УДК 616.311-003.87-091.8

К вопросу о папилломавирусном генезе лейкоплакии слизистой оболочки рта

И.И. БАБИЧЕНКО[1], О.Ф. РАБИНОВИЧ[2], А.А. ИВИНА[1], И.М. РАБИНОВИЧ[2], А.А. ТОГОНИДЗЕ[2]

[1]Кафедра патологической анатомии (зав. — проф. И.И. Бабиченко) медицинского факультета ФГБОУ ВПО «Российский университет дружбы народов»; [2]Отделение патологии слизистой оболочки рта (зав. — д-р мед. наук О.Ф. Рабинович) ФГБУ ЦНИИС и ЧЛХ Минздрава России, Москва

Papillomavirus in the genesis of oral leukoplakia

I.I. BABICHENKO[1], O.F. RABINOVICH[2], A.A. IVINA[1], I.M. RABINOVICH[2], A.A. TOGONIDZE[2]

[1]Department of Pathological Anatomy, Medical Faculty, Peoples' Friendship University of Russia; [2]Department of Oral Pathology, Central Research Institute of Dentistry and Maxillofacial Surgery, Ministry of Health of Russia, Moscow

Проведено иммуногистохимическое исследование пролиферативной активности клеток по экспрессии белка Ki-67 и локализации белков, связанных с инфицированием эпителиальных клеток папилломавирусной инфекцией $P16^{INK4a}$ и HPV16 в различных клеточных зонах неизмененной слизистой оболочки, при лейкоплакии с явлениями гиперплазии и дисплазии и плоскоклеточном раке. Выявлена положительная корреляция между пролиферативной активностью клеток в парабазальной клеточной зоне и экспрессией белка $P16^{INK4a}$ при лейкоплакии слизистой оболочки с явлениями гиперплазии (r_s=0,397, p=0,018). При лейкоплакии слизистой оболочки с диспластическими изменениями выявлены положительная корреляция между пролиферацией клеток в парабазальном и шиповатом клеточном слое и локализацией антигенов HPV 16-го типа (r_s=0,515, p=0,041 и r_s=0,651, p=0,006). Выявление папилломавирусной инфекции при лейкоплакии, позволяет решать не только вопросы ее генеза, но и является морфологической основой для проведения эффективной профилактики и лечения этого часто встречающегося заболевания слизистой оболочки рта.

Ключевые слова: лейкоплакия, слизистая оболочка рта, иммуногистохимия, вирус папилломы человека 16-го типа, Ki-67, $P16^{INK4a}$.

Immunohistochemical examination of the proliferative activity of cells was made investigating the expression of Ki-67 protein and the location of proteins associated with epithelial cell papillomavirus infection involving $P16^{INK4a}$ and HPV16 proteins in different cell areas of the intact mucosa, in leukoplakia with the signs of hyperplasia and dysplasia, and in squamous cell carcinoma. There was a positive correlation between the proliferative activity of cells in the parabasal cell areas and the expression of $P16^{INK4a}$ protein in oral leukoplakia with the signs of hyperplasia (r_s=0.397; p=0.018). In oral leukoplakia with dysplastic changes, there was a positive correlation between the proliferation of cells in the parabasal and prickle cell layers and the location of HPV type 16 antigens (r_s=0.515; p=0.041 and r_s=0.651; p=0.006). Detection of papillomavirus infection in leukoplakia can solve not only the problems with its genesis, but this is also a morphological basis for the effective prevention and treatment of this common oral mucosal disease.

Key words: leukoplakia, oral mucosa, immunohistochemistry, human papillomavirus 16 type, Ki-67, $P16^{INK4a}$.

Лейкоплакия — это наиболее часто встречающееся потенциально злокачественное поражение слизистой оболочки рта (СОР) [1, 2]. Лейкоплакия относится к разновидности гиперкератозов, характеризующихся хроническим течением и поражающих СОР и красную кайму губ [3]. При микроскопическом исследовании, когда клинически установлен диагноз «лейкоплакия», в 80—85% случаев обнаруживают гиперкератоз с гиперплазией базального и парабазального клеточного слоя, в 5—15% — гиперкератоз с различной степенью дисплазии, а в 2—5% — плоскоклеточный рак [4].

