); приём кортикостероидных препаратов системного действия, повлекших за собой изменение (увеличение) объёма губ как проявление побочного эффекта (*facies lunata*); отказ пациента от участия в проведении исследования на любом его этапе, отсутствие сифилитических и иных инфекционных заболеваний с проявлениями на красной кайме губы. Группу сравнения составили 70 пациентов сопоставимого возраста и пола, не отягощённые заболеваниями красной каймы губ и обратившиеся в указанные лечебные учреждения стоматологического профиля с целью проведения плановой санации.

У всех пациентов проводился сбор анамнеза с уточнением жалоб, давности заболевания, частоты рецидивов, наличия вредных привычек облизывания и/или кусания губ, злоупотребления алкоголем и табакокурением. Пациентам проводили внешний осмотр (оценивали состояние кожи лица и периоральной области, регионарных лимфатических узлов подчелюстной, подбородочной, затылочной областей, верхних шейных лимфатических узлов); при обследовании красной каймы губ обращали внимание на размер (объём), наличие сухости, шелушения, чешуек, корок, трещин, эрозий, язв, состояние слизистой оболочки верхней и нижней губы. При наличии трещины на красной кайме губы проводили обследование собственно линейного дефекта (определяли локализацию, глубину, наличие кровяной корки, налета, кровоточивости, болезненности, измеряли размер при помощи линейки и/или циркуля Вебера, сроки эпителизации дефекта) и периферическую область трещины (определяли наличие отека, гиперемии по краям дефекта, инфильтрата в основании, болезненности при пальпации).

Осмотр и оценку состояния преддверия полости рта и собственно ротовой полости проводили по общепринятой методике. Определяли также отягощённость хроническими воспалительными заболеваниями пародонта, полноту губ (см³) методом измерения латеральных границ и толщины верхней и нижней губы, дискриминационной чувствительности с помощью циркуля Вебера (мм).

Для определения регенераторного потенциала тканей красной каймы губ применяли иммуногистохимический метод, с помощью которого возможно определить степень экспрессии биомаркера ki-67 в очагах поражения. Биомаркёр ki-67 представляет собой антиген ядра клеток во всех фазах клеточного цикла, кроме G0. По уровню экспрессии данного биомаркёра можно судить о пролиферативной активности клеток [6–8].

Для этой цели изучены биоптаты 72 пациентов с диагнозом «рак губы» (метод копии-пары, или метод парных сочетаний). Забор биологического материала проводился под местным обезболиванием 2% раствором новокаина, с

последующей фиксацией биоптата в 10% формалине. В лаборатории молекулярной онкологии Республиканского клинического онкологического диспансера Министерства здравоохранения Республики Татарстан биоптаты заливались в парафиновые блоки; парафиновые гистологические срезы окрашивались гематоксилином+эозином. Был изготовлен мультиблок ТМА (технология tissue microarray). Были определены репрезентативные участки на стеклах для последующего иммуногистохимического исследования. Для каждого случая выбраны, как минимум, 2 точки из очага поражения. Для технического выполнения мультиблока использован программно-аппаратный комплекс ТМА Master (3DHISTECH Ltd, Венгрия). Был выполнен забор образцов из ранее изготовленных парафиновых блоков (в виде столбиков диаметром 2 мм) и имплантация их в реципиентный мультиблок, просверленных под 84 образца (по формуле 7×12). Далее подготавливались срезы, проводилось дополнительное окрашивание. Подсчет индекса пролиферации ki-67 проводился с использованием морфометрической окулярной сетки Г.Г. Автандилова в 20 полях зрения, увеличение $\times 400$, при этом учитывалось 500 клеток. Для индекса ki-67 учитывались позитивно окрашенные ядра любой степени интенсивности.

