

О.Ф. Рабинович,
д.м.н., зав. отделением заболеваний
слизистой оболочки рта

И.М. Рабинович,
д.м.н., профессор, зав. отделом
терапевтической стоматологии

И.И. Бабиченко,
д.м.н., профессор, зав. отделом общей
патологии

Е.С. Абрамова,
к.м.н., старший научный сотрудник
отделения заболеваний слизистой
оболочки рта

ЦНИИСиЧЛХ

Аспекты патогенеза пузырных поражений слизистой оболочки рта

Резюме. Изучена возможность применения иммуногистохимического исследования и метода тканевой ПЦР в комплексной диагностике пузырных поражений слизистой оболочки рта (СОР). В комплексное клинико-лабораторное обследование включили 57 пациентов: 32 – с буллезным пемфигоидом и 25 – с истинной пузырчаткой. Результаты иммуногистохимического исследования свидетельствуют о клеточных механизмах повреждения эпителия, в которых принимают участие IgG, C3d-фрагмента комплемента, рецепторы к цитокину-2, а также антитела против белка E-кадгерина. Выявление микроорганизмов в патологически измененных тканях методом ПЦР следует расценивать как один из пусковых механизмов антигенного фактора при пузырных поражениях СОР. Полученные данные убедительно доказывают необходимость применения данных методов в комплексной диагностике пузырных поражений СОР.

Ключевые слова: пемфигус, буллезный пемфигоид, клиника, гистология, иммуногистохимическое исследование, тканевая ПЦР-диагностика

Summary: The possibility of using immunohistochemical study and the method of tissue PCR in the complex diagnosis of vesicular lesions of the oral mucosa has been studied. A total clinical and laboratory examination included 57 patients, including: patients with pemphigoid bullosa (32), pemphigus vulgaris (25). Results of immunohistochemical study indicate cellular mechanisms of epithelial damage, in which IgG, C3d fragments of the complement take part, receptors for cytokine-2, as well as antibodies against E-cadherin protein. Identification of microorganisms in pathologically altered tissues by the method of PCR should be regarded as one of the triggers of the antigenic factor in the vesicular lesions of the oral mucosa. The obtained data convincingly prove the necessity of application of these methods in complex diagnostics of vesicular lesions of the oral mucosa.

Key words: pemphigus vulgaris, pemphigoid bullosa, clinic, histology, immunohistochemical research, tissue PCR-diagnostics

По данным отечественных и зарубежных исследований, среди всех заболеваний слизистой оболочки рта (СОР) наиболее сложными в диагностике и выборе тактики лечения являются пузырные поражения, такие как *pemphigus vulgaris* – истинная или вульгарная пузырчатка, *pemphigoid bullosa* – доброкачественная пузырчатка [1, 3, 9, 15]. Данные заболевания характеризуются рецидивирующим течением, многообразием клинических проявлений, устойчивостью к различным терапевтическим препаратам [7, 10].

По мнению ряда авторов, этиологическими факторами в развитии пузырных поражений СОР являются генетическая и иммунологическая предрасположенность, воздействие вирусных и бактериальных агентов [4, 5]. Провоцирующими факторами рецидива могут быть психоэмоциональное перенапряжение, прием бесконтрольного количества препаратов по поводу

наличия соматической патологии, активация вирусных инфекций, переохлаждение, нарушение диеты [6, 8].

В настоящее время в патогенезе пузырных поражений СОР ведущая роль отводится аутоиммунным процессам, развивающимся в ответ на изменение антигенной структуры клеток эпителия под воздействием различных повреждающих агентов [12, 14].

В инициации патологического процесса пузырных поражений СОР принимают участие мононуклеары, кератиноциты, тучные клетки, а также клетки Лангерганса, в результате активации которых продуцируются аутоантигены и ряд провоспалительных цитокинов с последующей инфильтрацией участка слизистой оболочки Т-лимфоцитами, приводящей к клиническим проявлениям [2, 13]. Разрушение пораженных тканей СОР является главным заключительным этапом аутоиммунного процесса [11].

Цель исследования — выявление особенностей патогенеза на основании изучения иммуноморфологических показателей больных с пузырьными поражениями СОР.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В отделении заболеваний слизистой оболочки рта ЦНИИСиЧЛХ провели комплексное клиничко-лабораторное обследование 57 пациентов (38 женщин и 19 мужчин) в возрасте от 30 до 70 лет, с длительностью заболевания от 1 года до 6 лет, из них пациентов с буллезным пемфигоидом — 32 человека, истинной пузырчаткой — 25 человек.

Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование биопсийного материала проводилось в лаборатории патологической анатомии ЦНИИСиЧЛХ в соответствии со стандартным протоколом. Проведение ИГХ-реакции осуществлялось на Autostainer 360 (Thermo Scientific, США). Тканевые антигены определяли с помощью кроличьих поликлональных антител к C3d (Cell Marque, США) и к IgG (Cell Marque; 1:5000), мышинных моноклональных антител CD25 к рецептору интерлейкина-2 (4C9, Cell Marque; 1:1), кроличьих поликлональных антител к фактору некроза опухолей-альфа (Abbiotec; 1:100), мышинных моноклональных антител к E-кадгерину (SPM471, Thermo Scientific).

В дополнение к ИГХ-исследованию при пузырьных поражениях СОР использовали метод тканевой полимеразно-цепной реакции (ПЦР) для изучения микробной обсемененности патологической ткани, основанный на выявлении специфической ДНК микроорганизмов. В нашей работе изучали обсемененность очага поражения СОР такими видами микроорганизмов и вирусов, как фузобактерии, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Candida albicans*, *Ureaplasma spp.*, папилломавирус общий (HPV), вирус Эпштейна — Барр, цитомегаловирус, герпесвирус I—II типов.

Клиническое обследование пациентов с пузырьными поражениями СОР проводили по общепринятой методике: выявление жалоб, сбор анамнеза, осмотр СОР. Диагноз ставили на основании клинической картины и результатов лабораторных исследований.

При вульгарной пузырчатке характерная клиническая картина выражена локализацией пузырей чаще в задних отделах рта на неизменной или слегка гиперемированной слизистой оболочке (рис. 1). Пузыри быстро вскрываются, образуют эрозии в количестве от одной до двух-трех с обрывками эпителия по периферии. Быстрое вскрытие пузыря происходит в связи с их локализацией в верхних слоях эпителия. Пациент жалуется на чувство жжения и болезненность, особенно при приеме пряной, горячей и острой пищи. Эрозии легко кровоточат во время приема пищи и при дотрагивании инструментом. Они могут находиться на слизистой щек, в углах рта, реже — на мягком небе, боковых поверхностях языка и дне полости рта (рис. 2, 3). При локализации эрозий на боковой и нижней поверхностях

языка отмечается отек и нередко отпечатки зубов. При нарушении состава микрофлоры СОР может появиться неприятный запах изо рта, а дорсальная поверхность языка может быть покрыта серовато-желтым налетом. При локализации на слизистой оболочке и красной кайме губ эрозии быстро покрываются серовато-бурыми и кровавыми корками. Пациенты с трудом принимают пищу, боли усиливаются при разговоре.



Рис. 1. Вульгарная пузырчатка СОР: локализация эрозии с покрывкой пузыря на границе твердого и мягкого неба на гиперемированной слизистой оболочке



Рис. 2. Вульгарная пузырчатка СОР: обширные эрозивные поверхности с покрывкой пузырей в дистальных отделах рта



Рис. 3. Вульгарная пузырчатка СОР: локализация эрозии с покрывкой пузыря в углу рта справа с переходом на слизистую оболочку щеки на фоне гиперемии

При длительно сохраняющихся эрозиях во рту общее состояние больных характеризуется слабостью, быстрой утомляемостью и даже может привести к крайнему истощению (кахексии). Наблюдается симптом Никольского — отделение при незначительном механическом воздействии слоев эпидермиса, лежащих над базальным слоем. По данным цитологического исследования дна эрозий обнаруживаются акантолитические клетки.



Рис. 4. Доброкачественная пузырчатка СОР: локализация пузырей на слизистой оболочке нижней губы на неизменном фоне



Рис. 5. Доброкачественная пузырчатка СОР: локализация пузыря на слизистой оболочке щеки слева на гиперемизированном фоне



Рис. 6. Доброкачественная пузырчатка СОР: обширные пузырьные поражения на слизистой оболочке боковых с переходом на нижнюю поверхность языка на неизменном фоне

Характерной особенностью клинической картины неакантолитической пузырчатки на СОР является то, что пузыри располагаются на гиперемизированном фоне с прозрачным или геморрагическим содержимым (рис. 4, 5). При вскрытии такого пузыря образуется эрозия, малоблезненная при дотрагивании, редко — кровоточащая. Заживление таких эрозий происходит без рубцевания.