Факторы, приводящие к развитию лейкоплакии, полиэтиологичны. К ним относятся травмы механического, химического, термического генеза, генетическая предрасположенность. Около 70—90% случаев заболевания лейкоплакией СОР связано с курением, имеется прямая зависимость между частотой и длительностью курения и развитием лейкоплакии СОР [5, 6], в то же время факторы, вызывающие идиопатическую лейкоплакию, неизвестны.

В настоящее время выявлена связь развития лейкоплакии с наличием вируса папилломы человека (HPV) [7]. Папилломавирус человека — это небольшой ДНК-содержащий вирус, который проявляет тропизм к многослойному плоскому эпителию. В настоящее время идентифицировано около 120 типов HPV. HPV высокого онкогенного риска является причиной около 40% случаев заболевания раком СОР [8]. Репликации вируса HPV осуществляется только в пролиферирующих эпителиальных клетках СОР. В связи с этим выявление подобных клеток с помощью иммуногистохимического маркера пролиферации Ki-67 может служить дополнительным критерием предраковых состояний, поскольку известно, что при уве-

© Коллектив авторов, 2014

Бабиченко Игорь Иванович — д-р мед. наук, проф., зав. каф. патологической анатомии; e-mail: babichenko@list.ru

Таблица 1. **Соотношение экспрессии Ki-67, P16^{INK4a} и антигенов HPV16 при различных морфологических вариантах лейкоплакии СОР**

№ п/п	Показатель	n	Ki-67 (базальный слой)	Ki-67 (парабазальный слой)	Ki-67 (шиповатый слой)	P16^{INK4a}, %	HPV16, %
			M±*SD*, %				
1	Неизмененный эпителий	10	92,1±3,6	0	0	60	20
2	Лейкоплакия с гиперплазией	35	58,5±36,2*	38,4±24,1**	0,3±1,7$^{\#\#}$	77	34
3	Лейкоплакия с SIN	16	45,9±33,1*	38,1±21,5**	16,4±14,7$^{***\#\#}$	75	50
4	Плоскоклеточный рак	21	Периферия		Центр	Периферия	Центр
			60,5±25,3$^{*\#,**}$		39,3±30,6$^{***\#\#}$	86	62

Примечание. *— достоверные различия между 1—2, 1—3, 1—4, $^{\#}$ — между 3—4; ** — достоверные различия между 1—2, 1—3, 1—4; *** — между 1—3, 1—4, $^{\#\#}$ — между 2—3, 2—4, 3—4.

Таблица 2. **Коэффициент корреляции Спирмена между процентом пролиферирующих клеток и экспрессией P16^{INK4a} и антигенов HPV16 при различных морфологических вариантах лейкоплакии СОР**

Показатель	n	Ki-67 (базальный слой)		Ki-67 (парабазальный слой)		Ki-67 (шиповатый слой)	
		r_s, p					
		P16^{INK4a}	HPV16	P16^{INK4a}	HPV16	P16^{INK4a}	HPV16
Неизмененный эпителий	10	–0,284	–0,522	0	0	0	0
		0,426	0,1215	1,000	1,000	1,000	1,000
Лейкоплакия с гиперплазией	35	–0,317	–0,474	0,397	0,228	0,166	–0,030
		0,064	0,004	0,018	0,187	0,339	0,863
Лейкоплакия с SIN	16	0,235	0,298	0,094	0,515	0,266	0,651
		0,380	0,260	0,728	0,041	0,318	0,006
Плоскоклеточный рак	21	Периферия				Центр	
		P16^{INK4a}		HPV16		P16^{INK4a}	HPV16
		0,022		0,390		–0,157	–0,211
		0,923		0,080		0,495	0,358