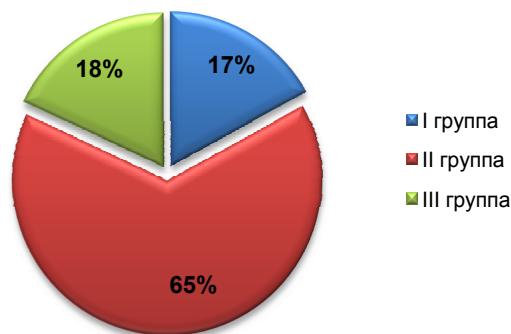
Полученные результаты подвергнуты статистической обработке с использованием критерия Шапиро – Уилка.

Результаты исследования и их обсуждение. Оценка отягощённости хроническими воспалительными заболеваниями пародонта показала, что у пациентов с хронической трещиной губы интактный пародонт имели 7% исследуемых, в то время как в группе сравнения этот показатель равен 12% ($p < 0,05$). Генерализованный гингивит и пародонтит лёгкого течения выявлены у 46% исследуемой группы и 23% группы сравнения ($p < 0,05$). Генерализованный пародонтит средней степени тяжести и тяжёлого течения у пациентов с хронической трещиной губы встречался в 10 раз чаще ($p < 0,05$) по сравнению с пациентами группы сравнения. Известно, что длительно существующий очаг хронической пародонтальной инфекции как качественно, так и количественно изменяет бактериологический статус полости рта; при этом создаются условия для вторичного инфицирования дефекта эпителия на красной кайме губы [3]. Установлено, что средние сроки эпителизации хронической трещины губы у пациентов с интактным пародонтом составили $8,4 \pm 1,6$ сут., тогда как при отягощённости воспалительно-деструктивными заболеваниями пародонта – $14,7 \pm 3,2$ сут. ($p < 0,05$).

Результаты измерения полноты губ позволили ранжировать пациентов исследуемой группы на 3 подгруппы: первую составили 27 пациентов с объёмом верхней и нижней губы, соответственно, 11 см^3 и 9 см^3 («тонкие» губы). Во вторую подгруппу вошли 32 пациента с объёмом губ, соответственно, $11\text{--}18 \text{ см}^3$ и $9\text{--}14 \text{ см}^3$ (губы «средней полноты»). Пациенты третьей подгруппы, 11 человек, имели объём верхней губы свыше 18 см^3 и нижней более 14 см^3 («полные» губы). При оценке сроков эпителизации эпителиальных дефектов выявлено, что последняя полностью завершается в течение $7,2 \pm 1,9$ сут. у пациентов с тонкими губами, $13,4 \pm 3,1$ сут. у пациентов с губами средней полноты, $15,5 \pm 3,2$ сут. у пациентов с полными губами. Сроки эпителизации у пациентов с тонкими губами достоверно ($p < 0,05$) отличаются от аналогичных у пациентов с большим объёмом губ. Отметим, что у пациентов с полными губами имело место длительное сохранение перифокального отёка после полной эпителизации дефекта.

Результаты изучения дискриминационной чувствительности свидетельствуют о снижении её в области срединного бугорка верхней губы и центральной перетяжки нижней губы у пациентов с полными губами – до $3,6 \pm 0,2$ мм (в группе сравнения – $1,4 \pm 0,1$ мм, $p < 0,05$). У пациентов с тонкими губами значения изучаемого показателя были сопоставимыми с таковыми у пациентов группы сравнения. Установлена обратная корреляционная зависимость между полнотой губ и дискриминационной чувствительностью, $r = 0,69$, для пациентов с полными губами.

На основании полученных при микроскопическом исследовании окрашенных биоптатов на маркёр ki-67 всех пациентов разделили на 3 группы. В первую группу вошли 9 пациентов (из них 3 женщины и 6 мужчин, средний возраст 70,4 года). Степень экспрессии в процентном соотношении в данной группе определилась от 0% до 30%. Вторую группу составили 33 человека (из них 11 женщин, 22 мужчины, средний возраст – 70 лет, возраст находился в диапазоне от 51 года до 93 лет). Данная группа явилась самой многочисленной. Окрашивание биопсийного материала выявило значения индекса изучаемого от 31% до 50%. III группу образовали пациенты, биопсийный материал которых имел индекс окраски от 51% до 90%. В группу вошли 9 человек, из них 2 женщины и 5 мужчин, средний возраст составил 70,42 года (рисунок).



