

На правах рукописи

Тигай Юлия Олеговна

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
МАЛИГНИЗАЦИИ ЭПИТЕЛИЯ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ
ПОЛОСТИ РТА**

3.3.2 Патологическая анатомия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

Москва, 2026

Работа выполнена на кафедре патологической анатомии федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» Минобрнауки РФ

Научный руководитель:

Ивина Анастасия Анатольевна, доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры патологической анатомии Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы»

Официальные оппоненты:

Андреева Юлия Юрьевна, доктор медицинских наук, профессор кафедры патологической анатомии ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации;

Туманова Елена Леонидовна, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный врач РФ, заведующая кафедрой патологической анатомии и клинической патологической анатомии детского возраста ИБПЧ ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России (Пироговский Университет);

Карнаухов Николай Сергеевич, доктор медицинских наук, заведующий патологоанатомическим отделением ГБУЗ «Московский клинический научно-практический центр имени А.С. Логинова ДЗМ».

Защита состоится «11» июня 2026 г. в ____ на заседании Диссертационного совета ПДС 0300.006 при Российском университете дружбы народов по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

С диссертацией можно ознакомиться в читальном зале УНИБЦ (Научная библиотека) ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (адрес: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6) и на сайте: <http://rudn.ru/science/dissovet/dissertacionnye-sovety/pds-03000006>

Автореферат разослан «__» _____ 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
ПДС 0300.006 кандидат медицинских наук

Горячев Вячеслав
Александрович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Заболевания слизистой оболочки полости рта (СОПР), а особенно плоскоклеточный рак (ПР) являются предметом исследований по всему миру. Их распространённость варьирует в зависимости от географического региона и в основном затрагивает работоспособное население (Чистенко Г.Н. и др., 2020; Cristaldi M. et al., 2019).

Актуальность проблемы заболеваемости ПР СОПР обусловлена увеличением частоты выявления в последние годы. По данным отечественных авторов ПР СОПР чаще встречается у мужчин, чем у женщин в соотношении 2,2:1 и выявляется уже на поздних стадиях, что объясняет высокий уровень смертности (Рыхлевич А.А. и др., 2021). В основном ПР обнаруживается у лиц 60–70 лет и старше, однако в последнее время его диагностируют у молодого населения, при этом заболевание протекает агрессивнее и чаще рецидивирует, чем у возрастных пациентов (Жуйкова Л.Д. и др., 2024). По данным зарубежных авторов ПР имеет тенденцию не только к омоложению, но и к увеличению количества женщин (Zygiogianni A.G. et al., 2011). Несмотря на доступность СОПР для визуального осмотра, диагноз ПР часто ставится на поздних стадиях из-за разнообразия клинических проявлений и неспецифичности симптомов, а также из-за поздней обращаемости пациентов (Sung H. et al., 2021; Керимханов К.А. и др., 2025). Считается, что ПР редко возникает в изначально здоровом органе, и у каждого онкологического заболевания есть предшествующие ему предраковые изменения (Vogelstein B. et al., 2004).

Практически каждая опухоль имеет один из видов повреждений в гене, и инактивация супрессорных генов встречаются гораздо чаще, чем активирующие мутации в онкогенах (Hafner A. et al., 2019). Чаще всего в этой области исследуют гены, отвечающие за стабильность генома, пролиферацию, апоптоз, ангиогенез, клеточную адгезию и репарацию ДНК. Именно они выполняют ключевую роль в прогрессировании заболевания (Hanahan D. et al., 2011; Stratton M.R. et al., 2009; Ravindran S. et al., 2025). Во многих случаях генетические изменения происходят в одной и той же клетке одновременно на уровне различных хромосомных участках. Именно это делает опухолевую ткань неоднородной, а раковые клетки приобретают aberrантный хромосомный набор (Gerlinger M. et al., 2012; El-Naggar A.K. et al., 2001).

Своевременная диагностика ПР СОПР влияет на прогноз, что напрямую коррелирует со стадией заболевания на момент постановки диагноза. Известно, что общая 5-летняя выживаемость составляет около 60–68%. Однако при диагностике ПР начальной стадии этот показатель может достигать 85–90%, в то время как при наличии регионарных метастазов на более поздних стадиях он снижается до 40–60%, а при отдаленных метастазах не превышает 35% (Sung H. et al., 2020; Siegel R.L. et al., 2023).