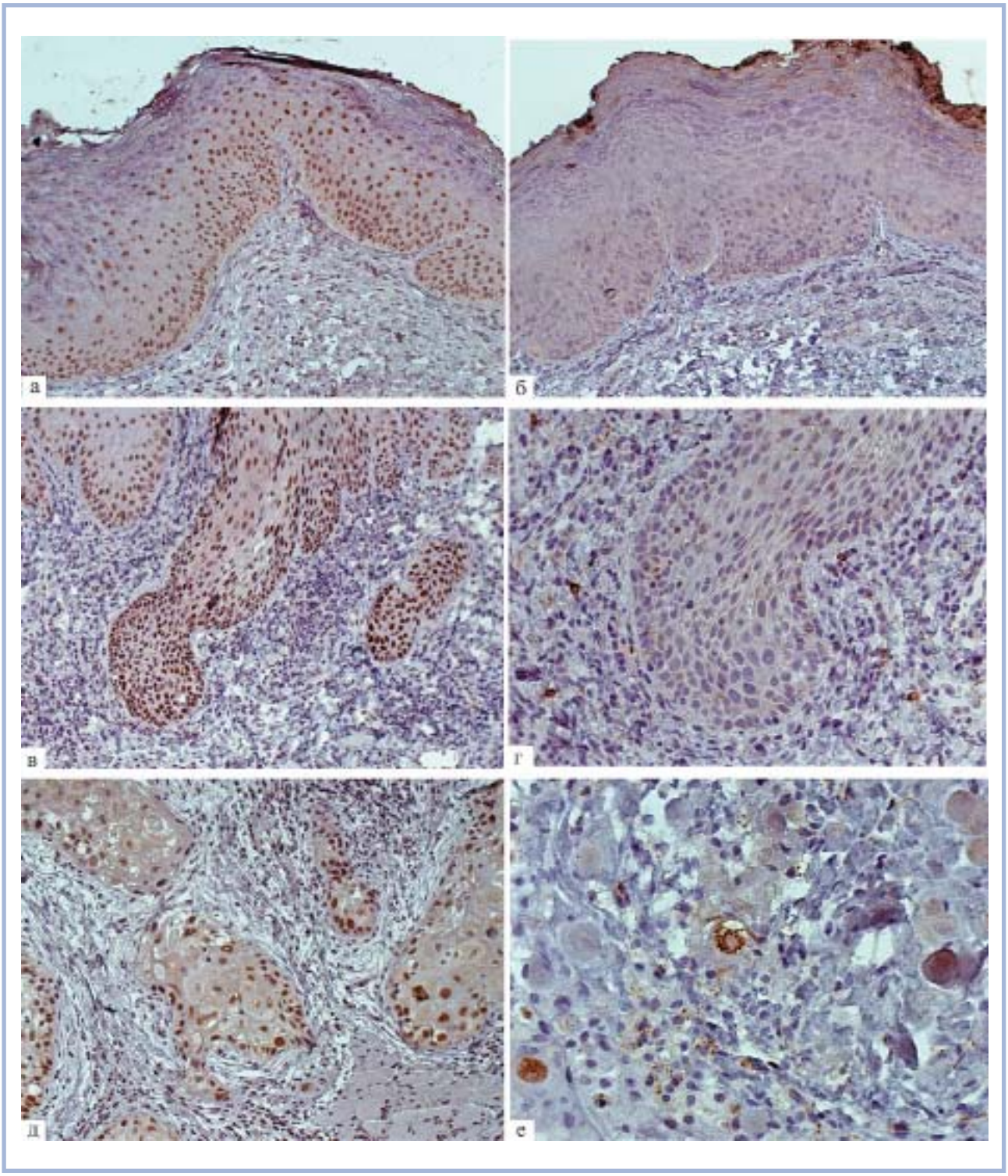
личении степени дисплазии количество пролиферирующих клеток, экспрессирующих белок Ki-67 в эпителии СОР, возрастает [9, 10].

HPV активизирует пролиферативную активность эпителиальных клеток за счет блокирования белка P16^{INK4a}. Ген *P16^{INK4a}* располагается на участке хромосомы 9p21, содержит три экзона и кодирует ядерный фосфопротеин с молекулярной массой 16 кД. Функция белка данного гена заключается в торможении клеточного цикла за счет связывания циклинзависимых киназ 4 и 6 и взаимодействия с циклином D1 [11].

