

МОЛОЧКОВА ЮЛИЯ ВЛАДИМИРОВНА

**АТИПИЧНЫЙ КРАСНЫЙ ПЛОСКИЙ ЛИШАЙ КОЖИ И СЛИЗИСТОЙ
ОБОЛОЧКИ РТА:**

**КЛИНИКА, ДИАГНОСТИКА, ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ
ДИАГНОСТИКА, СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ ЛЕЧЕНИЯ**

14.01.10 – кожные и венерические болезни

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Москва – 2019

Работа выполнена в Государственном бюджетном учреждении здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф.Владимирского»

Научные консультанты:

Доктор медицинских наук, профессор **Перламутров Юрий Николаевич**
 Доктор медицинских наук, профессор **Кильдюшевский Александр Вадимович**

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор **Корсунская Ирина Марковна**
 Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук, лаборатория физико-химических и генетических основ дерматологии, заведующая

доктор медицинских наук, профессор **Круглова Лариса Сергеевна**
 Федеральное государственное бюджетное учреждение дополнительного профессионального образования «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента Российской Федерации, проректор по учебной работе; кафедра дерматовенерологии и косметологии, заведующая

доктор медицинских наук, профессор **Юсупова Луиза Афгатовна**
 Казанская государственная медицинская академия - филиал Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра дерматовенерологии и косметологии, заведующая

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «___»_____201__г. в 14.00 часов на заседании Диссертационного совета Д 208.072.10 на базе ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И.Пирогова Минздрава России по адресу: 117997 Москва, ул. Островитянова д. 1 и на сайте <http://rsmu.ru>.

Автореферат разослан «___»_____201__года.

Ученый секретарь диссертационного совета
 Доктор медицинских наук, профессор

Шарова Наталья Михайловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

На сегодняшний день красный плоский лишай (КПЛ) остается актуальной проблемой не только в связи с его высокой распространенностью, но и в связи с отсутствием единой этиопатогенетической концепции. Этим в свою очередь обусловлено и отсутствие единой классификации КПЛ, хотя целый ряд авторов, по типу высыпных элементов, наряду с типичным КПЛ (тКПЛ) выделяет его атипичные клинические формы на коже (гипертрофическая, атрофическая, фолликулярная и др.) [Васильева Е.А. и др. 2017; Гаджимуратов М.Н. и др. 2009; Летаева О.В., 2012 ; Мигалова Е. М. и др. 2014; Михеев Г.Н. и др. 2014] и слизистой оболочке полости рта (эрозивно-язвенная, буллезная, гиперкератотическая и др. [Grinspan D., 1977; Lanfranchi-Tizeira H.E. et al. 2003; Soria de Gonzalez A. et al. 2006], экссудативно-гиперемическая и др. [Петрова, Л.В., 2002]). Эти атипичные формы заболевания характеризуются хроническим, часто резистентным к терапии течением [Мигалова Е. М. и др. 2014, Перламутров, Ю.Н., 2017]. В последние годы число больных с такими тяжело протекающими формами атипичного КПЛ (аКПЛ) заметно увеличилось [Хайретдинова К.Ф. и др., 2015], а частота КПЛ слизистой оболочки полости рта (КПЛ СОПР), в том числе атипичного, увеличилась в 2 раза [Ханова С.А. и др. 2013]. При этом сочетание кожных форм аКПЛ с аКПЛ слизистой оболочки (в том числе с предраковым) не только указывает на системность патологического процесса [Летаева О.В., 2012], но и требует особых подходов к лечению [Мигалова Е. М. и др., 2014].

Однако разработка эффективных методов лечения аКПЛ затруднена не только многообразием таких форм, но и выраженным клиническим сходством некоторых форм атипичного КПЛ СОПР (аКПЛ СОПР) с лейкоплакией и плоскоклеточным раком полости рта. Это особенно актуально в связи с тем, что клинические проявления атипичного аКПЛ СОПР с годами могут приобретать сходство с лейкоплакией, а также в связи с возможностью озлокачествления

эрозивно-язвенной и гиперкератотической форм КПЛ СОПР [Молочков В.А. и др., 2011].

Все вышеперечисленное требует совершенствования дифференциальной диагностики аКПЛ СОПР с лейкоплакией и плоскоклеточным раком такой локализации [Accurso B.T. et al., 2011; Gillenwater A.M. et al., 2013].

В настоящее время с этой целью используют данные гистологического исследования биоптата очага поражения, полученного хирургическим путем [Qari H. et al., 2015] и указывающие на существенное повышение пролиферативной активности клеток при злокачественных процессах, по сравнению с предраковыми и воспалительными. Такая зависимость была отмечена F.A. de Sousa и при иммуногистохимическом изучении индекса пролиферации маркера PCNA клеток КПЛ СОПР, лейкоплакии и плоскоклеточного рака полости рта [de Sousa F.A. et al., 2009]. Индекс пролиферации Ki 67 также был значительно выше при лейкоплакии, чем при аКПЛ СОПР [de Sousa F.A. et al., 2009; Rosa E.A. et al., 2015], но при плоскоклеточном раке полости рта он не исследовался. Недостаточны и литературные данные об экспрессии Е-кадгерина на мембране клеток аКПЛ СОПР, лейкоплакии и плоскоклеточного рака той же локализации; на их основании можно лишь предполагать возможность прогрессивного уменьшения нормальной мембранной экспрессии маркера и нарастание его аномальной экспрессии при лейкоплакии и еще в большей степени при плоскоклеточном раке полости рта, по сравнению с аКПЛ СОПР [Du Y. et al., 2015; Sridevi U. et al., 2015].

С целью подтверждения этого предположения и разработки на этой основе нового метода дифференциальной диагностики аКПЛ СОПР, лейкоплакии и плоскоклеточного рака той же локализации мы провели сравнительное изучение пролиферативной активности составляющих эти процессы клеток с использованием маркера к антигенам ядер пролиферирующих клеток Ki 67 и маркера адгезии Е-кадгерина.

Что касается терапии аКПЛ, которая особенно сложна при сочетании аКПЛ кожи и аКПЛ СОПР, то она, ввиду неясности этиопатогенеза КПЛ проводится с использованием системных кортикостероидов, иммуносупрессантов, ароматических ретиноидов, ПУВА-терапии [Мигалова Е. М. и др., 2014; Deen K. et al., 2015; Laisuan W. et al., 2017; Rallis E. et al., 2016]. Однако такое лечение недостаточно эффективно, сопровождается побочными эффектами и осложнениями и не предотвращает рецидивов заболевания [Борисова Е.О., 2009; Григорьев С.С. и др., 2014; Lajevardi V. et al., 2015].

С учетом этого необходим поиск эффективных и патогенетически обоснованных методов лечения аКПЛ и аКПЛ СОПР, разработанных, в том числе, на основе подбора однородной группы больных аКПЛ СОПР путем совершенствования дифференциальной диагностики его с лейкоплакией и плоскоклеточным раком той же локализации.

В связи с этим наше внимание привлек метод экстракорпоральной фотохимиотерапии (ЭФХТ), примененный рядом зарубежных авторов при генерализованном КПЛ, однако эти данные были основаны на единичных наблюдениях [Adamski J. et al., 2015; Edelson R.L., 1991; Koppelhus U. et al., 2014;]. Что касается аКПЛ СОПР, то использующийся в лечении этой патологии цитостатик метотрексат давал многочисленные побочные эффекты и осложнения (гепатотоксичность, панцитопения и др.) и требовал после каждой кумулятивной дозы 1,5 г проведения биопсии печени [Kozub P. et al, 2011]. В этой связи при разработке новых подходов к лечению аКПЛ СОПР нами было обращено внимание на противовоспалительный и иммуномодулирующий эффект низких доз метотрексата [Насонов Е.Л., 2000].

Степень научной изученности и разработанности исследования

Сложность диагностики и лечения КПЛ обусловлена нарастанием частоты многочисленных атипичных форм этого заболевания [Хайретдинова К.Ф. и др., 2015; Ханова С.А. и др., 2013]. Однако в связи с тем, что КПЛ является междисциплинарной проблемой, в решении которой участвуют

дерматологи и стоматологи, требуется уточнение данных о частоте сочетанного аКПЛ кожи и аКПЛ СОПР. Учитывая это, а также нередко тяжелое, резистентное к терапии и рецидивирующее течение таких сочетанных поражений, включая вульвовагинально-гингивальный синдром (ВГС), актуальным является оптимизация подходов к обследованию и лечению больных аКПЛ [Мигалова Е. М. и др., 2014]. Кроме того, в связи с клиническим сходством и возможностью трансформации аКПЛ СОПР в лейкоплакию и плоскоклеточный рак [Accurso B.T. et al., 2011; Fitzpatrick S.G. et al., 2014; Gillenwater A.M. et al., 2013; Taghavi Zenouz A. et al., 2012; Zvidi I. et al., 2012;], актуальным также является совершенствование методов дифференциальной диагностики аКПЛ СОПР от этих заболеваний. В связи с этим наше внимание было обращено на опубликованные за рубежом данные иммуногистохимического изучения индекса пролиферации маркера PCNA в клетках аКПЛ СОПР, лейкоплакии и плоскоклеточного рака полости рта, свидетельствующие о существенном повышении этого индекса при злокачественных процессах, по сравнению с предраковыми и воспалительными [de Sousa F.A. et al., 2009]. Однако данных о сравнительной оценке индекса пролиферации Ki 67 клеток очагов поражения аКПЛ СОПР, лейкоплакии и плоскоклеточного рака в доступной литературе нами найдено не было. Не проводилось и сравнительного изучения при указанных заболеваниях экспрессии на мембране эпителиальных клеток другого иммуногистохимического маркера злокачественного роста - Е-кадгерина [Yogesh T.L. et al., 2011]. При КПЛ СОПР данные о его экспрессии были противоречивыми (экспрессия варьировала от нормальной до едва заметной) [Du Y. et al., 2015; Sridevi U. et al., 2015], при лейкоплакии отмечалась преимущественно нормальная мембранная экспрессия маркера, а при плоскоклеточном раке -существенно сниженная [Pigatti F.M. et al., 2015; von Zeidler S.V. et al., 2014; Yogesh T.L. et al., 2011]. Приведенные данные позволили сделать предположение о вероятном прогрессивном уменьшении нормальной мембранной экспрессии Е-кадгерина при аКПЛ СОПР с

нарастанием его аномальной экспрессии при лейкоплакии и плоскоклеточном раке полости рта. С целью подтверждения этих предположений и разработки на этой основе нового метода дифференциальной диагностики аКПЛ СОПР, лейкоплакии и плоскоклеточного рака той же локализации нами было проведено сравнительное иммуногистохимическое изучение пролиферативной активности составляющих эти процессы клеток с использованием маркера пролиферации Ki 67 и маркера адгезии E-кадгерина.

Терапия аКПЛ наиболее сложна при его сочетании с аКПЛ СОПР и как правило проводится комплексно с применением системных кортикостероидов, иммуносупрессантов, ароматических ретиноидов. Однако в связи с неясностью этиопатогенеза этого заболевания, лечение его носит преимущественно симптоматический характер, нередко сопровождаясь выраженными побочными эффектами и осложнениями, а также не исключает рецидивов [Григорьев С.С. и др., 2014]. Это требует разработки новых эффективных методов лечения аКПЛ кожи и аКПЛ СОПР, которые должны быть обоснованы патогенетически.

В связи с этим наше внимание привлек метод экстракорпоральной фотохимиотерапии (ЭФХТ), основанный на выделении мононуклеарных клеток периферической крови после перорального приема 8-метоксипсоралена (8-МОП), облучении этих клеток УФ-А с последующей их реинфузией пациенту, который с успехом применялся в лечении ряда больных генерализованным КПЛ [Adamski J. et al., 2015; Edelson R.L., 1991; Koppelhus U. et al., 2014], а также успешное использование при аКПЛ СОПР антагониста фолиевой кислоты – метотрексата, оказывающее в низких дозах противовоспалительный и иммуномодулирующий эффект [Насонов Е.Л., 2000]. Однако данные об эффективности ЭФХТ при аКПЛ были основаны на единичных наблюдениях, без оценки патогенетической обоснованности метода.