Распределение пациентов по группам
в зависимости от значений индекса ki-67

Степень распространения очагов поражения в I группе показала $T_1N_0M_0$, однако чаще $T_2N_0M_0$. Длительность заболевания была не менее 6 месяцев, а размер очага поражения на губе находился в пределах 1,5–1,8 см до 2,5 см.

Вторая группа имела распространение более широкое $T_{2-4}N_0M_0$, однако единичные пациенты имели $T_1N_0M_0$. Давность заболевания определялась в диапазоне от 6 месяцев до 1-2 лет. Возрастной состав всех трех групп был одинаков, однако диапазон I и II групп был более широк, в отличие от III группы.

Пациенты I группы имели инфильтративно-язвенный характер поражений, в то время как во второй группе преобладали эрозивные, сочетание двух очагов, а также суб- и тотальные поражения губы.

III группа имеет схожие данные с I и II группой по распространенности опухоли по системе TNM, при этом отношение $T_1N_0M_0 / T_2N_0M_0$ определилось как 1:1. Длительность заболевания пациенты отмечали менее 1 года (в некоторых случаях до 1-2 месяцев). Размер очага имел не более 1 см в диаметре.

В ходе анализа полученных данных нам удалось установить зависимость степени экспрессии ki-67 со степенью распространённости опухолевого про-

цесса по TNM ($p \approx 0,71$), длительностью заболевания ($p \approx 0,52$) и размером очага поражения ($p \approx 0,59$). Однако высокий уровень экспрессии данного биологического маркера не может свидетельствовать о продвинутой и распространенности опухолевого процесса.

Выводы. Таким образом, настоящим исследованием предпринята попытка определить круг факторов, оказывающих влияние на регенераторный потенциал эпителиоцитов красной каймы губы при хронической трещине. Полученные нами результаты позволяют заключить, что отягощенность воспалительно-деструктивными заболеваниями пародонта, наличие конституционального фактора – полных губ, снижение дискриминационной чувствительности оказывают влияние на сроки эпителизации. Весьма дискуссионна роль уровня экспрессии биомаркера ki-67, поскольку на сегодняшний день мы не располагаем его единым референсным уровнем, а также достоверными критериями отличия повышенного и низкого уровня этого антигена [9, 10, 12, 17]. Предложенное в нашей работе ранжирование уровней ki-67 носит эмпирический характер, при этом в основу положены особенности клинических проявлений опухолевого процесса, возникшего как результат злокачественной трансформации клеток.

В заключение отметим, что поиск информативных критериев, в том числе биомаркеров [11, 13–16], позволяющих с определенно высокой точностью определить регенераторный потенциал клеток, весьма актуален, поскольку открывает перспективы дифференцированных подходов к назначению лекарственных препаратов, стимулирующих регенерацию.