В связи с вышеизложенным целью настоящего исследования было выявление белков Ki-67, P16^{INK4a} и антигенов папилломавируса человека высоко риска (HPV16) при гиперплазии, дисплазии и плоскоклеточном раке СОР.

Были исследованы биоптаты СОР 82 пациентов, в том числе 42 женщин и 40 мужчин. Средний возраст больных составил 62 года. При проведении гистологического исследования в качестве контрольной группы был взят неизмененный эпителий, прилегающий к участкам лейкоплакии. Гистологическая оценка исследуемого материала была выполнена согласно классификации ВОЗ (2005). Установлено 10 (12%) участков неизмененной слизистой, 35 (43%) образцов лейкоплакии без атипии, 16 (20%) биоптатов лейкоплакии с дисплазией различной степени от SIN 1 до SIN 3; у 21 (25%) пациента выявлен плоскоклеточный рак.

Материал фиксировали в 10% нейтральном формалине (pH 7,4), после проводки на гистопроцессоре образцы заливали в парафин с температурой плавления 54 °С. Для гистологического и иммуногистохимического (ИГХ) исследования серийные срезы толщиной 5 мкм помещали на стекла, покрытые поли-L-лизином. Выявление тканевых антигенов осуществляли с помощью поликлональных кроличьих антител к вирусу папилломы человека 16-го типа (ABBIOTEC) в разведении 1:400 и моноклональных антител P16^{INK4a} (clon EPR1473, EPITOMICS) — 1:200 и Ki-67 (MM1, «Diagnostic Biosystems») — 1:100. Выявление иммунных комплексов проводили при помощи безбиотиновой системы детекции на основе пероксидазы хрена (N-Histofine, Япония), срезы докрашивали гематоксилином Майера. Реакцию к вирусу папилломы человека 16-го типа и P16^{INK4a} оценивали качественно по клеточным зонам: в базальном, парабазальном и шиповатом клеточном слое, в плоскоклеточном раке оценивали периферическую и центральную зону распределения опухолевых клеток. Индекс пролиферации Ki-67 (ИП Ki-67) оценивали также по клеточным зонам, определяли отношение количества иммунореактивных ядер клеток к общему числу ядер (в %). Оценку показателей осуществляли в соответствующих участках тканей. Подсчет клеток проводили при увеличении в 400 раз. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы Statistica 10.0. стандартными методами с определением средней арифметической (*M*) и среднего квадратического отклонения (σ). Учитывая ненормальное распределение отдельных статистических показателей, сравнение двух независимых групп осуществляли непараметрическим



ИГХ-реакция при лейкоплакии с гиперплазией эпителия (а, б), SIN (в, г) и плоскоклеточном раке (д, е) СОР с антителами к $P16^{INK4a}$ (а, в, д) и HPV16 (б, г, е).

Окраска ДАБ-гематоксилином Майера (а—в — ×120; г—е — ×240).

методом при помощи *U*-критерия Манна—Уитни. Достоверными считали различия средних при уровне статистической значимости $p<0,05$. С помощью коэффициента *r* **(табл. 2)** Спирмена изучали корреляционные отношения между пролиферативной активностью клеток (по экспрессии белка Ki-67) при лейкоплакии с явлениями гиперплазии, дисплазии, плоскоклеточном раке и выраженностью экспрессии антигенов вируса папилломы человека (16-го типа) и $P16^{INK4a}$.

ИГХ-исследование эпителия СОР выявило особенности экспрессии белков, характеризующих пролиферативные процессы и вирусные антигены при различных морфо-

логических проявлениях лейкоплакии, характеризующие репликацию вируса папилломы человека в пролиферирующих клетках многослойного плоского эпителия.