Исходя из вышеуказанного, а также с учетом важной роли иммунных нарушений в развитии аКПЛ кожи и аКПЛ СОПР, при аКПЛ кожи нами было применено комплексное лечение с использованием нового метода адоптивной иммунотерапии –ЭФХТ (на курс 4 сеанса), а при аКПЛ кожи в сочетании с

аКПЛ СОПР метода ЭФХТ (4 сеанса) в сочетании с однократной внутримышечной инъекцией метотрексата в дозе 10,0 мг, проводимой после второго сеанса ЭФХТ.

Цель исследования

Разработка комплексного лечебно-диагностического алгоритма, позволяющего индивидуализировать обследование и определить особенности применения экстракорпоральной фотохимиотерапии при различных формах и ассоциациях атипичного красного плоского лишая кожи и слизистых оболочек полости рта.

Задачи исследования

1. Оценить структуру атипичных клинических форм красного плоского лишая кожи и слизистых оболочек в популяции жителей региона Московской области.
2. Провести сравнительное исследование экспрессии маркера Ki 67 в клетках атипичного красного плоского лишая слизистой оболочки полости рта, веррукозной лейкоплакии и плоскоклеточного рака той же локализации с целью разработки метода их дифференциальной диагностики.
3. Провести сравнительное исследование экспрессии маркера Е-кадгерина в клетках атипичного красного плоского лишая слизистой оболочки полости рта, веррукозной лейкоплакии и плоскоклеточного рака той же локализации с целью разработки метода их дифференциальной диагностики.
4. Установить особенности иммунных нарушений при атипичном красном плоском лишае кожи на основе проведения иммунофлюоресцентного анализа экспрессии линейных, адгезивных и активационных молекул.
5. Установить особенности иммунных нарушений при атипичном красном плоском лишае кожи в сочетании с атипичным красным плоским лишаем полости рта на основе проведения иммунофлюоресцентного анализа экспрессии линейных, адгезивных и активационных молекул.
6. Провести сравнительное изучение влияния экстракорпоральной фотохимиотерапии при атипичном красном плоском лишае кожи на динамику клинических показателей по сравнению с традиционной терапией на основании

международных стандартов оценки эффективности, а также показать патогенетическую направленность метода.

7. Провести сравнительное изучение влияния экстракорпоральной фотохимиотерапии с метотрексатом при атипичном красном плоском лишае кожи в сочетании с атипичными поражениями полости рта на динамику клинических показателей по сравнению с традиционной терапией на основании международных стандартов оценки эффективности, а также показать патогенетическую направленность метода.

Научная новизна

1. Изучены клинические особенности различных форм аКПЛ кожи и аКПЛ СОПР и частота их сочетаний.
2. Разработан новый метод дифференциальной диагностики аКПЛ СОПР, лейкоплакии и плоскоклеточного рака полости рта на основе иммуногистохимического определения в тканях очагов поражения маркера пролиферации Ki 67 и маркера адгезии Е-кадгерина (патент РФ № 2651050).
3. Изучены особенности иммунного статуса больных аКПЛ кожи и аКПЛ кожи в сочетании с аКПЛ СОПР.
4. Разработан новый эффективный и патогенетически обоснованный метод комплексного лечения аКПЛ кожи с использованием ЭФХТ и доказана его высокая эффективность на основании международных стандартов оценки эффективности.
5. Разработан новый эффективный и патогенетически обоснованный метод лечения аКПЛ кожи в сочетании с аКПЛ СОПР с использованием ЭФХТ и однократной внутримышечной инъекции 10 мг метотрексата; доказана его высокая эффективность на основании международных стандартов оценки эффективности.
6. Разработан комплексный лечебно-диагностический алгоритм, позволяющий индивидуализировать тактику обследования и лечения больных различными формами аКПЛ.

Практическая значимость работы

В связи с недостаточной информативностью и трудоемкостью дифференциальной диагностики аКПЛ СОПР, лейкоплакии и плоскоклеточного рака полости рта путем гистологического исследования материала из очага поражения, полученного путем инцизионной биопсии, был разработан новый метод их различия на основе иммуногистохимического определения в инцизионном (punch) биоптате маркера пролиферации Ki 67 и маркера адгезии Е-кадгерина. По результатам исследования разработан способ дифференциальной диагностики красного плоского лишая и лейкоплакии слизистой оболочки полости рта, получен патент РФ №2651050.

На основании результатов клинико-иммунологического обследования больных аКПЛ кожи был разработан новый эффективный в отношении ближайших и отдаленных результатов, патогенетически обоснованный метод их комплексного лечения с использованием ЭФХТ.

На основании результатов клинико-иммунологического обследования больных аКПЛ кожи в сочетании с аКПЛ СОПР был разработан новый метод их лечения с использованием ЭФХТ и однократной внутримышечной инъекции 10 мг метотрексата, эффективный в отношении как ближайших, так и отдаленных результатов и не сопровождавшийся иммуносупрессией.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Сочетание аКПЛ кожи с аКПЛ СОПР отличается большей тяжестью течения, резистентностью к проводимой терапии и частотой рецидивов, по сравнению с несочетанными поражениями, а также возможностью малигнизации эрозивно-язвенных и гиперкератотических очагов поражения.
2. Наиболее тяжелое течение аКПЛ СОПР было при эрозивно-язвенной форме и ВГС.
3. По уровню пролиферативной активности клеток и характеру их распределения в эпидермисе аКПЛ СОПР существенно отличается от лейкоплакии и плоскоклеточного рака той же локализации; достоверные различия отмечены и

по расположению клеток, ядра которых экспрессировали Ki-67: при аКПЛ СОПР они располагались в базальном слое, при лейкоплакии – в базальном слое и надбазально, при плоскоклеточном раке – в базальном слое и надбазально, а также диффузно в опухолевых комплексах.

4. Мембранно-редуцированная экспрессия Е-кадгерина была достоверно выше при лейкоплакии, чем при аКПЛ СОПР; при плоскоклеточном раке отмечалась цитоплазматическая экспрессия, в части клеток реакция отсутствовала, а при аКПЛ СОПР цитоплазматической экспрессии и отсутствия иммунореактивности не было.
5. Иммунологически аКПЛ кожи характеризуется увеличением количества активированных, за счет взаимодействия с CD38+, цитотолитических лимфоцитов, с высоким проапоптотическим потенциалом (выраженная корреляция с молекулой CD95+), способных к осуществлению трансэндотелиального перемещения за счет взаимодействия с интегриновой молекулой адгезии CD11b+ для последующего взаимодействия с клетками-мишенями (кератиноцитами) и существенным увеличением количества активированных, за счет взаимодействия с CD38+, CD3-CD16+ киллерных клеток, также имеющих возможность к трансэндотелиальной миграции, что обусловлено их ассоциацией с молекулами CD11b+.
6. Иммунологически больные аКПЛ кожи в сочетании с аКПЛ СОПР характеризуются увеличением высоко активных цитотоксических лимфоцитов, за счет взаимодействия с молекулой CD38+, и их возможностью к трансэндотелиальной миграции, через взаимодействие с интегриновой молекулой адгезии CD11b+, причем корреляционная зависимость этих клеток с молекулой межклеточной адгезии CD50+ свидетельствовала об их возможности осуществлять взаимодействие со своим лигандом CD54+ на кератиноцитах, индуцируя в них процессы апоптоза.
7. Использование метода ЭФХТ в комплексной терапии больных аКПЛ кожи высокоэффективно в отношении ближайших, отдаленных результатов и является патогенетически обоснованным, приводящим к уменьшению

активности CD3+CD8+ лимфоцитов, их проапоптотического потенциала и возможности к взаимодействию с кератиноцитами; а также к утрате реактивности к кератиноцитам CD3-CD16+ клеток при сохранении их способности к трансэндотелиальной миграции.

8. Разработанный для лечения больных аКПЛ кожи в сочетании с аКПЛ СОПР метод на основе ЭФХТ и однократной внутримышечной инъекции метотрексата не только высокоэффективен и удовлетворительно переносится больными, но и патогенетически обоснован, сопровождаясь уменьшением активационного потенциала CD3+CD8+ лимфоцитов и снижением способности естественных киллерных клеток (CD3-CD16+) к осуществлению трансэндотелиальной миграции.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследовательской работы внедрены в практическую деятельность отделения дерматовенерологии и дерматоонкологии ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского и консультативно-диагностического отделения ГБУЗ МО МОККВД, а также используются в учебном процессе: при проведении практических занятий и чтении лекций врачам-ординаторам, на циклах первичной переподготовки и сертификационного усовершенствования врачей-дерматовенерологов на кафедре дерматовенерологии и дерматоонкологии ФУВ ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф.Владимирского.

Личный вклад

Автором лично было проведено планирование и организация проведенных исследований по всем разделам диссертации. Автором были установлены цели и задачи, определен объем исследовательских методик, сформирован и обработан первичный клинический материал, проведены статистическая обработка, анализ, интерпретация и обобщение полученных данных. Лично автором осуществлялось ведение и наблюдение 80 пациентов аКПЛ кожи и полости рта, в частности после проведения лечения с применением ЭФХТ; осуществлялась работа с архивным материалом (17

историй болезни), проводился забор клинического материала для проведения гистологического и иммуногистохимического исследований. Вклад автора был основным при подготовке публикаций по теме диссертации и при внедрении результатов исследования в лечебный и учебный процессы.

Апробация работы

Основные положения диссертационного исследования были опубликованы в журналах: Альманах клинической медицины (2016,2017 гг.); Клиническая дерматология и венерология (2015 г.); Российский журнал кожных и венерических болезней (2016 г.); Исследования и практика в медицине (2016г.); в главах руководств для врачей: Дерматовенерология. Под редакцией Ю.С.Бутова, Н.Н. Потекаева, В.Ю.Васеновой (2017 г.); Диабетологическая практика. Под общей редакцией А.В.Древаля (2017 г.), в собственных монографиях: Красный плоский лишай и лихеноидные дерматозы (2016 г.); Дерматология. Краткий справочник (2016 г.).

Материалы диссертации были представлены на научно-практической конференции с международным участием дерматологов и косметологов ЦФО РФ «Актуальные вопросы дерматовенерологии, дерматоонкологии и косметологии» (г. Москва, 2015г.); Междисциплинарной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов (г. Москва, 2015г.); Межрегиональной научно-практической конференции дерматологов и косметологов «Актуальные вопросы дерматовенерологии, дерматоонкологии и косметологии» (г. Москва , 2016г.); I съезде терапевтов Московской области с международным участием (г. Красногорск, 2017г.).

Результаты проведенной исследовательской работы отмечены Премией Губернатора Московской области в сфере науки и инноваций для молодых ученых и специалистов (2016г.).

Ведущие аспекты диссертации обсуждались на ежеквартальных Московских областных научно-практических обществах дерматовенерологов

проводимых при отделении дерматовенерологии и дерматоонкологии ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф.Владимирского.

Апробация диссертационной работы состоялась на совместном заседании секции «Терапия» Учёного совета ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, отделения дерматовенерологии и дерматоонкологии, отделения хирургической гемокоррекции и детоксикации, кафедры дерматовенерологии и дерматоонкологии ФУВ ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского 14 ноября 2017 года.

Публикации

Результаты диссертационной работы отражены в 25 печатных работах, 16 из которых опубликованы в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Минобрнауки России для публикации основных научных результатов диссертации. Имеется патент на изобретение № 2651050 «Способ дифференциальной диагностики красного плоского лишая и лейкоплакии слизистой оболочки полости рта»

Структура и объем работы

Работа изложена на русском языке, на 186 страницах машинописного текста. Состоит из введения, обзора отечественной и зарубежной литературы, главы «Материал и методы исследования», 4 глав собственных исследований: «Частота и клинические особенности атипичных форм красного плоского лишая кожи и слизистых оболочек», «Особенности пролиферации и экспрессии Е-кадгерина в клетках красного плоского лишая полости рта, лейкоплакии и плоскоклеточного рака», «Разработка метода лечения больных распространенным атипичным красным плоским лишаем кожи», «Разработка метода лечения больных распространенным атипичным красным плоским лишаем кожи с атипичным поражением слизистой оболочки полости рта», заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа проиллюстрирована 40 таблицами и 54 рисунками. Список литературы включает 225 источников (63 отечественных и 162 зарубежных)

Материал и методы исследования

В соответствии с поставленной целью и задачами в отделении дерматовенерологии и дерматоонкологии ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф.Владимирского с 2005 по 2017 гг., нами было проведено скрининговое обследование 97 больных атипичным (аКПЛ), в том числе 81 (83,5%) пациента с аКПЛ кожи, а также 36 гистологически верифицированных биоптатов СОПР (16 больных аКПЛ СОПР, 13 – веррукозной лейкоплакией, 7 - плоскоклеточным раком полости рта) для разработки методики дифференциальной диагностики аКПЛ СОПР, лейкоплакии и плоскоклеточного рака полости рта на основе использования иммуногистохимического маркера к антигенам ядер пролиферирующих клеток Ki 67 и маркера адгезии Е-кадгерина.