Пузыри обычно рецидивируют на неизменных участках слизистой оболочки (рис. 6). Общее состояние пациентов не страдает. Симптом Никольского, как правило, не наблюдается. При цитологическом исследовании со дна эрозий акантолитические клетки не выявляются.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для выявления морфологических изменений при вульгарной пузырчатке СОР провели ИГХ-исследование локализации IgG и фрагмента комплемента C3d. При исследовании биопсийного материала у всех пациентов с данной патологией выявлена локализация C3d-фрагмента комплемента в шиповатом слое эпителия (рис. 7). Также обращало на себя внимание наличие спонтанного активного акантолиза с образованием внутриэпителиальных пузырей и разрыхление базальной мембраны в месте фиксации на ней C3d-фрагмента комплемента. У всех пациентов с вульгарной пузырчаткой СОР обнаружен IgG в парабазальной зоне эпителия (рис. 8). При этом отмечался дефект слизистой в результате разрушения десмоглеина-3, который, являясь белком, входит в состав десмосомных межклеточных контактов. Таким образом, данный факт подтверждает участие IgG и системы фрагмента комплемента в патогенезе аутоиммунной пузырчатки.

У большинства пациентов с данной патологией СОР наблюдали распределение большого количества рецепторов к цитокину-2 (CD25) на мембранах тучных клеток в базальном и шиповатом слоях эпителия, а также клетках воспалительного инфильтрата (рис. 9).

Учитывая, что E-кадгерин является молекулой межклеточной адгезии, в нашей работе для выявления объема поражения в эпителии при вульгарной пузырчатке СОР использовали антитела против белка межклеточных контактов E-кадгерина (рис. 10). По данным ИГХ-исследования наблюдаются хорошо сохранившиеся межклеточные контакты в поверхностных слоях эпителия и отсутствие межклеточных связей в шиповатом слое эпителия вокруг дефекта СОР.

При ИГХ-исследовании у пациентов с доброкачественной пузырчаткой локализация C3d-фрагмента комплемента (рис. 11) и IgG (рис. 12) отмечается в зоне базальной мембраны. Это приводит к разрушению гемидесмосомных структур, связывающих базальные клетки с базальной мембраной, и возникновению дефекта слизистой оболочки, клинически проявляющегося в виде пузыря. Рецепторы CD25 у таких пациентов распределялись на мембранах тучных клеток воспалительного

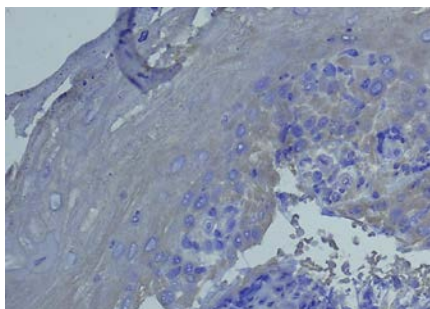


Рис. 7. Вульгарная пузырчатка СОР: локализация С3d-фрагмента комплемента в шиповатом слое эпителия (ув. 400)

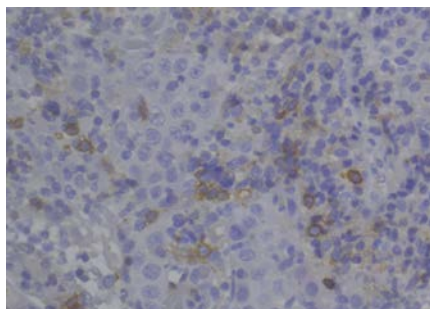


Рис. 9. Вульгарная пузырчатка СОР: распределение CD25 на мембранах тучных клеток в базальном и шиповатом слоях эпителия, а также клетках воспалительного инфильтрата (ув. 400)

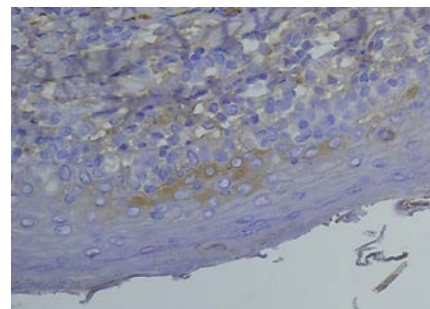


Рис. 12. Доброкачественная пузырчатка СОР: распределение IgG в зоне базальной мембраны (ув. 400)