При ИГХ-исследовании неизмененного эпителия пролиферирующие клетки выявляли только в базальном слое, при этом в 6 случаях в ядрах клеток всех слоев определяли белок P16^{INK4a}, а в 2 случаях — белок HPV16. В клиническом материале при лейкоплакии с гиперплазией СОР и явлениями гиперкератоза экспрессию белка Ki-67 выявляли в ядрах эпителиальных клеток базального и парабазального слоя. При данном виде патологии отмечали экспрессию белка P16^{INK4a} в ядрах многослойного плоского эпителия всех исследованных зон в 77% случаев, а также положительную реакцию на вирусные антигены HPV16 в 34%. На **рисунке** продемонстрированы положительное ИГХ-окрашивание ядер эпителиальных клеток на белок P16^{INK4a} и отрицательная реакция на вирусные антигены HPV16 **(см. рисунок, а, б)**. При лейкоплакии СОР с явлениями SIN количество пролиферирующих клеток увеличилось в парабазальной области и зоне шиповатых клеток **(табл. 1)**. В этих же зонах в 75% случаев выявляли экспрессию белка P16^{INK4a} **(см. рисунок, в)** и в 50% — антигены HPV16 в виде небольших включений в клеточные ядра и цитоплазму **(см. рисунок, г)**. При плоскоклеточном раке в периферических и центральных клеточных зонах количество пролиферирующих клеток значительно увеличилось по сравнению с гиперплазией и SIN, в этих же областях в 86% случаев отмечена высокая ядерная экспрессия белка P16^{INK4a} и в 62% случаев — включения антигенов HPV16 в клеточные ядра и цитоплазму **(см. рисунок, д, е)**.

Проведенный статистический анализ выявил высокие корреляционные связи между пролиферацией клеток в парабазальном слое при лейкоплакии с гиперплазией и экспрессией белка P16^{INK4a}, а также при лейкоплакии с дисплазией в парабазальном и шиповатом клеточном слое и наличием антигенов HPV16 **(см. табл. 2)**.

Проведенные исследования показали, что при различных морфологических вариантах лейкоплакии от гиперплазии с гиперкератозом до плоскоклеточного рака в эпителиальных клетках многослойного плоского эпителия выявляются антигены вируса папилломы человека высокого риска HPV16 и белки, ассоциированные с HPV (P16^{INK4a}). Белок P16^{INK4a} тормозит формирование опухолей за счет блокирования циклинзависимых киназ (cdk4) за счет блокировки cdk4- и cdk6-вызванного pRb фосфорилирования, приводящего к торможению E2F-зависимой транскрипции, и осуществление клеточного цикла от точки сравнения G1 до S [12]. Подавление экспрессии гена *P16^{INK4a}* за счет гиперметилирования или мутации часто наблюдается в большинстве раковых клеточных линий и первичных опухолей человека. Таким образом, повышенная экспрессия гена *P16^{INK4a}* является непрямым маркером HPV, отражающим нарушение механизмов, контролирующих клеточную пролиферацию и характеризующим персистирование инфекции с высоким риском развития неоплазии [13, 14].

Учитывая тот факт, что в настоящее время идентифицировано более 120 типов HPV, выявлять их антигены с помощью ИГХ-методики не представляется возможным. Этот факт может объяснить низкий процент выявления антигенов HPV 16-го типа при гиперплазии СОР с гиперкератозом на фоне высокой экспрессии P16^{INK4a}, скорее всего вызванной папилломавирусами других типов.

ИГХ-исследования показывают, что P16^{INK4a} интенсивно экспрессируется в 100% случаев дисплазии и рака слизистой шейки матки, но редко выявляется в неизменной слизистой оболочке [14, 15]. В серии диспластических поражений высокой степени коэффициент соответствия P16^{INK4a}-окрашивания составляет 100% [16]. В подобных исследованиях экспрессия P16^{INK4a} выявляет дисплазию шейки матки низкой степени, которая может прогрессировать в более выраженную дисплазию или карциному.

В настоящих исследованиях выявлена достоверная связь между SIN и HPV 16-го типа. Однако существуют самые противоречивые данные относительно наличия HPV-инфекции в эпителиальных клетках СОР при предраковых и раковых поражениях, начиная от 0 до 100% [17, 18]. Причина подобных расхождений скорее всего кроется в методических особенностях выбора образцов, методик исследования HPV и др. [19].