Характеристика клинических групп

Исходя из особой тяжести и устойчивости к проводимой терапии аКПЛ кожи и аКПЛ СОПР, оценка эффективности и патогенетической направленности комплексного использования ЭФХТ изучалась нами в двух группах параллельно с двумя группами сравнения (контрольные группы).

Больные **I группы** получали *ЭФХТ* (4 процедуры, проводимые через день) в комплексе со *стандартной терапией* (делагил по 250 мг внутрь 2 раза в день; тавегил по 1,0 мл внутримышечно 2 раза в день; аппликации кортикостероидной мази (элоком, акридерм, адвантан). В эту группу входили 23 больных распространенным аКПЛ кожи, в том числе пигментным (10 случаев), гипертрофическим (8), атрофическими (4) и синдромом перекрытия гипертрофического КПЛ и дискоидной красной волчанки (overlap-синдромом) (1); в 7 (30,4%) случаях у них имелся тКПЛ СОПР, в 4 (17,4%)- сетчатые поражения слизистой оболочки половых органов, которые в 3 (13%) случаях сочетались с КПЛ СОПР).

Больные **II (контрольной) группы** получали только *стандартную терапию*. В нее были включены 20 больных, страдавших в 7 случаях гипертрофической, в 6 случаях фолликулярной, в 3 случаях усеченной, в 1

случае пигментной, в 1 случае атрофической, в 1 случае буллезной, в 1 случае эритематозной формами распространенного аКПЛ. В 2 случаях аКПЛ кожи сочетался с тКПЛ СОПР.

Обе группы были сопоставимы по полу, возрасту, клиническим проявлениям, течению и тяжести кожного процесса, частоте и характеру сопутствующей патологии, а также проводимому ранее лечению.

Больные **III группы** получали *ЭФХТ* (4 процедуры, проводимые через день) в комплексе с однократной внутримышечной инъекцией *метотрексата* в дозе 10,0 мг, проводимой после 2 процедуры *ЭФХТ* и *стандартной терапией* (делагил по 250 мг внутрь 2 раза в день; тавегил по 1,0 мл внутримышечно 2 раза в день; на кожу кортикостероидные мази (элоком, акридерм, адвантан); полоскания полости рта 0,1% раствором хлоргексидина; наружно на эрозии в полости рта: холисал гель). Эта группа включала 18 пациентов, страдавших в 7 случаях гипертрофической, в 6 пигментной, в 4 атрофической, в одном – фолликулярной формой аКПЛ кожи, среди которых КПЛ СОПР характеризовался гиперкератотической формой - в 8, эрозивно-язвенной – в 5, экссудативно-гиперемической – в 5 случаях); слизистые оболочки половых органов были поражены в 10 случаях (в 3 носили эрозивный, в 7 - сетчатый характер). В одном случае был диагностирован вульвовагинально-гингивальный синдром (ВГС).

Больные **IV (контрольной) группы** получали *стандартную терапию*. Группа включала 17 пациентов, страдавших в 6 случаях гипертрофической, в 6 пигментной, в 3 случаях атрофической, в 2 случаях фолликулярной формами КПЛ кожи, среди которых поражение СОПР характеризовалось гиперкератотической формой - в 9, эрозивно-язвенной – в 6, экссудативно-гиперемической – в 2 случаях); слизистые оболочки половых органов были поражены в 3 случаях (в 2 носили эрозивный, в одном - сетчатый характер); по одному случаю приходилось на ВГС и синдром Гриншпана -Потекаева.

III и IV (контрольная) группы также были сопоставимы по полу, возрасту, клиническим проявлениям и течению и тяжести кожного процесса, а также по характеру сопутствующей патологии и ранее проводимому лечению.

Методы обследования

Клинический осмотр пациентов

Во время клинических и лабораторных исследований соблюдались этические принципы медицинских исследований с привлечением человека в качестве их субъекта, которые были приняты Хельсинской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki, 1964, 2014 edit.) [General Assembly of the World Medical Association, 2014]. Результаты проводимого клинического обследования пациентов, все полученные клинико-лабораторные данные заносились в индивидуальную регистрационную карту пациента, которая была разработана на кафедре дерматовенерологии и дерматоонкологии ФУВ ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского. При поступлении всем больным было проведено комплексное лабораторное обследование, которое включало в себя: общие клинические анализы крови и мочи, биохимический анализ крови и проведение электрокардиографии (ЭКГ). При наличии показаний пациентам проводилось ультразвуковое исследование (УЗИ) органов брюшной полости, рентгеноскопия органов грудной клетки. Для исключения тяжелой декомпенсированной соматической патологии, не позволяющей принимать участие в исследовательской работе пациенты были направлены на консультацию к смежным специалистам (терапевту, кардиологу, гепатологу, онкологу, гинекологу и т.д.). Данные, которые были получены во время обследования регистрировались в протоколах клинического исследования. Клинический диагноз аКПЛ и КПЛ СОПР ставился на основании жалоб, анамнестических данных, клинического осмотра патологического процесса, данных гистологического исследования биоптата кожи или слизистой в сомнительных случаях, а также с применением классификации С.И.

Довжанского и Н.А. Слесаренко (1991) и А.Л. Машкиллейсона (1984), усовершенствованной Л.В. Петровой в 2002 году [Петрова Л.В., 2002].

Определение диагностических индексов

Для оценки активности и тяжести дерматоза, а также для оценки эффективности проводимого лечения использовался ILP (Index Lichen Planus). Оценка выраженности зуда в дневное и ночное время суток проводилась с применением анкеты Behavior Rating Scores (BRS). Для оценки тяжести состояния больного и степени негативного воздействия, оказываемой кожным заболеванием на жизнь пациента применялся опросник Дерматологического Индекса Качества Жизни (ДИКЖ) [Finlay AY, 1994.]. У пациентов с аКПЛ СОПР также проводилась оценка уровня боли по визуально-аналоговой шкале (ВАШ) [Харченко Ю.А., 2014].

Метод проведения иммуногистохимического исследования с определением локализации Ki 67 и экспрессии E-кадгерина.

Иммуногистохимическое исследование проводилось в соответствии со стандартным протоколом. Парафиновые срезы наносились на стекла с адгезивным покрытием, депарафинировались по стандартному протоколу. Срезы, погруженные в цитратный буфер инкубировались в микроволновой печи при мощности 690 Вт 2 раза по 5 минут. Срезы охлаждались 20 минут при комнатной температуре, подсушивались и наносились первичные антитела. Для определения уровня пролиферации использовались моноклональные антитела к протеину Ki 67 (DAKO), разведение 1:200, также использовались антитела к E-кадгерину (Клон 36B5, разведение 1:50, Novocastra). Использовались соответствующие позитивные и негативные контроли – иммунные и не иммунные сыворотки. Срезы промывались в буфере, подсушивались, затем на них наносили EnVision (anti-mouse и anti-rabbit, фирмы DAKO, Дания) на 30-40 минут. Для визуализации реакции наносили DAB+ (3, 3'-диаминобензидин), что позволяло получать специфическую коричневую окраску. Затем срезы докрашивались гематоксилином Майера. Определение уровня пролиферации оценивалось с помощью индекса, который вычислялся как среднее от числа

меченных ядер на 100 учтенных ядер (при учете 500-1000 клеток очага поражения). Подсчет меченных ядер проводился в репрезентативных полях зрения с относительно равномерным распределением клеток очага поражения, сверху вниз и слева направо. Клетки на периферии срезов, где чаще всего наблюдается фоновое окрашивание, не учитывались.

Для оценки характера экспрессии Е-кадгерина выделялись следующие ее типы:

- Мембранный – равномерное распределение маркера по всей клеточной мембране
- Мембранно-редуцированный – распределение маркера на отдельных участках клеточной мембраны
- Цитоплазматический – распределение маркера в цитоплазме (мелкогранулярный в виде мелких гранул)
- Мембранно-цитоплазматический – сочетание мембранного и цитоплазматического)
- Отсутствие иммунореактивности

На микроскопе МИКМЕД-5 (ЛОМО, Россия) определялась локализацию клеток, ядра которых экспрессируют маркер Ki 67 и оценивалась экспрессия Е-кадгерина.

Метод выявления фиксированных антител в биоптате кожи

Для проведения инцизионной (punch) биопсии видимо здоровой кожи применялся одноразовый стерильный трубчатый нож (Strylab, Италия) диаметром 6 мм. Для инфильтрационной биопсии применялся 2% раствор лидокаина. Биоптаты фиксировались в 10% растворе формалина. Выявление антител проводилось при помощи реакции прямой иммунофлюоресценции (ПИФ) (НИИ ЭЭМ им Н.Г.Гамалеи) с применением моноспецифических люминесцирующих сывороток против IgG, IgA, IgM и C₃ компонента комплемента. На предметное стекло помещались серийные криостатные срезы и в течение 30 мин подсушивались при комнатной температуре. После чего в течение 10 мин, исследуемый материал промывался в изотоническом растворе хлорида натрия с фосфатным буфером (pH 7,0-7,4) для удаления не связанных с

тканями растворимых белков. Затем исследуемый препарат обрабатывался люминесцентной сывороткой (в качестве метки для антител использовали флюоресцеина изотиоцианат) против Ig основных классов (G, M, A,) и C3-компонента комплемента на протяжении 30 минут, вновь промывался в течение 10 минут в изотоническом растворе хлорида натрия с фосфатным буфером, и помещался в 60% нейтральный глицерин под покровное стекло. В глицерин добавлялся кристаллик парафенилендиамина для предохранения препарата от выгорания в люминесцентном микроскопе.

Для контроля в световом микроскопе одновременно проводилось изучение криостатных срезов, окрашенных гематоксилином и эозином.

Определение поверхностных дифференцировочных антигенов и адгезивных молекул на клетках периферической крови методом проточной цитофлюорометрии

Взятие венозной крови проводилось в стерильные пробирки с раствором гепарина (500 ед./мл). Гепаринизированная кровь разводилась в 2 раза средой 199 и наносилась на Ficoll-Paque (Pharmacia, Sweden) в соотношении 3 объема лейкоцитарной массы на 1 объем фиколла, а затем центрифугировалась при комнатной температуре при 1,5 тыс оборотов в мин на протяжении 45 минут. Мононуклеарные клетки собирали из интерфазы при помощи пастеровской или автоматической пипетки. Клетки отмывали при комнатной температуре первый раз в среде 199 в течение 20 мин при 1500 об/мин, а затем еще 2 раза по 10 мин при 1000 об/мин. Подсчет клеток проводился в камере Горяева. Для иммунофенотипирования клеток применялась широкая панель моноклональных антител серии ICO (НПЦ «МедБиоСпектр», Россия).

В реакции непрямой поверхностной иммунофлюоресценции проводилась проточная цитофлюорометрия. Для этого 5×10^5 отмытых в PBS (фосфатно-солевой буфер) клеток в объеме 50 мкл инкубировались с 20 мкл МКА (моноклональные антитела) при комнатной температуре в течение 30 минут. После однократной отмывки в PBS центрифугированием в течение 7 минут при 1500 об/мин, клетки инкубировались при 4°C в течение 30 минут с 20 мкл с

меченной FITC (флуоресцеина изотиоцианат) антисывороткой барана против иммуноглобулинов белой мыши (НПЦ «МедБиоСпектр», Россия). Затем клетки дважды отмывались и ресуспендировались в PBS, содержащем 1% формалин и 0,1% азид натрия. Экспрессия антигенов на лимфоцитах определялась на проточном цитофлюориметре FACScan (Becton Dickinson) с использованием панели моноклональных антител (BeckmanCoulter) с реактогенной направленностью против большого спектра дифференцировочных антигенов и маркеров активации: CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD11b+, HLA-DR+, CD25+, CD38+. В каждой пробе анализировали 5000 до 10000 событий в зависимости от цели исследования. Для анализа экспрессии антигенов на определенных популяциях клеток (лимфоциты, моноциты, нейтрофилы) устанавливались «окна дискриминации», соответствовавшие определенным физическим параметрам. За экспрессию маркера принимались клетки с интенсивной флуоресценцией выше порогового значения.