Несмотря на достижения в комбинированном лечении, включающие в себя хирургическое лечение, лучевую терапию и современные методы системной терапии основным критерием, который определяет исход, является ранняя диагностика. Выявление и адекватное лечение потенциально злокачественных заболеваний (ПЗЗ) и ПР на начальных стадиях является основной стратегией для улучшения прогноза (Warnakulasuriya S., 2021; Carreras-Torras C. et al., 2015). Современная диагностика предраковых заболеваний основана на исследовании экспрессии различных белков при помощи иммуногистохимического (ИГХ) исследования (Bugshan A. et al., 2020).

Молекулярно-генетические методы диагностики широко применяются для исследования перестроек генома и применяются для диагностики наследственных нарушений (синдром Дауна, гемофилия, муковисцидоз), а также для диагностики онкологических заболеваний (рак матки, желудка, простаты, легких). Хорошие результаты в диагностике опухолевых процессов показали такие методы как CISH (chromogenic *in situ* hybridization – хромогенная гибридизация *in situ*) и FISH (fluorescence *in situ* hybridization– флуоресцентная гибридизация *in situ*) (Seethalakshmi C. et al., 2013; Bavle R. et al., 2016).

Традиционно критерием гистологической оценки ранней малигнизации эпителия является определение степени эпителиальной дисплазии (ЭД). Этот критерий является «золотым стандартом», но имеет ряд ограничений, а именно: субъективность интерпретации и недостаточную прогностическую ценность, особенно при начальных этапах малигнизации (Odell E.W. et al., 2017; Iocca O. et al., 2020; Tilakaratne W.M. et al., 2009). Это диктует острую необходимость в разработке комплексного подхода, который объединяет морфологическую картину с объективными данными о молекулярном статусе клеток.

Таким образом, актуальность исследования обусловлена необходимостью анализа молекулярных и геномных изменений, которые могут проявляться при малигнизации предраковых поражений СОПР в ПР. Это позволит осуществлять дифференциальную диагностику различных морфологических проявлений, встречающихся при исследовании предраковых поражений на ранних стадиях, что способствует постановке более точного и своевременного диагноза.

Цель исследования

Целью настоящего исследования является выявление молекулярных и генетических маркеров для ранней диагностики малигнизации эпителия слизистой оболочки полости рта.

Задачи исследования

1. Оценить пролиферативную активность эпителиальных клеток по экспрессии белка Ki-67 и активности теломеразной обратной транскриптазы (TERT) на различных стадиях малигнизации эпителия СОПР от эпителиальной гиперплазии (ЭГ) до ПР.

2. Провести сравнение различных клонов белка P53 (DO-7 и Y-5) при оценке ЭГ, ЭД и ПР.
3. Выявить особенности амплификации гена *TERC* при ЭГ, ЭД, ПР СОПР.
4. Разработать молекулярно-генетические критерии при дифференциальной диагностике веррукозной гиперплазии (ВГ) и веррукозной карциномы (ВК) на основе экспрессии белков Ki-67, P53, TERT и амплификации гена *TERC*.
5. Разработать алгоритм ранней молекулярно-генетической диагностики малигнизации СОПР.

Методология и методы исследования

Методология исследования построена на системном и комплексном анализе данных. Методы, использованные в работе: морфологический анализ, иммуногистохимическое исследование, молекулярно-генетическое исследование, технология тканевых матриц (ТМА, tissue microarray), анализ ряда клинических данных, статистическая обработка результатов. Предмет исследования: архивный операционный и биопсийный материал лаборатории патологической анатомии и НМИЦ «ЦНИИСиЧЛХ» Минздрава России за период с 2018 по 2024 год.

Научная новизна исследования

Впервые проведён комплексный сравнительный анализ экспрессии молекулярных маркеров Ki-67, P53 (клоны DO-7 и Y-5) и активность TERT при малигнизации эпителия СОПР от ЭГ до ПР. Впервые показана высокая информативность амплификации гена *TERC* для диагностики ранних стадий малигнизации эпителия СОПР. Впервые на основе сравнения экспрессии различных клонов белка P53 (DO-7 и Y-5) показана диагностическая ценность клона Y-5, при выявлении ВК и ПР. Впервые на основании сравнения амплификации гена *TERC* в ВК и ПР, показано, что ВК следует рассматривать как эпителиальную дисплазию высокой степени (ЭДВС).