Литература

1. Белева Н.С. Совершенствование диагностики и комплексного лечения в системе диспансеризации больных красным плоским лишаем слизистой оболочки полости рта: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Пермь, 2010. 23 с.
2. Битюцкий П.Г. Диагностика и лечение рака нижней части губы // Медицинская консультация. 1997. № 3. С. 29–36.
3. Брусенина Н.Д., Рыбалкина Е.А. Заболевания губ. М.: МИА, 2005. 186 с.
4. Буляков Р.Т. Обоснование и подходы к профилактике рака слизистой полости рта, языка, губы: дис. ... канд. мед. наук. Уфа, 2003. 21 с.
5. Виноградов И.Ю. Клинико-морфологические факторы прогноза при раке нижней губы и их влияние на результаты лечения: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Рязань, 2003. 22 с.
6. Делекторская В.В. Иммуногистохимическое исследование экспрессии Е-кадгерина, бета-катенина и CD44v6 в клетках первичного рака толстой кишки и его метастазов // Архив патологии. 2005. Т. 67, № 6. С. 34–38.
7. Камышиников В.С. Онкомаркеры: методы определения, референтные значения, интерпретация тестов. М.: МЕДпресс-информ, 2001. 128 с.
8. Кочурова Е.В. Значение онкомаркеров слюнной жидкости при плоскоклеточном раке органов полости рта: дис. ... канд. мед. наук. М., 2009. 104 с.
9. Acaay R.R., Felizzola C.R. Evaluation of proliferative potential in oral lichen planus and oral lichenoid lesions using immunohistochemical expression of p53 and Ki67. *Oral Oncol.*, 2006, vol. 42, no. 5, pp. 475–480.
10. Brown C.G., Wingard J. Clinical consequences of oral mucositis. *Oncol Nurs.*, 2004, no. 20(1), pp. 16–21.
11. De Sousa F.A., Paradella T.C., Carvalho Y.R. Comparative analysis of the expression of proliferating cell nuclear antigen, p53, bax, and bcl-2 in oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma. *Annals of Diagnostic Pathology*, 2009, vol. 13, no. 5, pp. 308–312.
12. Ebrahimi M., Boldrup L., Wahlin Y.B. Decreased expression of the p63 related proteins beta-catenin, E-cadherin and EGFR in oral lichen planus. *Oral. Oncol.*, 2008, vol. 44, no. 7, pp. 634–638.
13. Ibrahim S.O., Johannessen A.C., Vaststrand E.N. et al. Immunohistochemical detection of p53 in archival formalin-fixed tissues of lip and intraoral squamous cell carcinomas from Norway. *APMIS*, 1997, no. 10, pp. 757–764.
14. Kyzas P.A., Stefanou D., Agnantis N.J. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor correlates with positive surgical margins and recurrence in T1 and T2 squamous cell carcinoma (SCC) of the lower lip. *Oral Oncol.*, 2004, no. 9, pp. 941–947.

15. Murti P.R. P53 expression in oral precancer as a marker for malignant potential. *J. of Oral Pathology & Medicine*, 1998, vol. 27, no. 5, pp. 191–196.
16. Ostwald C., Hillmann P., Schweder J. et al. P53 mutational spectra are different between squamous-cell carcinomas of the lip and the oral cavity. *Int J. Cancer.*, 2000, no. 1, pp. 82–86.
17. Spira A., Beane J., Pinto-Plata V. et al. Gene Expression Profiling of Human Lung Tissue from Smokers with Severe Emphysema. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2004, no. 31(6), pp. 601–610.