Метод экстракорпоральной фотохимиотерапии

Процедура ЭФХТ проводилась через 1-2 дня, на курс 4 сеанса. С помощью клеточного сепаратора «НАЕМОНЕТИКС MCS+» (USA) по протоколу RBCP (выделение стволовых клеток) производилось выделение моноклеарных клеток. За одну процедуру из 450,0 мл крови выделялось около 25 мл концентрата моноклеарных клеток, которые затем ресуспендировались в 0,9% растворе хлористого натрия, общий объем доводился до 200,0 мл. После этого клеточная суспензия подвергалась ультрафиолетовому воздействию на аппарате УФ облучения (УФО) «ЮЛИЯ» с λ 380-420 нм. Общая доза экспозиции составляла 0,8-1,2 Дж/см². Фотосенсибилизатор- аммифурин, применялся в дозе 0,6 мг/кг. Препарат применялся внутрь за 2 часа до проведения процедуры. После воздействия УФО, клеточная суспензия реинфузировалась пациенту в течение 30 минут [Молочков А.В. и др. 2015]. Процедуру проводили через 1-2 дня, на курс 4 сеанса. При комбинированном лечении с применением ЭФХТ и метотрексата

после второй процедуры ЭФХТ производилась внутримышечная инъекция метотрексата в дозе 10,0 мг, после чего проводились еще 2 процедуры ЭФХТ.

Все пациенты III группы были консультированы онкологом, с целью включения в комплексную терапию метотрексата. Терапия с применением метотрексата не проводилась пациентам с алкогольной зависимостью и хронической печеночной недостаточностью, а также, в связи с подтвержденным тератогенным эффектом метотрексата, ее также не получали беременные и фертильные, планирующие беременность женщины.

Методы статистики

Для описания количественных данных рассчитывали средние арифметические значения и стандартные отклонения ($M \pm SD$) либо медианы и квартили ($Me [LQ; UQ]$), если распределение переменной отличалось от нормального. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Для анализа взаимосвязи двух количественных переменных проводили анализ с использованием коэффициента корреляции Спирмена (с расчетом статистической значимости различий коэффициентов между группами). Сравнение количественных переменных в двух группах проводили с использованием критерия Стьюдента или Манна-Уитни (при невозможности использования критерия Стьюдента вследствие отсутствия равенства дисперсий анализируемых выборок, в случае отличия распределений переменных от нормального). Анализ динамических изменений переменных внутри групп анализировали с помощью критерия Стьюдента для зависимых выборок или критерия Вилкоксона. Для оценки различий одновременно между тремя выборками был использован критерий Крускала-Уоллиса (с апостериорными попарными сравнениями критерием Данна с поправкой на множественные сравнения) и точный критерий Фишера с дальнейшими апостериорными попарными сравнениями с поправкой Бонферрони. Сравнение коэффициентов корреляции проводили с помощью модуля «Difference tests» (программа Statistica 13.2). Полученные различия считались статистически

значимыми при $p < 0,05$. Анализ проводился с использованием программ Statistica 13.2 (Dell inc., USA), Microsoft Excel 2016 (Microsoft corp., USA).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Частота и клинические особенности атипичных форм красного плоского лишая кожи и слизистых оболочек

аКПЛ кожи среди 97 зарегистрированных в отделении пациентов аКПЛ был диагностирован в 81 (83,5%) случае: гипертрофическая форма была в 31 (38,3%), пигментная – в 23 (28,4%), атрофическая – в 11 (13,6%), фолликулярная- 8 (9,9%), усеченная – в 3 (3,7%), ВГС- в 2 (2,5%), буллезная- в 1 (1,2%), эритематозная – в 1 (1,2%), синдром Гриншпана-Потекаева- в 1(1,2%) случае (рис.1).



Рис.1 Клинические формы атипичного красного плоского лишая кожи у 81 пациента

Ассоциация аКПЛ кожи с аКПЛ СОПР была в 35 (43,2%) случаях, в том числе, в 17 (48,6%) с гиперкератотической, в 11 (31,4%) - с эрозивно-язвенной, в 7 (20%)- с экссудативно-гиперемической. В 7 (36,8%) случаях аКПЛ кожи ассоциировался с аКПЛ слизистых оболочек половых органов: в 6 (31,6%) случаях с эрозивно-язвенной и в 1 (5,3%)- с гипертрофической.

В 16 (16,5%) случаях аКПЛ СОПР носил изолированный характер и был представлен: в 6 (37,5%) случаях экссудативно-гиперемической, в 5 (31,25%) эрозивно-язвенной, в 5 (31,25%)- гиперкератотической формами.

Таким образом, аКПЛ СОПР был у 51 (52,6%) из 97 больных аКПЛ. У 16 (31,4%) была эрозивно-язвенная, у 22 (43,1%) гиперкератотическая, у 13 (25,5%)- экссудативно-гиперемическая формы (рис.2).

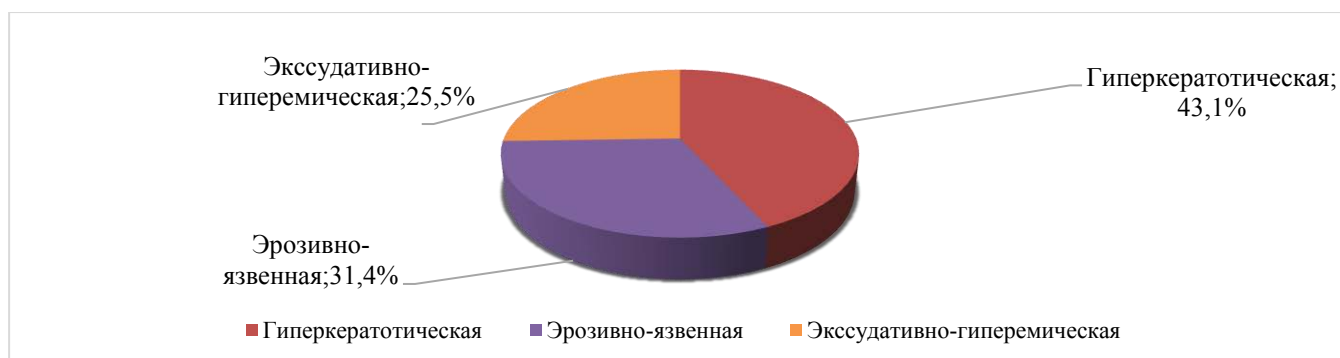


Рис.2 Клинические формы атипичного красного плоского лишая полости рта у 51 пациента

Для разработки методики дифференциальной диагностики аКПЛ СОПР, лейкоплакии и плоскоклеточного рака полости рта на основе использования иммуногистохимического маркера клеток, ядра которых экспрессируют Ki 67 и Е-кадгерина нами было проведено иммуногистохимическое изучение 16 гистологически верифицированных биоптатов аКПЛ СОПР (6 с эрозивно-язвенной, в 5 – с гипертрофической, в 3 – с экссудативно-гиперемической, 2 – с атрофической формой), 13 веррукозной лейкоплакией и 7 плоскоклеточным раком полости рта.

Особенности пролиферации и экспрессии Е-кадгерина в клетках атипичного красного плоского лишая полости рта, лейкоплакии и плоскоклеточного рака

Индекс пролиферации Ki 67 в клетках аКПЛ СОПР варьировал от 6% до 13% (в среднем $9,3 \pm 2,3\%$), а пролиферирующие клетки располагались исключительно в базальном слое эпидермиса; при лейкоплакии он варьировал от 10% до 30% (в среднем $20,6 \pm 6,1\%$), пролиферирующие клетки располагались в 10 (66,7%) случаях в базальном слое и нижних отделах шиповатого (надбазально) слоя эпидермиса и в 3 (33,3%) случаях только в базальном слое; при плоскоклеточном раке полости рта индекс Ki 67 варьировал от 35% до 85% (в среднем $57,4 \pm 2,04\%$), пролиферирующие клетки располагались диффузно в составе опухолевых комплексов в 6 (85,7%) случаях, а в одном (14,3%)-определялись в базальных и надбазальных отделах.

Таким образом, по уровню пролиферативной активности клеток и характеру их распределения в эпидермисе атипичный красный плоский лишай

слизистой оболочки полости рта существенно отличался от лейкоплакии ($p=0,003$) и плоскоклеточного рака той же локализации ($p<0,001$): средний индекс Ki 67 составлял $9,3\pm 2,3\%$, $20,6\pm 6,1\%$ и $57,4\pm 2,04\%$ соответственно ($p<0,001$).

Клетки, ядра которых экспрессировали Ki 67 при аКПЛ СОПР располагались в базальном слое эпидермиса в 100% клеток, при лейкоплакии – в базальном слое в 23,1%, базально и надбазально в 76,9% клеток, при плоскоклеточном раке – базально и надбазально в 14,3% клеток, диффузно в составе опухолевых комплексов в 85,7% клеток. При попарном сравнении локализации клеток, ядра которых экспрессируют маркер Ki 67 различия носили достоверный характер во всех исследуемых парах ($p<0,001$).

Е-кадгерин при аКПЛ СОПР экспрессировался на мембране в 100% клеток: в подавляющем большинстве (1680 или 98,8%) клетках имело место интенсивное мембранное окрашивание, а в 20 (1,2%) мембранно-редуцированное. Клетки лейкоплакии в 90,7% экспрессировали Е-кадгерин на мембране: в 1043 (80,2%) случаях клетки имели мембранный тип экспрессии, в 137 (10,5%) – мембранно-редуцированный; в 50 (3,9%) клетках определялся мембранно-цитоплазматический тип экспрессии и в 70 (5,4%) случаях клетки не имели иммунореактивности. При плоскоклеточном раке в 53,7% клеток отмечалась цитоплазматическая экспрессия: 355 (50,9%) клеток экспрессировали маркер в цитоплазме, 20 (2,8%) клеток имели мембранно-цитоплазматическую экспрессию. В 250 (35,7%) клетках иммунореактивность отсутствовала и лишь 10,6% клеток экспрессировали Е-кадгерин на мембране: 30 (4,2%) имели мембранный тип экспрессии, 45 (6,4%) – мембранно-редуцированный.

Полученные данные свидетельствовали о существенных различиях по уровню пролиферативной активности клеток атипичного красного плоского лишая с лейкоплакией ($p=0,003$) и плоскоклеточным раком ($p<0,001$), а также по расположению клеток, ядра которых экспрессировали Ki 67, которые при атипичном красном плоском лишае полости рта располагались в базальном

слое эпидермиса в 100%, при лейкоплакии – в базальном слое в 23,1%, базально и надбазально в 76,9% ($p<0,001$), при плоскоклеточном раке – базально и надбазально в 14,3%, а также диффузно в составе опухолевых комплексов в 85,7% ($p<0,001$).

При последующих попарных сравнениях было установлено, что по локализации отложений Е-кадгерина аКПЛ СОПР достоверно отличался от лейкоплакии и плоскоклеточного рака той же локализации: мембранно-редуцированная экспрессия была достоверно выше при лейкоплакии, чем при аКПЛ СОПР (10,5% и 1,2% соответственно; $p=0,001$); при плоскоклеточном раке в 53,7% клеток отмечалась цитоплазматическая экспрессия, в 35,7% реакция отсутствовала, а при аКПЛ СОПР цитоплазматической экспрессии и отсутствия иммунореактивности не было ($p<0,001$).

На основании полученных результатов нами предложен метод диагностики аКПЛ СОПР, в соответствие с которым, при выявлении значений индекса пролиферации Ki 67 до 10 % и локализации клеток, ядра которых экспрессируют Ki 67 исключительно в базальном слое эпидермиса, следует диагностировать аКПЛ СОПР.