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость исследования заключается в углублении представлений о молекулярных механизмах многоступенчатого канцерогенеза СОПР. Полученные результаты детализируют роль нарушения контроля клеточного цикла (Ki-67, P53, TERT) и нарастания геномной нестабильности (амплификация гена *TERC*) в инициации и прогрессии опухолевого процесса. Работа вносит вклад в фундаментальное понимание патогенеза ПР и его веррукозного варианта на молекулярном уровне, устанавливая связь между конкретными генетическими событиями и морфологическими проявлениями. Полученные данные способствуют развитию более точных методов диагностики и целенаправленных терапевтических стратегий, а также

углубляют фундаментальные знания патогенеза данного онкологического заболевания на молекулярно-генетическом уровне.

Практическая значимость работы состоит в том, что разработанный на основе исследования диагностический алгоритм может быть внедрен в ежедневную клиническую практику врача-патологоанатома. Применение предложенной панели маркеров повышает точность и объективность диагностики, особенно в сложных случаях и при малом объеме биопсийного материала. Результаты исследования создают основу для улучшения диагностики и прогнозирования течения веррукозных поражений СОПР, позволяя своевременно отличить ВГ от ВК. Внедрение результатов исследования молекулярно-генетических методов в практику способствует раннему выявлению злокачественной трансформации, что напрямую влияет на выбор адекватного лечения и улучшение прогноза для пациентов. Разработанный диагностический алгоритм и полученные результаты могут стать основой для создания стандартизированных протоколов обследования и мониторинга пациентов с предраковыми поражениями СОПР, что повысит эффективность профилактических мероприятий и снизит риск развития ПР.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Процесс малигнизации эпителия СОПР от ЭГ к ПР сопровождается нарастанием экспрессии маркеров пролиферации Ki-67, апоптоза P53 (клоны DO-7 и Y-5) и TERT, что отражает ключевые этапы опухолевой прогрессии.

2. Экспрессия клона DO-7 белка P53 проявляется на всех исследованных стадиях малигнизации эпителия от ЭГ к ПР, а экспрессия клона Y-5 начинает выявляться при ЭДВС и увеличивается при ПР.

3. Амплификация гена *TERC* свидетельствует о геномной нестабильности и повышенном риске распространения опухолевого процесса и начинает определяться при ЭДВС.

4. Молекулярно-генетический профиль экспрессии белков Ki-67, P53 (клон Y-5) и TERT позволяют проводить дифференциальную диагностику ВГ и ВК и на ранних стадиях выявлять малигнизацию эпителия СОПР.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Область настоящего диссертационного исследования соответствует п. 3 («Исследование структурных, молекулярно-клеточных и молекулярно-генетических механизмов развития заболеваний в целом и отдельных их проявлений (симптомы, синдромы), создание основ персонализированной патогенетической терапии и профилактики») паспорта специальности 3.3.2 Патологическая анатомия.

Внедрение результатов исследования

Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс на кафедре патологической анатомии медицинского института РУДН и используются при преподавании следующих дисциплин: Патологическая анатомия, клиническая патологическая анатомия (специальность «Лечебное дело», 3-й курс); Патологическая анатомия, патанатомия головы и шеи (специальность «Стоматология», 3-й курс); Патологическая анатомия (ординатура и ДПО).

Степень достоверности и апробация результатов

Выводы соответствуют задачам и логически следуют из результатов, полученных в ходе исследования. Достоверность результатов обоснована изучением достаточного объема материала и использованием методов, отвечающих поставленным задачам.

Результаты диссертационного исследования доложены и опубликованы в виде тезисов на X Ежегодной Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы медицины» и «IV спутниковый форум по общественному здоровью и политике здравоохранения» 27-28 апреля 2023 г. Баку, Азербайджан, на XI Ежегодной Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы медицины» и «V спутниковый форум по общественному здоровью и политике здравоохранения» 27-28 марта 2024 г. Баку, Азербайджан, на 78-й Международной научно-практической конференции «Достижения фундаментальной, прикладной медицины и фармации» 17 мая 2024 г. Самарканд, Узбекистан, на XX Международной (XXIX Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых учёных 20 марта 2025 г. Москва, Россия.