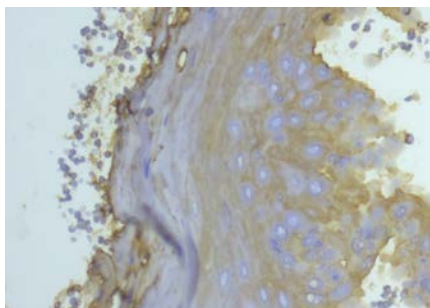


Рис. 8. Вульгарная пузырчатка СОР: локализация IgG в парабазальной зоне эпителия (ув. 400)

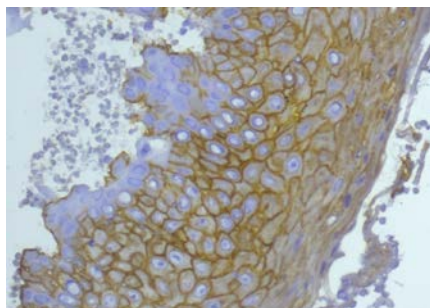


Рис. 10. Вульгарная пузырчатка СОР: хорошо сохранившиеся межклеточные контакты в поверхностных слоях эпителия и отсутствие межклеточных связей в шиповатом слое эпителия вокруг дефекта слизистой оболочки (ув. 400)

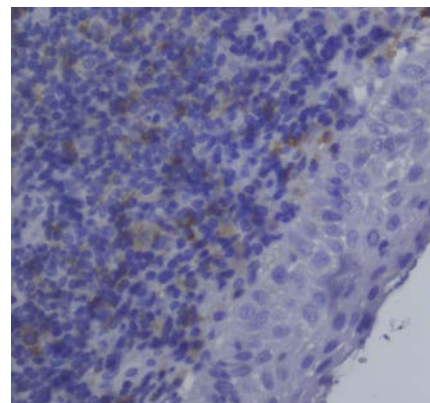


Рис. 13. Доброкачественная пузырчатка СОР: CD25 распределялись на мембранах тучных клеток воспалительного инфильтрата (ув. 400)

инфильтрата (рис. 13). При использовании антител к Е-кадгерину обнаружены хорошо сохранившиеся межклеточные контакты во всех слоях многослойного плоского эпителия (рис. 14).

Методом тканевой ПЦР в очаге поражения СОР при вульгарной пузырчатке обнаружили *Streptococcus pneumoniae* в 13% случаев, *Candida albicans* и НРV общий — в 25% случаев; при доброкачественной пузырчатке фузобактерии, *Streptococcus pneumoniae* и *Ureaplasma* выявлялись в 11% случаев, НРV общий — в 33% и EBV — в 12% случаев. Полученные данные в дальнейшем явились объективным основанием для назначения специфической терапии в комплексном лечении пузырных поражений СОР.

ВЫВОДЫ

У пациентов с вульгарной пузырчаткой ИГХ-исследование выявило в парабазальной зоне эпителия распределение IgG и С3d-элементов комплемента. В свою очередь высокая концентрация рецепторов к цитокину-2 на поверхности тучных клеток, расположенных в парабазальной зоне эпителия, свидетельствует

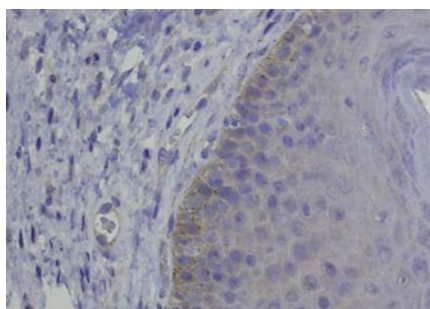


Рис. 11. Доброкачественная пузырчатка СОР: распределение С3d-фрагмента комплемента наблюдалось в зоне базальной мембраны, что приводит к разрушению гемидесмосомных структур, связывающих базальные клетки с базальной мембраной (ув. 400)

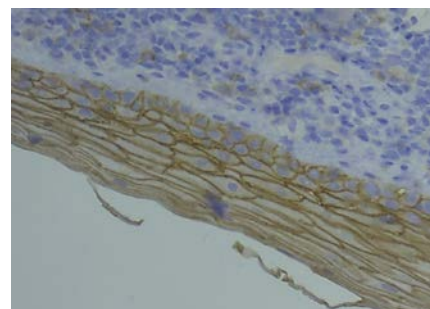


Рис. 14. Доброкачественная пузырчатка СОР: отмечаются хорошо сохранившиеся межклеточные контакты во всех слоях многослойного плоского эпителия (ув. 200)

о клеточных механизмах повреждения эпителия, в которых принимают участие также антитела к Е-кадгерину. При доброкачественной пузырчатке в основе повреждения эпителия также лежат иммуноморфологические механизмы: выявлена локализация IgG и С3d в зоне базальной мембраны, при этом рецепторы к цитокину-2 распределялись на поверхности тучных клеток в эпителии. Во всех слоях многослойного плоского эпителия при ИГХ-исследовании визуализируются хорошо сохранившиеся межклеточные контакты.