При значении индекса пролиферации от 10 до 14% и локализации клеток, ядра которых экспрессируют Ki 67 исключительно в базальном слое эпидермиса следует проводить дополнительное исследование с выявлением локализации экспрессии Е-кадгерина, и при его мембранной экспрессии диагностировать аКПЛ СОПР.

Метод использован нами в диагностике 17 больных с персистирующими (от 6 месяцев до 19 лет, 1 год [10 месяцев; 2 года]) поражениями СОПР, клинически сходным с аКПЛ СОПР, лейкоплакией или плоскоклеточным раком (5 пациентов с сочетанным аКПЛ кожи и 12 пациентов с изолированными поражениями) и выявил у 10 больных аКПЛ СОПР (у 6 эрозивно-язвенный, у 4-экссудативно-гиперемический, у 2 - гиперкератотический), у 6 – лейкоплакию полости рта, у одного – плоскоклеточный рак полости рта.

Применение иммуногистохимического исследования с антителами к Ki 67 и Е-кадгерину позволило исключить возможность ошибочного включения в III и IV группы больных с лейкоплакией и раком СОПР, обеспечив тем самым однородность сравниваемых групп для получения репрезентативных данных об использовании ЭФХТ в комплексе с однократной внутримышечной инъекцией 10,0 мг метотрексата.

Иммунологическая характеристика I группы пациентов с атипичным красным плоским лишаем кожи

При иммунологическом обследовании пациентов I группы (табл. 1) отмечалось статистически значимое увеличение количества эффекторных CD3+CD8+ (0,53 [0,37; 0,68] $10^9/\text{л}$;) клеток, по сравнению со здоровыми донорами (0,32 $\pm$ 0,07 $10^9/\text{л}$), ($p<0,01$).

Таблица 1

Иммунологические показатели больных I группы

Экспрессия кластеров дифференцировки лимфоцитов	Обследуемые группы			
	Здоровые доноры (n=20)		Больные аКПЛ с распространенным поражением кожи (I группа) до лечения (n=23)	
	(%)	$10^9/\text{л}$	(%)	$10^9/\text{л}$
CD ₃	62,75 $\pm$ 1,21	0,77 [0,67; 0,83]	65,23 $\pm$ 9,83	1,24 [1,01; 1,58]*
CD ₄	37,19 $\pm$ 1,22	0,45 [0,39; 0,50]	33,69 $\pm$ 8,87	0,62 [0,54; 0,85]*
CD ₈	25,54 $\pm$ 0,83	0,32 [0,27; 0,35]	28,10 $\pm$ 9,33	0,53 [0,37; 0,68]*
CD ₂₀	7,20 $\pm$ 0,57	0,09 [0,08; 0,10]	6,84 $\pm$ 3,42	0,12 [0,08; 0,17]
HLA-DR	9,90 [9,70; 10,00]	0,12 [0,10; 0,14]	17,10 [10,70; 21,60]*	0,27 [0,20; 0,45]*
CD ₃₈	30,58 $\pm$ 1,45	0,38 [0,32; 0,41]	50,00$\pm$10,89*	0,95 [0,74; 1,20]*
CD ₂₅	4,20 [4,05; 4,35]	0,05 [0,05; 0,05]	12,60 [7,20; 18,90]*	0,21 [0,12; 0,45]*
CD ₁₆	18,84 $\pm$ 1,48	0,23 [0,19; 0,27]	28,00$\pm$6,12*	0,55 [0,44; 0,66]*
CD _{11b}	26,84 $\pm$ 0,76	0,34 [0,28; 0,35]	47,79$\pm$13,04*	0,92 [0,70; 1,12]*
CD ₅₀	88,80 [88,05; 89,05]	1,09 [0,93; 1,17]	98,60 [95,00; 98,90]*	1,85 [1,54; 2,38]*
CD ₉₅	48,15 [47,75; 48,95]	0,59 [0,52; 0,64]	50,30 [44,20; 54,50]	0,98 [0,80; 1,14]*
CD4/ CD8 (ед)	1,46 $\pm$ 0,07		0,85$\pm$0,35*	

* - $p<0,01$ сравнение групп здоровых доноров и больных КПЛ с распространенным поражением кожи до лечения, критерий Стьюдента для независимых выборок или критерий Манна-Уитни (для распределения, отличного от нормального)

Отмеченная нами в этой группе больных статистически значимая корреляционная зависимость CD3+CD8+ с активационным антигеном CD38+ ($r=0,54$, $p<0,05$) свидетельствовала о высокой активности этих клеток. Высокая степень корреляции активированных CD3+CD8+ лимфоцитов с интегриновой молекулой адгезии CD11b+ ($r=0,74$, $p<0,05$) свидетельствовала о возможности трансэндотелиального перемещения CD3+CD8+ с последующим

взаимодействием их с клетками-мишенями (кератиноцитами), на что указывала высокая корреляция этих клеток с молекулами межклеточной адгезии CD50+ ($r=0,61$, $p<0,05$). О высоком апоптотическом потенциале CD3+CD8+ лимфоцитов свидетельствовала их выраженная корреляция с молекулой CD95+ ($r=0,54$, $p<0,05$) (табл.2).

Таблица 2

Корреляция молекулярной активности и адгезии на CD3+CD8+ лимфоцитах у больных I группы

Показатель	Абсолютное значение показателей ($10^9/\text{л}$) и коэффициент корреляции Спирмена (r) ($n=23$)
CD38	0,95 [0,74; 1,20], $r=0,54^*$
CD11b	0,92 [0,70; 1,12], $r=0,74^*$
CD50	1,85 [1,54; 2,38], $r=0,61^*$
CD95	0,98 [0,80; 1,14], $r=0,54^*$

* $p<0,05$, статистическая значимость коэффициента корреляции Спирмена

Количество естественных киллерных (CD3-CD16+) клеток ($0,55$ [$0,44$; $0,66$] $10^9/\text{л}$) было существенно выше нормы ($0,23$ [$0,19$; $0,27$] $10^9/\text{л}$) ($p<0,01$). На патологическую активность этих клеток указывало наличие на их поверхности активационных молекул CD38+, о чем свидетельствовала высокая степень корреляционной зависимости между CD38+ и CD3-CD16+ ($r=0,69$, $p<0,05$). Естественные киллерные клетки также имели возможность осуществлять трансэндотелиальную миграцию благодаря присутствию на них интегриновой молекулы адгезии CD11b+, на что указывал статистически значимый высокий коэффициент корреляции между CD11b+ и CD3-CD16+ ($r=0,51$, $p<0,05$), с последующим взаимодействием с кератиноцитами через молекулы межклеточной адгезии CD50+ ($r=0,76$, $p<0,05$) и их лигандом на кератиноцитах CD54+ (табл. 3). Киллинг кератиноцитов естественными киллерными клетками осуществлялся за счет молекул, относящихся к классу KIR (киллерный иммуноглобулиновый рецептор).

Таблица 3

Корреляция молекулярной активности и адгезии на CD3-CD16+ клетках у больных I группы

Показатель	Абсолютное значение показателей ($10^9/\text{л}$) и коэффициент корреляции Спирмена (r) ($n=23$)
CD38	0,95 [0,74; 1,20], $r=0,69^*$
CD11b	0,92 [0,70; 1,12], $r=0,51^*$
CD50	1,85 [1,54; 2,38], $r=0,76^*$

* $p<0,05$, статистическая значимость коэффициента корреляции Спирмена

Динамика клинических проявлений у пациентов I и II групп после лечения

Больные I группы перенесли ЭФХТ удовлетворительно. При этом результаты лечения у них были лучше, чем во II группе (табл.4-6).

Таблица 4

Клиническая эффективность лечения на 15-й день после начала лечения больных I и II (контрольной) групп.

Показатель	Группа I (n=23)	Группа II (контрольная)(n=20)
Прекращение зуда и регресс высыпаний на коже и слизистых оболочках	17 (73,9%)*	8 (40%)*
Частичный эффект†	6 (26,1%)*	10 (50%)*
Отсутствие эффекта	-	2 (10%)
Рецидив после лечения	1 (4,4%)*	10 (55,6%)*

* различия достоверны ($p < 0,01$).

† регресс высыпаний был частичным сопровождался их уплощением и прекращением появления новых элементов

Таблица 5

Динамика диагностических индексов у пациентов I и II (контрольной) групп

Индекс	Этап лечения	Группа I (n=23)	Группа II (контрольная) (n=20)
ILP	До	14,4±2,6	12,6±2,3
	После	3,9±1,2*	7,0±3,4*
BRS	До	4,0[2,00;5,00]	3,0[3,00;5,00]
	После	1,0[0,00;1,00] *	1,5[0,00;3,00] *
ДИКЖ	До	18,7±5,2	16,4±4,7
	После	7,4±2,8*	10,7±4,1*

* - различия между группами достоверны по критерию Манна Уитни, $p < 0,05$

Таблица 6

Отдаленные результаты лечения больных I и II (контрольной) групп

Группа пациентов	Отсутствие рецидива в течение 1 года	Отсутствие рецидива в течение 2 лет	Отсутствие рецидива через 3 года
Количество пациентов I группы	22 из 23	22 из 22	16 из 17
Количество пациентов II (контрольной) группы*	8 из 18	7 из 18	8 из 18

*-в таблице представлены больные, у которых в 7 случаях патологический процесс рецидивировал более одного раза.

Представленные данные свидетельствуют о существенно большей эффективности применения ЭФХТ в комплексной терапии АКПЛ кожи, по сравнению с группой контроля (группа стандартной терапии).

Динамика иммунологических показателей у пациентов I группы после лечения

При повторном иммунологическом обследовании, проведенном через 7-10 дней после окончания комплексного лечения с применением ЭФХТ, у

пациентов **I группы** отмечалась тенденция к снижению количества CD3+CD8+ (0,43 [0,39; 0,53] 10⁹/л) (**табл. 7**), а также значительное уменьшение их активности, о чем свидетельствовало статистически значимое снижение корреляции CD3+CD8+ с CD38 ($r=0,40$, $p>0,05$). И хотя способность CD3+CD8+ осуществлять трансэндотелиальную миграцию сохранилась, однако существенно снизилась их возможность взаимодействовать с кератиноцитами, о чем свидетельствует снижение коэффициента корреляции CD3+CD8+ с CD50+ ($r=0,28$, $p>0,05$). Кроме того, отсутствие корреляционной зависимости CD3+CD8+ с CD95+ ($r=0,28$, $p>0,05$) (**табл. 8**) указывало на уменьшение их проапоптотического потенциала в отношении кератиноцитов.

Таблица 7

Динамика иммунологических показателей у пациентов I группы до и после применения ЭФХТ

Экспрессия кластеров дифференцировки лимфоцитов	Обследуемые группы			
	Больные АКПЛ с распространенным поражением кожи до лечения (I группа) (n=23)		Больные АКПЛ с распространенным поражением кожи после лечения (I группа) (n=15)	
	(%)	10 ⁹ /л	(%)	10 ⁹ /л
Лимфоциты	40,2±12,2	2,01±0,61	36,8±11,9	2,17±0,70
CD ₃	65,23±9,83	1,24 [1,01; 1,58]	65,13±7,95	1,22 [1,10; 1,31]
CD ₄	33,69±8,87	0,62 [0,54; 0,85]	31,49±5,91	0,68 [0,51; 0,77]
CD ₈	28,10±9,33	0,53 [0,37; 0,68]	26,15±9,26	0,43 [0,39; 0,53]
CD ₂₀	6,84±3,42	0,12 [0,08; 0,17]	8,05±1,77	0,14 [0,12; 0,22]
HLA-DR	17,10 [10,70; 21,60]	0,27 [0,20; 0,45]	14,60 [10,30; 24,90]	0,31 [0,18; 0,52]
CD ₃₈	50,00±10,89	0,95 [0,74; 1,20]	48,27±9,31	0,89 [0,83; 1,29]
CD ₂₅	12,60 [7,20; 18,90]	0,21 [0,12; 0,45]	11,90 [3,20; 18,50]	0,30 [0,07; 0,35]
CD ₁₆	28,00±6,12	0,55 [0,44; 0,66]	25,17±12,42	0,46 [0,27; 0,85]
CD _{11b}	47,79±13,04	0,92 [0,70; 1,12]	43,01±9,93	0,80 [0,64; 1,05]
CD ₅₀	98,60 [95,00; 98,90]	1,85 [1,54; 2,38]	95,40 [90,50; 97,70]*	1,84 [1,63; 2,17]
CD ₉₅	50,30 [44,20; 54,50]	0,98 [0,80; 1,14]	45,80 [36,60; 54,10]	0,99 [0,73; 1,10]
CD ₄ /CD ₈ (ед)	0,85±0,35		0,87±0,26	

* - $p<0,05$, сравнение показателей внутри I группы пациентов, критерий Стьюдента для зависимых выборок или критерий Вилкоксона (для распределения, отличного от нормального)

После лечения также отмечалась тенденция к снижению количества естественных киллерных клеток (0,46 [0,27; 0,85] 10⁹/л) (**табл. 7**), снизилась их патологическая активность, на что указывает снижение коэффициента корреляции с молекулами CD38+ ($r=0,55$, $p<0,05$), при этом сохранилась их способность к осуществлению нормальной трансэндотелиальной миграции для взаимодействия с кератиноцитами, на что указывал сохраняющийся высокий

коэффициент корреляции CD3-CD16+ с CD11b+ ($r=0,53$, $p<0,05$) и с CD50+ ($r=0,68$, $p<0,05$) (**табл. 8**).