References

1. Beleva N.S. *Sovershenstvovanie diagnostiki i kompleksnogo lecheniya v sisteme dispanserizatsii bol'nykh krasnym ploskim lishaem slizistoi obolochki polosti rta: avtoref. dis. ... kand. med. nauk* [Improving the diagnosis and treatment of complex medical examination of the system of patients lichen planus of the oral mucosa. Abstract of PhD thesis]. Perm, 2010, 23 p.
2. Bityutskii P.G. Diagnostika i lechenie raka nizhnei chasti guby [Diagnosis and treatment of the bottom of the lip cancer]. *Meditsinskaya konsultatsiya* [Medical consultation], 1997, no. 3, pp. 29–36
3. Brusenina N.D., Rybalkina E.A. *Zabolevaniya gub* [Diseases of lips]. Moscow, MIA Publ., 2005, 186 p.
4. Bulyakov, R.T. *Obosnovanie i podkhody k profilaktike raka slizistoi polosti rta, yazyka, guby: dis. ... kand. med. nauk* [Rationale for and approaches to the prevention of cancer of the oral mucosa, tongue, lips. Doct. Diss.]. Ufa, 2003, 21 p.
5. Vinogradov I.Yu. *Kliniko-morfologicheskie faktory prognoza pri rake nizhnei guby i ikh vliyanie na rezul'taty lecheniya: avtoref. dis. ... kand. med. nauk* [Clinico-morphological prognostic factors in cancer of the lower lip, and their impact on health outcomes. Abstract of PhD thesis]. Ryazan, 2003, 22 p.
6. Delektorskaya V.V. *Immunogistokhimicheskoe issledovanie ekspressii E-kadgerina, beta-katenina i CD44v6 v kletkakh pervichnogo raka tolstoi kishki i ego metastazov* [Immunohistochemical study expression E-cadherin and beta-catenin in cells CD44v6 primary colon cancer and its metastases]. *Arkhiv patologii*, 2005, vol. 67, no. 6, pp. 34–38.
7. Kamysnikov V.S. *Onkomarkery: metody opredeleniya, referentnye znacheniya, interpretatsiya testov* [Tumor markers: the methods of determining reference values, the interpretation of tests]. Moscow, MEDpress-inform Publ., 2001, 128 p.
8. Kochurova, E.V. *Znachenie onkomarkerov slyunnoi zhidkosti pri ploskokletochnom rake organov polosti rta: dis. ... kand. med. nauk* [Value of tumor markers of salivary fluid with squamous cell carcinoma of the oral cavity. Doct. Diss.]. Moscow, 2009, 104 p.
9. Acay R.R., Felizzola C.R. Evaluation of proliferative potential in oral lichen planus and oral lichenoid lesions using immunohistochemical expression of p53 and Ki67. *Oral Oncol.*, 2006, vol. 42, no. 5, pp. 475–480.
10. Brown C.G., Wingard J. Clinical consequences of oral mucositis. *Oncol. Nurs.*, 2004, no. 20(1), pp. 16–21.
11. De Sousa F.A., Paradella T.C., Carvalho Y.R. Comparative analysis of the expression of proliferating cell nuclear antigen, p53, bax, and bcl-2 in oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma. *Annals of Diagnostic Pathology*, 2009, vol. 13, no. 5, pp. 308–312.
12. Ebrahimi M., Boldrup L., Wahlin Y.B. Decreased expression of the p63 related proteins beta-catenin, E-cadherin and EGFR in oral lichen planus. *Oral. Oncol.*, 2008, vol. 44, no. 7, pp. 634–638.
13. Ibrahim S.O., Johannessen A.C., Vasstrand E.N. et al. Immunohistochemical detection of p53 in archival formalin-fixed tissues of lip and intraoral squamous cell carcinomas from Norway. *APMIS*, 1997, no. 10, pp. 757–764.
14. Kyzas P.A., Stefanou D., Agnantis N.J. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor correlates with positive surgical margins and recurrence in T1 and T2 squamous cell carcinoma (SCC) of the lower lip. *Oral Oncol.*, 2004, no. 9, pp. 941–947.
15. Murti P.R. P53 expression in oral precancer as a marker for malignant potential. *J. of Oral Pathology & Medicine*, 1998, vol. 27, no. 5, pp. 191–196.
16. Ostwald C., Hillmann P., Schweder J. et al. P53 mutational spectra are different between squamous-cell carcinomas of the lip and the oral cavity. *Int J. Cancer.*, 2000, no. 1, pp. 82–86.
17. Spira A., Beane J., Pinto-Plata V. et al. Gene Expression Profiling of Human Lung Tissue from Smokers with Severe Emphysema. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2004, no. 31(6), pp. 601–610.

МУХАМЕДЖАНОВА ЛЮБОВЬ РУСТЕМОВНА – доктор медицинских наук, профессор кафедры пропедевтики стоматологических заболеваний и новых технологий, Чувашский государственный университет, Россия, Чебоксары (lr71@bk.ru).

MUKHAMEDZHANOVA LYUBOV – Doctor of Medical Sciences, Professor, Department of Propaeudics of Dental Diseases and New Technologies, Chuvash State University, Russia, Cheboksary.

ЕГОРОВ МИХАИЛ АЛЕКСЕЕВИЧ – директор стоматологической клиники «Профессионал», врач-стоматолог терапевт, ортопед, Россия, Казань (misheerr@mail.ru).

EGOROV MIKHAIL – Director of Dental Clinic «Professional», Dentist, Russia, Kazan.