Личный вклад автора. Автор принимала участие в выполнении всех этапов диссертационного исследования: самостоятельно запланировала исследование, определила его цель и задачи, провела анализ литературы, охватывающий как отечественные, так и зарубежные источники, посвященные теме диссертационного исследования, активно участвовала в исследовании полученных в ходе эксперимента гистологических препаратов. Также провела статистический анализ данных, разработала практические рекомендации и самостоятельно подготовила публикации по результатам диссертационного исследования, включая статьи и тезисы.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, из них 4 статьи в журналах, входящих в перечень рецензируемых SCOPUS научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание учёной степени кандидата медицинских наук, и 4 публикаций в материалах российских и международных научных конференций.

Объем и структура диссертации

Объем диссертации составляет 122 страниц и включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов, 2 главы собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации. Список литературы представлен 221 источником отечественных и иностранных авторов. Работа иллюстрирована 50 рисунками и 7 таблицами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Материалы и методы исследования

В диссертационное исследование были исследованы биоптаты слизистой оболочки рта 166 пациентов, в том числе 73 женщины и 93 мужчин. Средний возраст женщин составил 68 лет, а мужчин – 71 год. Материал отбирался по клиническим диагнозам: лейкоплакия (71 случай) и плоскоклеточный рак (95 случаев). Биопсийный материал был определён в группы по гистологическим диагнозам согласно классификации ВОЗ (2017). Были выявлены: ЭГ в 32 случаях, ВГ в 30 случаях, ЭДНС в 31 случае, ЭДВС в 27 случаях, ВК в 14 случаях, ПР в 32 случаях. В настоящем исследовании для исследования ЭД была использована бинарная система классификации (Nankivell P. et al., 2013).

Проведение диссертационного исследования одобрено Комитетом по этике научных исследований ФГАОУ ВО РУДН им. Патриса Лумумбы (9 декабря 2025 года, протокол №10).

Гистологическое исследование проводилось при помощи «Гематоксилин Карацци» (BioVitrum, Россия) в автоматическом режиме 740 Thermo Scientific с использованием гематоксилина и эозина. После окраски стёкла погружали в среду Bio-Mount (Bio Optica Milano S.P.A., Италия).

Исследуемый многослойный плоский эпителий представлен слоями клеток; однако признаки неоплазии выявлялись только в нижней половине эпителия – от базальной мембраны до зернистого слоя. В данной работе, при всех нозологиях, кроме ПР СОПР, оценку экспрессии маркеров проводили в 300 клетках двух зон эпителия: первая – ростковая зона (мальпигиев слой), включающая базальный слой и два вышележащих ряда клеток; вторая – шиповатый слой. При ПР СОПР оценивали экспрессию в центральной и периферической зонах опухоли.

Пролиферативную активность клеток исследовали при помощи мышиных моноклональных антител к Ki-67 – клон MM1 (Diagnostic Biosystems, США).

Апоптотическую активность по белку P53 определяли при помощи мышиных моноклональных антител – клон DO-7 (Novocastra, Великобритания) и кроличьих моноклональных антител к белку P53 клон Y-5 (EPITOMICS, США).

Активность теломеразной обратной транскриптазы (TERT) исследовали с помощью поликлональных кроличьих антител (TRT Antibody, АВБИОТЕС, США). TERT при ИГХ исследовании определяли по наличию реакции в ядрах клеток. Экспрессию белка оценивали по интенсивности окрашивания ядер в коричневый цвет: 0 – окрашивание отсутствует, 1 – слабая интенсивность окрашивания, 2 – умеренная интенсивность окрашивания, 3 – выраженное окрашивание.