Выявление микроорганизмов в патологически измененных тканях при пузырьных поражениях СОР следует расценивать как один из пусковых механизмов антигенного фактора с последующим развитием аутоиммунного конфликта, вызывающим в дальнейшем появление специфической клинической картины данных заболеваний.

Полученные нами данные клинко-лабораторного исследования позволят в дальнейшем разработать новый подход к лечению пациентов с пузырьными поражениями СОР.

Л И Т Е Р А Т У Р А :

1. **Baum S., Sakka N., Artsi O., Trau H., Barzilai A.** The classification of autoimmune blistering diseases. — *Autoimmun Rev.* — 2014; 13 (4—5): 482—9.
2. **Bobr A., Olvera-Gomez I., Igyarto B.Z., Haley K.M., Hogquist K.A., Kaplan D.H.** Acute ablation of Langerhans cells enhances skin immune responses. — *J Immunol.* — 2010; 185 (8): 4724—8.
3. **Culton D.A., McCray S.K., Park M., Roberts J.C., Li N., Zedek D.C., Anhalt G.J., Cowley D.O., Liu Z., Diaz L.A.** Mucosal pemphigus vulgaris anti-Dsg3 IgG is pathogenic to the oral mucosa of humanized Dsg3 mice. — *J Invest Dermatol.* — 2015; 135 (6): 1590—7.
4. **Dillner J., Meijer C. J., von Krogh G., Horenblas S.** Epidemiology of human papillomavirus infection. — *Scand J Urol Nephrol Suppl.* — 2000; (205): 194—200.
5. **Brandão M.L., Fernandes N.C., Batista D.P., Santos N.** Refractory pemphigus vulgaris associated with herpes infection: case report and review. — *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* — 2011; 53 (2): 113—7.
6. **Grando S.A.** Pemphigus and realities. — *Autoimmunity.* — 2012; 45: 1: 7—35.
7. **Gupta R., Woodley D.T., Chen M.** Epidermolysis bullosa acquisita. — *Clin Dermatol.* — 2012; 30 (1): 60—9.
8. **Hertl M. (ed.).** Autoimmune diseases of the skin: pathogenesis, diagnosis, management. — 3d ed. — Springer, 2011. — 594 p.
9. **Iamaroon A., Boonyawong P., Klanrit P., Prasongtunskul S., Thongprasom K.** Characterization of oral pemphigus vulgaris in Thai patients. — *J Oral Sci.* — 2006; 48 (1): 43—6.
10. **Ishii N., Hamada T., Dainichi T., Karashima T., Nakama T., Yasumoto S., Zillikens D., Hashimoto T.** Epidermolysis bullosa acquisita: what's new? — *J Dermatol.* — 2010; 37 (3): 220—30.
11. **Javor J., Chmurova N., Parnicka Z., Ferencik S., Grosse-Wilde H., Buc M., Svecova D.** TNF-alpha and IL-10 gene polymorphisms show a weak association with pemphigus vulgaris in the Slovak population. — *J Eur Acad Dermatol Venereol.* — 2010; 24 (1): 65—8.
12. **Maecker H.T., McCoy J.P., Nussenblatt R.** Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. — *Nat Rev Immunol.* — 2012; 12 (3): 191—200.
13. **Seneschal J., Clark R.A., Gehad A., Baecher-Allan C.M., Kupper T.S.** Human epidermal Langerhans cells maintain immune homeostasis in skin by activating skin resident regulatory T cells. — *Immunity.* — 2012; 36 (5): 873—84.
14. **Shamim T., Varghese V.I., Shameena P.M., Sudha S.** Pemphigus vulgaris in oral cavity: clinical analysis of 71 cases. — *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* — 2008; 13 (10): E622—6.
15. **Wolf R., Matz H., Ruocco E., Ruocco V.** The putative role of apoptosis in the induction of pemphigus. — *Med Hypotheses.* — 2005; 64 (1): 44—5.