Таблица 8

Коэффициент корреляции Спирмена для молекулярной активности и адгезии на CD8+CD3+ лимфоцитах и CD3-CD16+ клетках у больных I группы до и после лечения

Показатель	CD8+CD3+		CD3-CD16+	
	До лечения (n=23)	После лечения (n=15)	До лечения (n=23)	После лечения (n=15)
CD38	0,54*	0,40	0,69*	0,55*
CD11b	0,74*	0,56*	0,51*	0,53*
CD50	0,61*	0,28	0,76*	0,68*
CD95	0,54*	0,28	0,68*	0,46

* $p<0,05$, статистическая значимость коэффициента корреляции Спирмена

Известно, что молекула межклеточной адгезии (CD11b+) в норме также присутствует на естественных киллерных клетках (CD3-CD16+) и участвует в осуществлении механизма перехода этих клеток в межклеточное пространство для обеспечения защитных функций, свойственных системе адаптивного иммунитета. После лечения с применением ЭФХТ, несмотря на сохранение возможности трансэндотелиальной миграции, утрачивалась реактивность естественных киллерных клеток к соответствующим клеткам-мишеням, за счет снижения экспрессии на них активационной молекулы CD38+.

Таким образом, применение ЭФХТ в комплексном лечении аКПЛ кожи было патогенетически обоснованным, приводящим к существенному снижению количества и активности CD3+CD8+ и CD3-CD16+клеток.

Иммунологическая характеристика III группы пациентов с атипичным красным плоским лишаем кожи в сочетании с атипичным красным плоским лишаем полости рта

При иммунологическом обследовании у больных III группы отмечалось статистически значимое увеличение количества CD3+CD8+ ($0,54\pm0,19 \cdot 10^9/\text{л}$;) клеток по сравнению с показателями у здоровых доноров ($0,32\pm0,07 \cdot 10^9/\text{л}$) (**табл.9**). Цитолитические лимфоциты CD3+CD8+ в III группе также, как и в I характеризовались высокой активностью, о чем свидетельствовала высокая степень их корреляции с молекулой CD38+ ($r=0,51$, $p<0,05$) и возможностью к трансэндотелиальному перемещению, на что указывала корреляционная

зависимость с CD11b+ ($r=0,68$, $p<0,05$) (табл. 10). Корреляционная зависимость этих цитолитических клеток с молекулой межклеточной адгезии CD50+ ($r=0,68$, $p<0,05$) свидетельствовала о возможности этих клеток осуществлять взаимодействие со своим лигандом CD54+ на кератиноцитах, индуцируя в них процессы апоптоза.

Таблица 9

Иммунологические показатели больных III группы

Экспрессия кластеров дифференцировки лимфоцитов	Обследуемые группы			
	Здоровые доноры (n=20)		Больные аКПЛ в сочетании с аКПЛ СОПР (III группа) до лечения (n=18)	
	(%)	10 ⁹ /л	(%)	10 ⁹ /л
CD ₃	62,50 [62,00; 63,60]	0,77 [0,67; 0,83]	74,45 [61,70; 77,60]	1,30 [1,11; 1,69]*
CD ₄	37,19±1,22	0,45 [0,39; 0,50]	36,49±9,04	0,64 [0,53; 0,89]*
CD ₈	25,54±0,83	0,32 [0,27; 0,35]	28,34±8,17	0,54 [0,45; 0,59]*
CD ₂₀	7,25 [6,95; 7,45]	0,09 [0,08; 0,10]	5,15 [3,60; 6,50]*	0,10 [0,07; 0,13]
HLA-DR	9,90 [9,70; 10,00]	0,12 [0,10; 0,14]	11,50 [7,60; 14,50]	0,22 [0,15; 0,29]*
CD ₃₈	30,58±1,45	0,38 [0,32; 0,41]	52,42±11,05*	0,97 [0,77; 1,17]*
CD ₂₅	4,20 [4,05; 4,35]	0,05 [0,05; 0,05]	4,95 [3,40; 13,30]	0,09 [0,07; 0,23]*
CD ₁₆	18,84±1,48	0,23 [0,19; 0,27]	12,88±4,97*	0,20 [0,14; 0,32]
CD _{11b}	26,84±0,76	0,34 [0,28; 0,35]	30,04±8,54	0,53 [0,42; 0,66]*
CD ₅₀	88,80 [88,05; 89,05]	1,09 [0,93; 1,17]	96,35 [94,40; 97,80]*	1,79 [1,49; 2,06]*
CD ₉₅	48,15 [47,75; 48,95]	0,59 [0,52; 0,64]	53,85 [43,90; 62,20]	1,04 [0,87; 1,22]*
CD ₄ /CD ₈ (ед)	1,45 [1,40; 1,50]		0,93 [0,78; 1,10]*	

* - $p<0,01$, сравнение групп здоровых доноров и больных КПЛ с распространенным поражением кожи до лечения, критерий Стьюдента для независимых выборок или критерий Манна-Уитни (для распределения, отличного от нормального)

Таблица 10

Корреляция молекулярной активности и адгезии на CD3+CD8+ лимфоцитах у больных I и III группы до лечения

Показатель	Абсолютное значение показателей (10 ⁹ /л) и коэффициент корреляции Спирмена (r)	
	I группа (n=23)	III группа (n=18)
CD38	0,95 [0,74; 1,20], r=0,54*	0,97 [0,77; 1,17], r=0,51*
CD11b	0,92 [0,70; 1,12], r=0,74*	0,53 [0,42; 0,66], r=0,68*,+
CD50	1,85 [1,54; 2,38], r=0,61*	1,79 [1,49; 2,06], r=0,68*
CD95	0,98 [0,80; 1,14], r=0,54*	1,04 [0,87; 1,22], r=0,57*

* $p<0,05$, статистическая значимость коэффициента корреляции Спирмена

+ $p<0,05$, сравнение коэффициентов корреляции в двух группах (модуль «Difference tests» в программе Statistica 12)

Количество естественных киллеров CD3-CD16+ в этой группе составляло $0,25\pm0,14$ 10⁹/л, что не отличалось от показателей здоровых доноров ($0,24\pm0,06$ 10⁹/л). Естественные киллерные клетки у этих пациентов, в отличие от I группы не имели повышенной патологической активности и повышенного уровня межклеточного взаимодействия, как в I группе, которое осуществлялось через молекулы CD50+ (табл. 11). Тем не менее, возможности для

трансэндотелиальной миграции этих клеток сохранялись, о чем свидетельствовал статистически значимый коэффициент корреляции CD3-CD16+ и CD11b+ ($r=0,49$, $p<0,05$) (табл.11).

Таблица 11

Корреляция молекулярной активности и адгезии на CD3-CD16+ клетках у больных I и III группы до лечения

Показатель	Абсолютное значение показателей ($10^9/л$) и коэффициент корреляции Спирмена (r)	
	I группа (n=23)	III группа (n=18)
CD38	0,95 [0,74; 1,20], $r=0,69^*$	0,97 [0,77; 1,17], $r=0,28$
CD11b	0,92 [0,70; 1,12], $r=0,51^*$	0,53 [0,42; 0,66], $r=0,49^{*,+}$
CD50	1,85 [1,54; 2,38], $r=0,76^*$	1,79 [1,49; 2,06], $r=0,47$

* $p<0,05$, статистическая значимость коэффициента корреляции Спирмена

+ $p<0,05$, сравнение коэффициентов корреляции в двух группах (модуль «Difference tests» в программе Statistica 12)

Различия в выраженности иммунных нарушений в этой группе, по сравнению с больными распространенным АКПЛ кожи, по-видимому, были связаны с процессом истощения и блокирования активационных механизмов, необходимых для купирования воспалительного процесса в условиях более длительного, нередко рецидивирующего течения АКПЛ и большей частоты тяжелых сопутствующих заболеваний у этой группы пациентов.

Динамика клинических проявлений у пациентов III и IV (контрольной) групп после лечения

Пациенты **III группы** наряду со стандартным лечением получали 4 сеанса ЭФХТ и однократную внутримышечную инъекцию метотрексата в дозе 10,0 мг. Лечение переносилось удовлетворительно, без осложнений и побочных эффектов. При этом результаты лечения у них были лучше, чем в IV группе. (табл.12-14)

Таким образом, в **III группе** пациентов, получавших лечение с применением ЭФХТ и метотрексата, в сравнении с **IV контрольной группой** отмечалась значимо более высокая эффективность терапии, большая продолжительность ремиссии и меньшее число и тяжесть рецидивов.

Таблица 12

Клиническая эффективность на 15-й день лечения в III и IV (контрольной) группах.

Показатель	Группа III (n=18)	Группа IV (контрольная) (n=17)
Прекращение зуда и регресс высыпаний на коже и слизистых оболочках	15(83,3%)*	1 (5,9%) *
Частичный эффект [†]	3(16,7%)*	8 (47,1%)*
Отсутствие эффекта	-	8 (47,1%)*
Рецидив после лечения	7 (38.9%)*	9 (100%)*

* различия достоверны ($p < 0,01$)

[†] регресс высыпаний был частичным сопровождался их уплощением и прекращением появления новых элементов

Таблица 13

Динамика диагностических индексов у пациентов III и IV (контрольной) групп

Индекс	Этап лечения	Группа III (n=18)	Группа IV (контрольная) (n=17)
ILP	До	16,6±2,3	16,2±3,6
	После	4,6±1,6*	12,7±4,8*
BRS	До	4,0[3,00;6,00]	3,0[1,00;5,00]
	После	0,0[0,00;0,00] **	1,00[0,00;4,00] **
ДИКЖ	До	20,1±4,5	17,6±4,2
	После	7,7±3,1**	13,5±5,5**
ВАШ	До	3,50[2,00;7,00]	3,00[0,00;5,00]
	После	0,00[0,00;2,00]*	2,00[0,00;5,00]**

*- различия между группами достоверны по t- критерию Стьюдента, $p < 0,05$

** - различия между группами достоверны по критерию Манна Уитни, $p < 0,05$

Таблица 14

Отдаленные результаты лечения больных III и IV (контрольной) групп

Группа пациентов	Отсутствие рецидива в течение 1 года	Отсутствие рецидива в течение 2 лет	Отсутствие рецидива через 3 года
Количество пациентов III группы	14 из 18	12 из 18	11 из 18
Количество пациентов IV (контрольной) группы	0 из 9*	-	-

*у остальных 8 больных процесс персистировал несмотря на лечение.

Динамика иммунологических показателей у пациентов III группы после лечения

При повторном иммунологическом обследовании, проведенном через 7-10 дней после комплексного лечения с применением ЭФХТ и метотрексата, в III группе больных количество сывороточных CD3+CD8+ практически не изменилось (0,58 [0,47; 0,67]10⁹/л), однако значительно уменьшился их активационный потенциал, о чем свидетельствовало снижение их корреляционного взаимодействия с CD38+ ($r=0,47$, $p > 0,05$) (табл.15). Уровень естественных киллерных клеток после лечения также существенно не менялся (0,25 [0,19; 0,33]10⁹/л) (табл.16), хотя способность их к трансэндотелиальной

миграции снизилась, на что указывало отсутствие коэффициента корреляции CD3-CD16+ с CD11b+ ($r=0,55$, $p>0,05$) (табл.16).