Для выявления копий гена *TERC* в исследуемых образцах СОПР был использован метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Исследование проводили на серийных срезах

толщиной 4–5 мкм, полученных с парафиновых блоков. В работе применялся набор ДНК-зондов (LSP *TERC/CCP3* FISH Probe Kit, CytoTest, USA), предназначенный для одновременной детекции локуса гена *TERC* и центромерного региона хромосомы 3. В набор входили два зонда: ДНК-зонд, специфичный к локусу гена *TERC* (расположен на хромосомном участке 3q26), меченный оранжевым флуорофором, и зонд, специфичный к альфа-сателлитной последовательности центромеры хромосомы 3 (*CCP3*), меченный зелёным флуорофором, который использовался в качестве контрольного сигнала для оценки анеуплоидности хромосомы. Амплификация гена *TERC* определялась при использовании флуоресцентного микроскопа (Imager.M2, Zeiss), который оснащён соответствующими наборами светофильтров для DAPI (синий), а также для индикации оранжевого и зелёного флуорофоров. Анализ осуществлялся путём подсчёта количества оранжевых (*TERC*) и зелёных (*CCP3*) сигналов. Интерпретация результатов проводилась на основе соотношения числа сигналов *TERC* и *CCP3*, где нормальный статус клетки (отсутствие амплификации), а соотношение $TERC/CCP3 \leq 2,0$ (2:2) это диплоидные клетки с двумя оранжевыми и двумя зелёными сигналами.

Амплификацию гена *TERC* оценивали как положительную при наличии более двух оранжевых сигналов, а появление трёх и более зелёных сигналов указывало на увеличение числа хромосом. Теломеразную обратную транскриптазу (TERT) при ИГХ и *TERC* при FISH исследовали в тех же участках, где определяли пролиферативную активность клеток (по маркеру Ki-67) и апоптоз (по различным клонам белка P53 DO-7 и Y-5). Анализ и подсчёт проводили при увеличении $\times 200$ для ИГХ и $\times 1000$ для FISH.

Статистическую обработку данных проводили в среде Windows 10 (IBM Corporation, США), используя SPSS Statistics 23 version. Для количественной оценки результатов проводились морфометрические исследования.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе было проведено комплексное исследование ключевых звеньев канцерогенеза СОПР при помощи анализа панели маркеров, отражающих различные этапы и механизмы малигнизации (Рисунок 1).

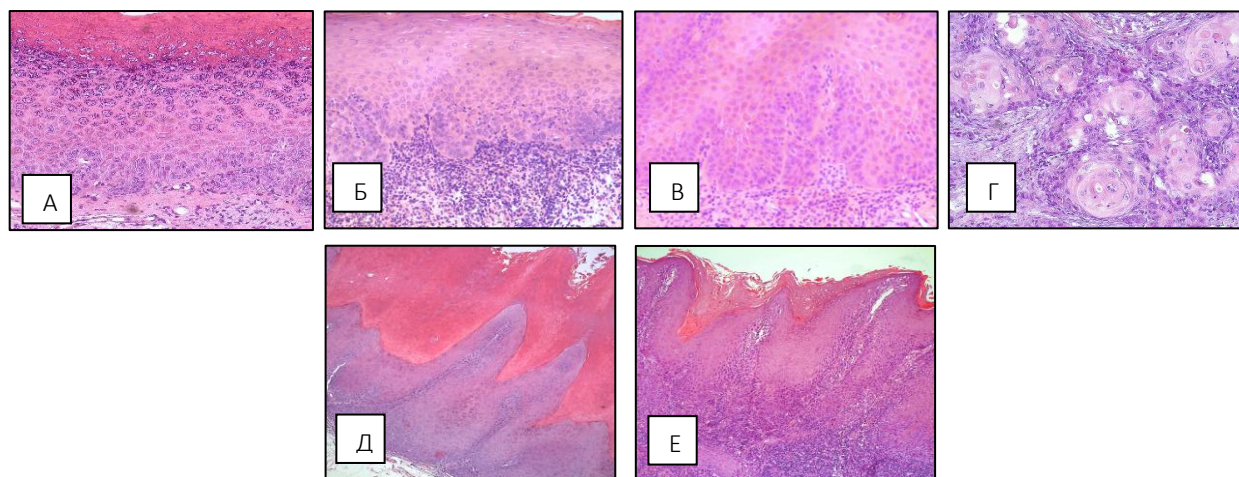


Рисунок 1 – А – ЭГ×100; Б – ЭДНС×100; В – ЭДВС×100; Г – ПР×200; Д – ВГ×100; Е – ВК×200, Окр. гематоксилин-эозин

В исследовании при ЭГ и ВГ пролиферирующие клетки локализовались преимущественно в базальном и парабазальном слоях, что характерно для физиологической регенерации или реактивного ответа клеток на внешнее повреждение (химическая, термическая, механическая травмы). Тогда как при ЭДВС и ВК иммунопозитивные клетки по белку Ki-67 распространялись на среднюю и верхнюю трети эпителиального пласта. Данный показатель является морфологическим проявлением отсутствия контроля над клеточной дифференцировкой и служит одним из надёжных признаков злокачественной трансформации эпителия. Однако сама по себе высокая пролиферация не является синонимом неоплазии. В результате проведённого исследования была выявлена пролиферация клеток по белку Ki-67 в ядрах эпителиальных клеток при всех исследуемых диагнозах: ЭГ, ЭДНС, ЭДВС, ПР, ВГ и ВК.