Заключение

При различных морфологических вариантах лейкоплакии в эпителиальных клетках многослойного плоского эпителия слизистой оболочки рта обнаруживается повышенная пролиферативная активность клеток с экспрессией в клеточных ядрах белка Ki-67 и маркеров, которые непосредственно (HPV16) или косвенно (P16^{INK4a}) связаны с вирусом папилломы человека. При простой гиперплазии с гиперкератозом выявляется только белок P16^{INK4a}, при плоскоклеточной интраэпителиальной неоплазии с гиперкератозом и плоскоклеточном раке — P16^{INK4a} и антигены вируса папилломы человека высокого риска (HPV16).

Выявление папилломавирусной инфекции при лейкоплакии позволяет не только определять ее генез, но и является морфологической основой для проведения эффективной профилактики и лечения этого часто встречающегося заболевания слизистой оболочки рта.

ЛИТЕРАТУРА

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. *Рабинович О.Ф., Бабиченко И.И., Рабинович И.М., Островский А.Д., Тогонидзе А.А.* Оптимизация диагностики различных форм лейкоплакии. Стоматология. 2012; 3: 20—2.
4. *Brandwein-Gensler M.S.* Lesions of the oral cavity. In: Diagnostic surgical pathology of the head and neck. Philadelphia: Saunders/Elsevier; 2009: 191—308.
5. *Neville B., Damm D., Allen C., Bouquot J.* Oral and maxillofacial pathology. St. Louis: Saunders/Elsevier; 2009.
6. *Dietrich T., Reichart P.A., Scheifele C.* Clinical risk factors of oral leukoplakia in a representive sample of the US population. Oral Oncology. 2004; 40 (2): 158—63.

7. *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.

8. *Parkin D.M., Bray F.* Chapter 2: the burden of HP-related cancers. Vaccine. 2006; 24 (Suppl. 3): 11—25.

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. *Бабиченко И.И., Григорьян А.С., Катушкина А.А.* Экспрессия кератина 8 при гиперкератозе и плоскоклеточном раке слизистой оболочки полости рта. Архив патологии. 2011; 73 (6): 18—21.

11. *Murphy N., Heffron C.C., King B., Ganuguapati U.G., Ring M., McGuiunness E.* p16INKA positivity in benign, premalignant and malignant cervical glandular lesions: a potential diagnostic problem. Virchows Arch. 2004; 445 (6): 610—5.

12. *Zhang H.S., Postigo A.A., Dean D.C.* Active transcriptional repression by the Rb-E2F complex mediates G1 arrest triggered by p16INKa, TGF-beta and contact inhibition. Cell. 1999; 97 (1): 53—61.

13. *Keating J.T., Cviko A., Riethdorf S., Riethdorf L., Quade B.J., Sun D. et al.* Ki-67, cyclin E and p16INKA are complementary surrogate biomarkers for human papilloma virus — related cervical neoplasia. Am. J. Surg. Pathol. 2001; 25 (7): 884—91.

14. *Klaes R., Friedrich T., Spitkovsky D., Ridder R., Rudy W., Petry U. et al.* Overexpression of p16(INKA) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. Int. J. Cancer. 2001; 92 (2): 276—84.

15. *Klaes R., Benner A., Friedrich T., Ridder R., Herrington S., Jenkins D. et al.* P16INKA immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. Am. J. Surg. Pathol. 2002; 26 (11): 1389—99.

16. *Murphy N., Ring M., Killalea A.G., Uhlmann V., O'Donovan M., Mulcahy F. et al.* p16INKa as a marker for cervical dyskaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep Smears. J. Clin. Pathol. 2003; 56 (1): 56—63.

17. *Hennessey P.T., Westra W.H., Califano J.A.* Human papillomavirus and head and neck squamous cell carcinoma: recent evidence and clinical implications. J. Dent. Res. 2009; 88 (4): 300—6.

18. *Ha P.K., Califano J.A.* The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis. Clin. Rev. Oral Biol. Med. 2004; 15 (4): 188—96.

19. *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

Поступила 16.09.2013