Таблица 15

Динамика иммунологических показателей у больных распространенным атипичным красным плоским лишаем кожи и слизистых оболочек (III группа)

Экспрессия кластеров дифференцировки и лимфоцитов	Обследуемые группы			
	Больные аКПЛ в сочетании с аКПЛ СОПР (III группа) до лечения (n=18)		Больные аКПЛ в сочетании с аКПЛ СОПР (III группа) после лечения (n=13)	
	(%)	10 ⁹ /л	(%)	10 ⁹ /л
CD ₃	74,45 [61,70; 77,60]	1,30 [1,11; 1,69]	74,90 [68,60; 78,30]	1,42 [1,16; 1,64]
CD ₄	36,49±9,04	0,64 [0,53; 0,89]	38,77±5,55	0,75 [0,57; 0,82]
CD ₈	28,34±8,17	0,54 [0,45; 0,59]	30,37±7,94	0,58 [0,47; 0,67]
CD ₂₀	5,15 [3,60; 6,50]	0,10 [0,07; 0,13]	5,80 [4,60; 9,50]	0,11 [0,09; 0,18]
HLA-DR	11,50 [7,60; 14,50]	0,22 [0,15; 0,29]	14,60 [12,20; 18,30]	0,24 [0,21; 0,39]
CD ₃₈	52,42±11,05	0,97 [0,77; 1,17]	47,47±13,52	0,91 [0,68; 1,05]
CD ₂₅	4,95 [3,40; 13,30]	0,09 [0,07; 0,23]	5,60 [4,20; 11,20]	0,10 [0,07; 0,24]
CD ₁₆	12,88±4,97	0,20 [0,14; 0,32]	14,95±7,72	0,25 [0,19; 0,33]
CD _{11b}	30,04±8,54	0,53 [0,42; 0,66]	37,25±10,78 *	0,73 [0,55; 0,88]
CD ₅₀	96,35 [94,40; 97,80]	1,79 [1,49; 2,06]	97,90 [95,00; 98,70]	1,82 [1,60; 1,92]
CD ₉₅	53,85 [43,90; 62,20]	1,04 [0,87; 1,22]	53,70 [46,70; 58,90]	1,05 [0,79; 1,12]
CD ₄ /CD ₈ (ед)	0,93 [0,78; 1,10]		1,00 [0,89; 1,20]	

* - $p<0,05$, сравнение показателей внутри III группы пациентов, критерий Стьюдента для зависимых выборок или критерий Вилкоксона (для распределения, отличного от нормального)

Таблица 16

Коэффициент корреляции Спирмена для молекулярной активности и адгезии на CD8+CD3+ лимфоцитах и CD3-CD16+ клетках у больных III группы до и после лечения

Показатель	CD8+CD3+		CD3-CD16+	
	До лечения (n=18)	После лечения (n=13)	До лечения (n=18)	После лечения (n=13)
CD38	0,51*	0,47	0,28	0,26
CD11b	0,68*	0,36	0,49*	0,55
CD50	0,68*	0,59*	0,47	0,25
CD95	0,57*	0,67*	0,42	0,32

* $p<0,05$, статистическая значимость коэффициента корреляции Спирмена

Отсутствие столь выраженной нормализации иммунного статуса после применения ЭФХТ и метотрексата в III группе пациентов, как это имело место после лечения больных I группы с аКПЛ кожи могло быть обусловлено большим количеством сопутствующих заболеваний и применением наряду с ЭФХТ цитостатика метотрексата, однако лечение также было патогенетически обосновано и приводило к снижению активности CD3+CD8+ клеток.

**Комплексный лечебно-диагностический алгоритм, позволяющий
индивидуализировать тактику обследования и лечения больных
различными формами атипичного красного плоского лишая**

На основании проведенного исследования был предложен *комплексный лечебно-диагностический алгоритм*, позволяющий индивидуализировать тактику обследования и лечения больных различными формами аКПЛ (**рис.3**).

При обращении больного с подозрением на аКПЛ кожи (все формы) производят секторальную биопсию очага поражения для гистологического исследования, подтверждающего клиническое предположение об одной из форм аКПЛ. В случае подозрения на пемфигоидный, буллезный КПЛ и синдром перекрытия аКПЛ с красной волчанкой производится инцизионная (punch) биопсия участка видимо здоровой кожи для установления точного диагноза с использованием ПИФ. После подтверждения диагноза аКПЛ кожи гистологически и уточнения его формы методом реакции ПИФ рекомендуется лечение по схеме 1 (**рис. 3**): ЭФХТ на фоне стандартной терапии (делагил по 250 мг внутрь 2 раза в день; тавегил по 1,0 мл внутримышечно 2 раза в день; аппликации кортикостероидной мази (элоком, акридерм, адвантан).

При обращении больного с подозрением на аКПЛ кожи в сочетании с аКПЛ-подобными высыпаниями в полости рта, наряду с тактикой, рекомендованной при аКПЛ кожи (см. выше), предпринимаются следующие меры:

- при подозрении на экссудативно-гиперемическую форму КПЛ СОПР проводят секторальную биопсию очага поражения для ее гистологического подтверждения, а больному при подтверждении этого диагноза рекомендуют лечение по схеме 2 (**рис. 3**): ЭФХТ в комплексе с однократной инъекцией метотрексата на фоне стандартной терапии (делагил по 250 мг внутрь 2 раза в день; тавегил по 1,0 мл внутримышечно 2 раза в день; аппликации кортикостероидной мази на кожу (элоком, акридерм, адвантан); полоскания полости рта 0,1% раствором хлоргексидина; наружно на эрозии: холисал гель).
- при подозрении на предраковые (эрозивно-язвенную и гиперкератотическую) формы КПЛ СОПР производится секторальная биопсия очага поражения, а

при гистологическом подтверждении диагноза - инцизионная (punch) биопсия очага поражения для иммуногистохимического исследования его клеток с использованием маркеров пролиферации (Ki 67) и клеточной адгезии (Е-кадгерина). При подтверждении диагноза аКПЛ СОПР пациенту назначается комплексная терапия с применением ЭФХТ и однократной инъекции метотрексата на фоне указанной выше стандартной терапии, а при иммуногистохимическом подозрении на лейкоплакию или плоскоклеточный рак, больной направляется к стоматологу или онкологу соответственно, для решения вопроса о лечении поражения СОПР и согласования возможности применения пациенту по поводу аКПЛ кожи ЭФХТ на фоне стандартной терапии (**рис. 3**).

Схема 1

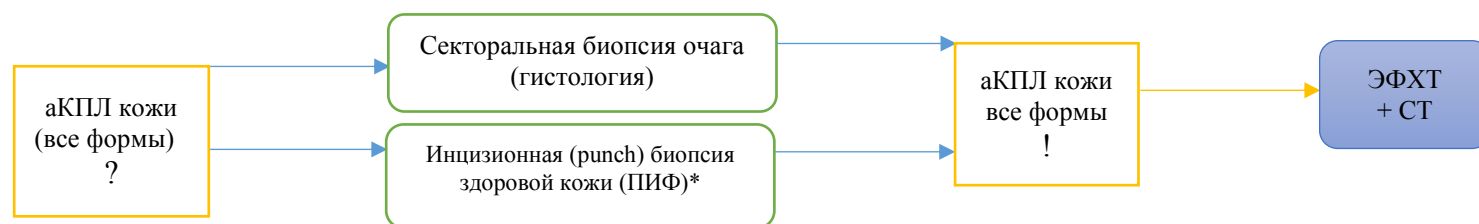
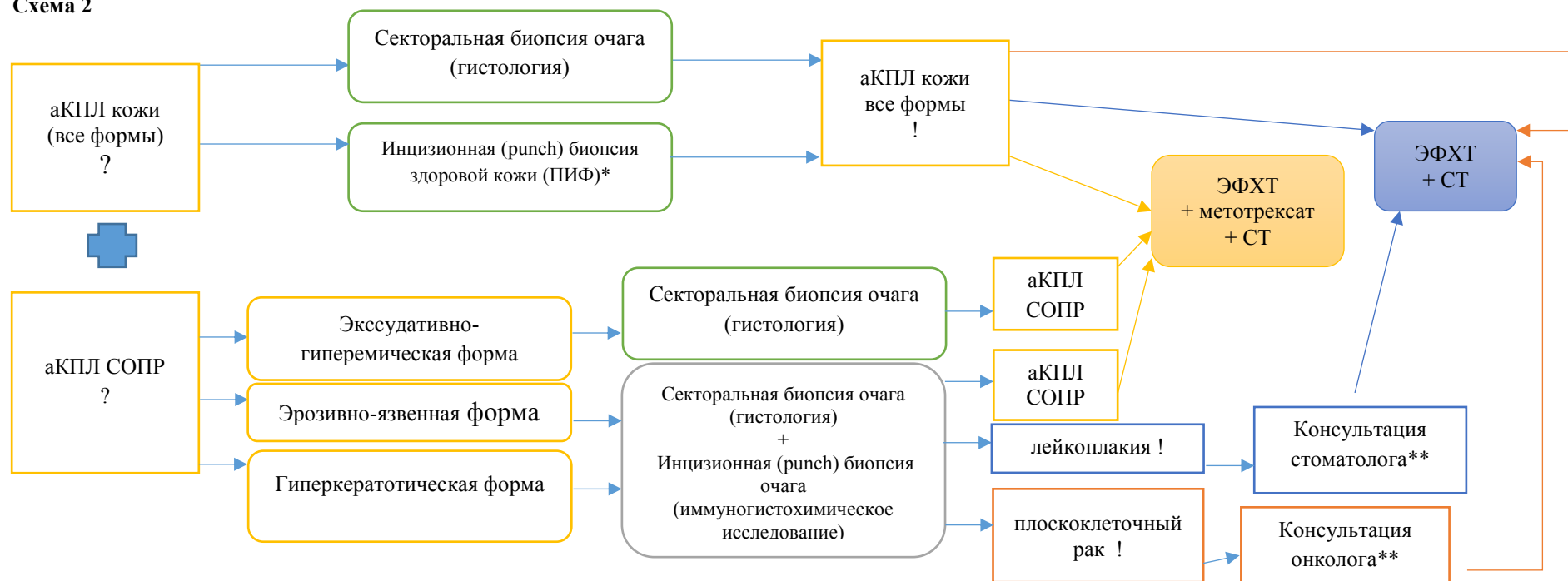


Схема 2



*- при пемфигоидной, буллезной формах, синдроме перекрытия аКПЛ с красной волчанкой

** - для согласования возможности применения пациенту, страдающему аКПЛ кожи, ЭФХТ на фоне стандартной терапии

Рис.3 комплексный лечебно-диагностический алгоритм, позволяющий индивидуализировать тактику обследования и лечения больных различными формами атипичного красного плоского лишая

ВЫВОДЫ

1. Из 97 больных атипичным красным плоским лишаем
 - а) у 81 патологический процесс был представлен кожными формами, в том числе в 31 случае – гипертрофической, в 23 – пигментной, в 11– атрофической, в 8– фолликулярной, в 3– усеченной, в 1 – буллезной, в 1 – эритематозной, в 2 – вульвовагинально-гингивальным синдромом, в 1 – синдромом Гриншпана –Потекаева; в 35 случаях кожный процесс ассоциировался с атипичным красным плоским лишаем слизистой оболочки полости рта, в том числе, в 17 случаях– с гиперкератотическим, в 11 – с эрозивно-язвенным, в 7– с экссудативно-гиперемическим; в 7 случаях кожный процесс ассоциировался с атипичным красным плоским лишаем слизистой половых органов, в том числе в 6 случаях– с эрозивно-язвенным, в 1– гиперкератотическим.
 - б) у 16 патологический процесс был ограничен атипичным красным плоским лишаем слизистой оболочки полости рта: в 6 случаях– экссудативно-гиперемическим, в 5 – эрозивно-язвенным, в 5– гиперкератотическим.
2. Атипичный красный плоский лишай слизистой оболочки полости рта в отличие от лейкоплакии и плоскоклеточного рака той же локализации характеризовался существенным снижением индекса Ki 67 и 100% базальным распределением клеток, ядра которых экспрессируют Ki 67.
3. Атипичный красный плоский лишай слизистой оболочки полости рта в отличие от лейкоплакии характеризовался достоверным снижением мембранно-редуцированной экспрессии Е-кадгерина; наличие цитоплазматической экспрессии Е-кадгерина и отсутствия иммунореактивности с этим маркером достоверно отличали плоскоклеточный рак полости рта от атипичного красного плоского лишая той же локализации.
4. Установлены особенности иммунных нарушений при атипичном красном плоском лишае кожи, которые характеризовались увеличением количества

активированных цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3+CD8+) и естественных киллерных клеток (CD3-CD16+) за счет коэкспрессии на них молекулы активации CD38+, а также способностью цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3+CD8+) и естественных киллерных клеток (CD3-CD16+) к осуществлению трансэндотелиальной миграции, благодаря присутствию на них интегриновой молекулы адгезии CD11b+.