Были проанализированы показатели пролиферации клеток эпителия с помощью маркера Ki-67, что позволило оценить активизацию клеточного деления и выявить участки повышенной пролиферации (Рисунок 2).

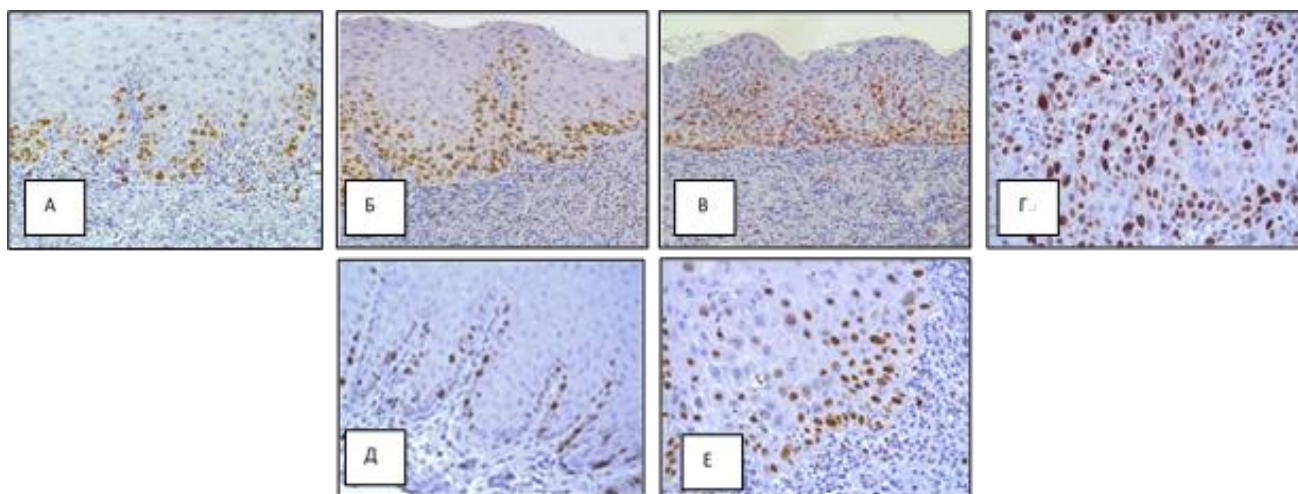


Рисунок 2 – А – ЭГ×200; Б – ЭДНС×200; В – ЭДВС×100; Г – ПР×400; Д – ВГ×200; Е – ВК×200, ИГХ реакция с антителами к белку Ki-67. Окр. ДАБ-гематоксилином Майера

В генетически стабильных (здоровых) клетках существуют мощные механизмы, сдерживающие деление клеток с поврежденной ДНК, основным маркером этих процессов является белок-супрессор P53 и его основной задачей является регуляция клеточного цикла, остановка деления клеток при повреждении ДНК, запуск апоптоза и поддержание геномной стабильности, что предотвращает развитие опухолевой трансформации.

Нарушения механизмов апоптоза и контроля клеточного цикла исследовались с помощью анализа различных клонов белка P53 (DO-7 и Y-5), которые играют важную роль в регуляции апоптоза и остановке деления при повреждении ДНК (Рисунок 3).

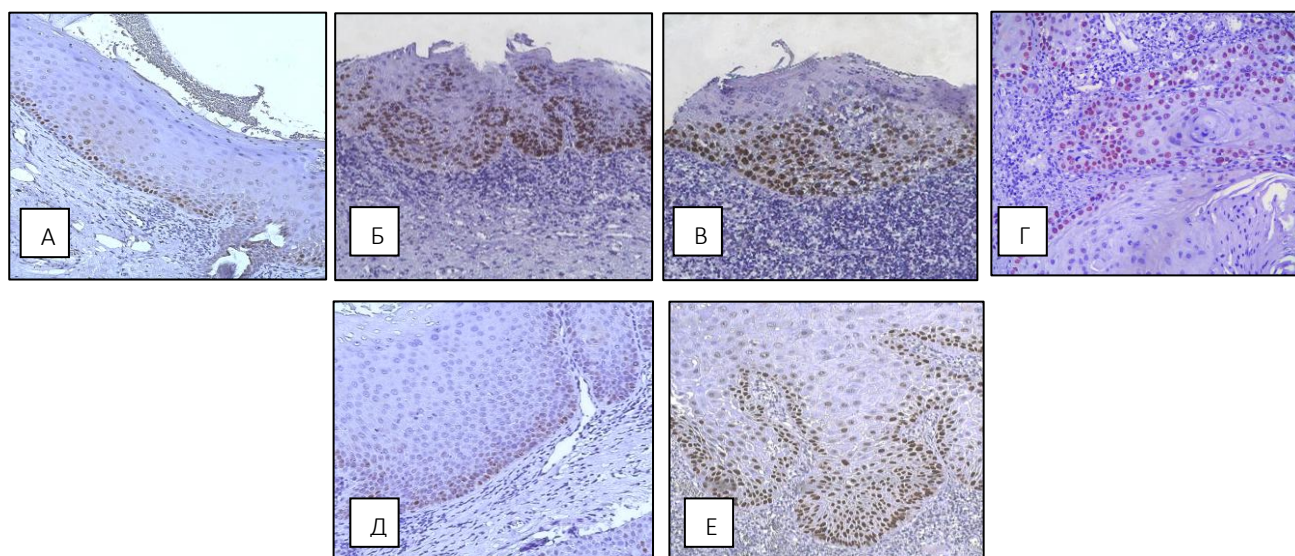


Рисунок 3 – А – ЭГ×200; Б – ЭДНС×100; В – ЭДВС×100; Г – ПР×200; Д – ВГ×100; Е – ВК×200, ИГХ реакция с антителами к белку P53 (клон DO-7). Окр. ДАБ-гематоксилином Майера

Экспрессия клона DO-7 достоверно нарастает от ЭГ к ЭДВС и от ВГ к ВК. Повышение экспрессии данного клона отражает активность защитных механизмов, однако при

прогрессировании злокачественного процесса эти механизмы могут быть подавлены или недостаточны для предотвращения опухолевого роста.

Экспрессия клона Y-5 является ключевым событием в канцерогенезе СОПР и увеличивается по мере увеличения степени тяжести ЭД. Как показали наши результаты экспрессия клона Y-5 выражено появляется при ЭДВС и резко увеличивается к ПР. Данный результат свидетельствует об инактивации гена-супрессора *TP53*, что служит одним из центральных событий в канцерогенезе (Рисунок 4).