5. Установлены особенности иммунных нарушений при атипичном красном плоском лишае кожи в сочетании с атипичным поражением слизистой оболочки полости рта, которые характеризовались увеличением количества активированных цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3+CD8+), на что указывало присутствие на них молекулы активации CD38+, а также возможностью к трансэндотелиальной миграции и взаимодействию с клетками-мишенями благодаря присутствию на их поверхности молекулы межклеточной адгезии CD50+.
6. Комплексное применение экстракорпоральной фотохимиотерапии при атипичном красном плоском лишае кожи повышает эффективность лечения по сравнению с группой контроля в отношении ближайших и отдаленных результатов, а также является патогенетически обоснованным, обеспечивающим снижение активности цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3+CD8+) и естественных киллерных клеток (CD3-CD16+).
7. Комплексное применение экстракорпоральной фотохимиотерапии и метотрексата при атипичном красном плоском лишае кожи и слизистой оболочки полости рта повышает эффективность лечения по сравнению с группой контроля в отношении ближайших и отдаленных результатов, а также является патогенетически обоснованным, обеспечивающим снижение активности цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3+CD8+).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. С целью дифференциальной диагностики атипичного красного плоского лишая полости рта, лейкоплакии и плоскоклеточного рака той же локализации рекомендуется проведение инцизионной (punch) биопсии очага поражения с последующим его иммуногистохимическим изучением с использованием маркеров пролиферации Ki 67 и адгезии Е-кадгерина.
2. При индексе пролиферации Ki 67 до 10% и локализации его экспрессии исключительно в базальном слое эпидермиса диагностируют атипичный красный плоский лишай слизистой оболочки полости рта; а при 10-14% и локализации его экспрессии там же проводят иммуногистохимическое изучение экспрессии Е-кадгерина, мембранная экспрессия которого будет указывать на атипичный красный плоский лишай слизистой оболочки полости рта.
3. В комплекс лечения распространенного атипичного красного плоского лишая кожи рекомендовано и патогенетически обосновано включение экстракорпоральной фотохимиотерапии.
4. При атипичном красном плоском лишае кожи в сочетании с атипичным красным плоским лишаем полости рта рекомендовано и патогенетически обосновано включение экстракорпоральной фотохимиотерапии в комплексе с однократной внутримышечной инъекцией 10,0 мг метотрексата.
5. Разработан и рекомендован к применению лечебно-диагностический алгоритм обследования и лечения больных атипичным красным плоским лишаем, основанный на использовании гистологических и иммуногистохимических методов исследования биоптатов очага поражения и реакции прямой иммунофлюоресценции видимо здоровой кожи, а в лечении- на применении метода экстракорпоральной фотохимиотерапии при атипичном красном плоском лишае кожи и ее комбинации с 10,0 мг метотрексата при атипичном красном плоском лишае кожи в сочетании с атипичным поражением слизистой оболочки полости рта.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Молочкова, Ю.В. К эффективности такролимуса в терапии эрозивного красного плоского лишая полости рта. / Ю.В.Молочкова // Сборник статей научно-практической конференции с международным участием дерматологов и косметологов ЦФО РФ «Актуальные вопросы дерматовенерологии, дерматоонкологии и косметологии». - 2015. - С. 52-54;
2. Молочкова, Ю.В. Ингибиторы кальциневрина и медиаторов воспаления в топической терапии эрозивного красного плоского лишая полости рта. / Ю.В.Молочкова // **Клиническая дерматология и венерология.-2015. - Т.13.-№ 3. -С. 63-67;**
3. Молочкова, Ю.В. Случай паранеопластического красного плоского лишая, ассоциированного с аденокарциномой прямой кишки./ В.А.Молочков, М.А.Бобров, Ю.В.Молочкова, М.С.Петрова и др. // **Альманах клинической медицины.- 2016 -Т.44. -№ 1 - С. 107-113;**
4. Молочкова, Ю.В. Структура Т-клеточной лимфомы кожи в московской области и эффективность применения экстракорпоральной фотохимиотерапии./ В.А.Молочков, О.В. Карзанов, Ю.В.Молочкова, М.И.Федосеева // Сборник статей межрегиональной научно-практической конференции дерматологов и косметологов «Актуальные вопросы дерматовенерологии, дерматоонкологии и косметологии». - 2016. -С. 61-63;
5. Молочкова, Ю.В. Инвертированный пигментный красный плоский лишай с поражением ладоней и полости рта. / Ю.В.Молочкова// Сборник статей межрегиональной научно-практической конференции дерматологов и косметологов «Актуальные вопросы дерматовенерологии, дерматоонкологии и косметологии». -2016. -С. 74-76;
6. Молочкова, Ю.В. Фотодинамическая терапия генитального красного плоского лишая (обзор литературы). /Ю.В.Молочкова// Сборник статей межрегиональной научно-практической конференции дерматологов и косметологов «Актуальные вопросы дерматовенерологии, дерматоонкологии и косметологии». -2016. -С. 76-80;

7. Молочкова, Ю.В. Фотоферез при вульвовагинально-гингивальном синдроме./ Ю.В.Молочкова// Сборник статей межрегиональной научно-практической конференции дерматологов и косметологов «Актуальные вопросы дерматовенерологии, дерматоонкологии и косметологии». -2016. -С. 80-82;
8. Молочкова, Ю.В. Экстракорпоральная фотохимиотерапия пигментного красного плоского лишая./ Ю.В.Молочкова// Сборник статей межрегиональной научно-практической конференции дерматологов и косметологов «Актуальные вопросы дерматовенерологии, дерматоонкологии и косметологии». - 2016. -С. 83-85;
9. Молочкова, Ю.В. Экстракорпоральная фотохимиотерапия атипичного красного плоского лишая. / Ю.В.Молочкова, О.В.Карзанов// Сборник статей межрегиональной научно-практической конференции дерматологов и косметологов «Актуальные вопросы дерматовенерологии, дерматоонкологии и косметологии». -2016. -С. 85-88;
10. Молочкова, Ю.В. К гистологическим особенностям типичного и атипичного красного плоского лишая. / А.Н.Хлебникова, Ю.В.Молочкова // Сборник статей межрегиональной научно-практической конференции дерматологов и косметологов «Актуальные вопросы дерматовенерологии, дерматоонкологии и косметологии». -2016. -С. 105-106;
11. Молочкова, Ю.В. Экстракорпоральная фотохимиотерапия типичного и атипичного красного плоского лишая./ А.В.Молочков, А.В.Кильдюшевский, Ю.В. Молочкова // **Альманах клинической медицины.- 2016 -Т.44. -№ 2 - С. 213-220;**
12. Молочкова, Ю.В. К дифференциальной диагностике гипертрофического красного плоского лишая с бородавчатым акрокератозом Гопфа./ В.А.Молочков, Ю.В.Молочкова, М.А.Бобров // **Российский журнал кожных и венерических болезней .-2016. - Т.19. -№4 .-С. 238-241;**
13. Молочкова, Ю.В. К проблеме лечения генитального красного плоского лишая./Ю.В.Молочкова// **Исследования и практика в медицине. -2016. - Т.3. -№2 .-С. 53-60;**

14. Молочкова, Ю.В. Клинико-патоморфологические ассоциации красного плоского лишая./ Ю.В.Молочкова, А.Н.Хлебникова// **Российский журнал кожных и венерических болезней** .-2016.-Т.19. -№5 .-С. 286-290
15. Молочкова, Ю.В. Фотоферез- высокоэффективный метод лечения атипичного красного плоского лишая. / В.А.Молочков, Ю.В.Молочкова, А.В.Кильдюшевский и др. // **Вестник последипломного медицинского образования**.-2017. -№ 3. - С. 22-29;
16. Молочкова, Ю.В. К лечению атипичного красного плоского лишая кожи и полости рта./ В.А.Молочков, Ю.Н.Перламутров, Ю.В.Молочкова// **Медицинский алфавит. Стоматология** .-2017.-Т.4.-№36.-С. 36-41;
17. Молочкова, Ю.В. Красный плоский лишай полости рта как междисциплинарная проблема./ В.А.Молочков, М.А.Амхадова, Ю.В.Молочкова// **Медицинский алфавит. Эпидемиология и гигиена** . - 2017.-Т.4.-№38.-С. 52-56;
18. Молочкова, Ю.В. Синдром Гриншпана—Потекаева. / Ю.В.Молочкова, В. А.Молочков, Д.С.Изварина // **Клиническая дерматология и венерология**.- 2017. - Т.16.-№ 6. - С. 50-53;
19. Молочкова, Ю.В. Экстракорпоральная фотохимиотерапия и метотрексат в лечении атипичного красного плоского лишая. / А.В.Молочков, Ю.В.Молочкова, А.В.Кильдюшевский, А.А.Глазков// **Альманах клинической медицины**.-2017 -Т.45. -№ 8 - С. 644-651;
20. Молочкова, Ю.В. Редкий случай изолированного эрозивно-язвенного красного плоского лишая красной каймы губы. / Ю.В.Молочкова, М.А.Амхадова, Ю.Н.Перламутров, М.А.Бобров // **Альманах клинической медицины**.-2017 -Т.45. -№ 8 - С. 681-685;
21. Молочкова, Ю.В. Эффективность и патогенетическая направленность фотофереза при атипичном красном плоском лишае. / Ю.В.Молочкова, А.В.Кильдюшевский, Ю.Н.Перламутров, А.А.Глазков, В.А.Молочков // **Вестник дерматологии и венерологии**.-2018 -№ 1 - С. 51-59;

22. Молочкова, Ю.В. Гипертрофический красный плоский лишай вульвы. / Ю.В. Молочкова, В.А.Молочков, Т.Н.Сироткина // **Клиническая дерматология и венерология.-2018. - Т.17.-№ 1. - С. 26-29;**
23. Молочкова, Ю.В. Частота и особенности различных форм красного плоского лишая в Московском регионе. /Ю.В.Молочкова, В.А.Молочков, Н.К. Гринева // **Альманах клинической медицины.-2018 -Т.46. -№ 1 - С. 82-87;**
24. Молочкова, Ю.В. Новый подход к лечению вульвовагинально-гингивального синдрома. / Ю.В.Молочкова, А.В.Молочков, М.А.Амхадова // **Клиническая дерматология и венерология.-2018. - Т.17.-№ 2. - С. 77-80;**
25. Патент РФ на изобретение № 2651050 «Способ дифференциальной диагностики красного плоского лишая и лейкоплакии слизистой оболочки полости рта», заявка № 2017127009. Авторы: Ю.В.Молочкова, А.Н.Хлебникова, Л.Е.Гуревич, М.А.Бобров, опубликовано - бюллетень № 11 от 18.04.2018

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

аКПЛ	- атипичный красный плоский лишай
ВАШ	- визуально-аналоговая шкала
ВГС	- вульвовагинально-гингивальный синдром
ДИКЖ	- дерматологический индекс качества жизни
КПЛ	- красный плоский лишай
МКА	- моноклональные антитела
ПИФ	- реакция прямой иммунофлюоресценции
СОПР	- слизистая оболочка полости рта
тКПЛ	- типичный красный плоский лишай
УФО	- ультрафиолетовое облучение
ЭФХТ	- экстракорпоральная фотохимиотерапия
BRS	- behavior rating scores
FITC	- флуоресцеина изотиоцианат
Ig	- иммуноглобулин
ILP	- index lichen planus
PBS	- фосфатно-солевой буфер