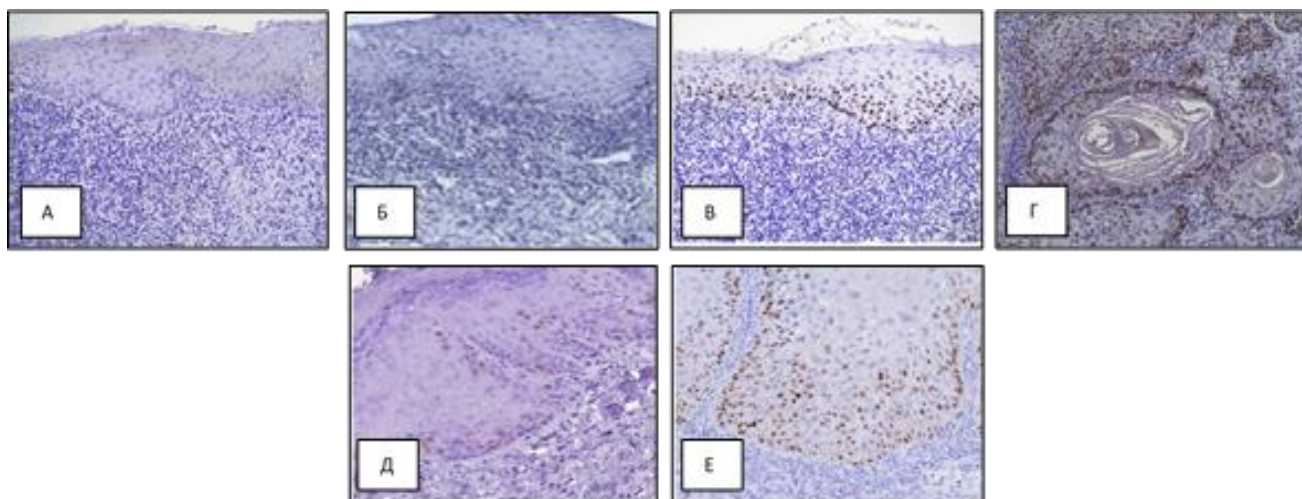


Рисунок 4 – А – ЭГ×100; Б – ЭДНС×100; С – ЭДВС×100; D – ПР×200; Е – ВГ×200; F – ВК×200, ИГХ реакция с антителами к белку P53 (клон Y-5). Окр. ДАБ-гематоксилином Майера

Таким образом, если умеренная экспрессия клона DO-7 на ранних стадиях может отражать физиологический стресс-ответ, то появление экспрессии клона Y-5 является маркером необратимых генетических поломок и формирования клеток с высоким злокачественным потенциалом. Этот вывод подтверждает данные о том, что выявление экспрессии клона Y-5 белка P53 является неблагоприятным прогностическим признаком при ранней диагностике ПР СОПР.

Активация TERT рассматривалась как фактор, способствующий бесконечному делению клеток и их дальнейшему злокачественному росту (Рисунок 5).

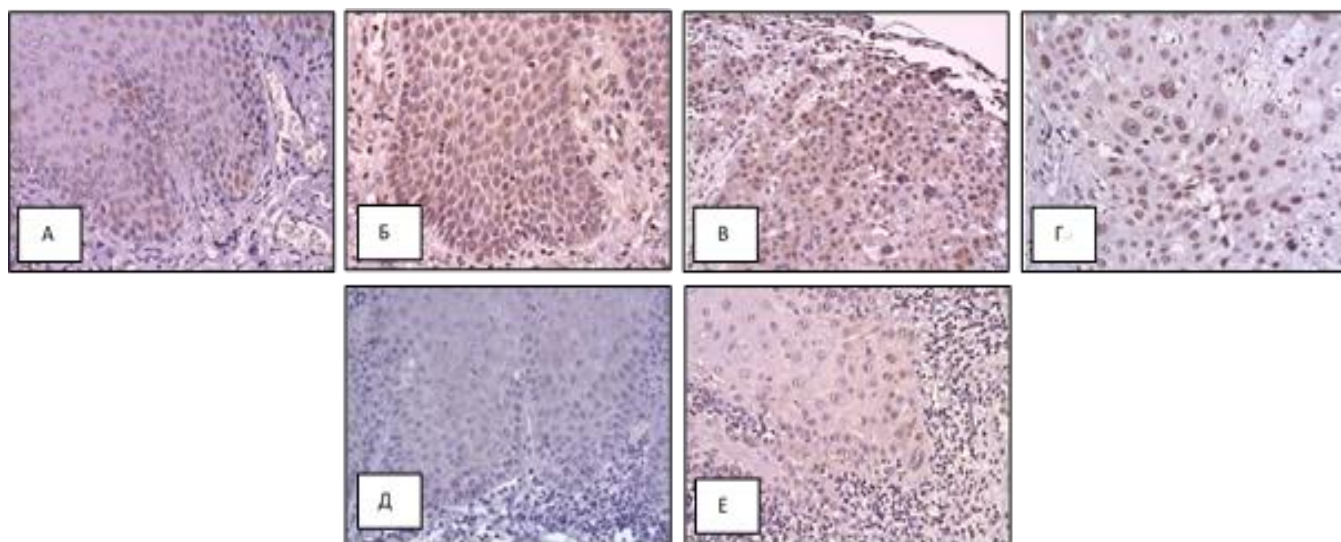


Рисунок 5. А – ЭГ×200; Б – ЭДНС×200; В – ЭДВС×200; Г – ПР×400; Д – ВГ×200; Е – ВК×200, ИГХ реакция с антителами к TERT. Окр. ДАБ-гематоксилином Майера

Для статистического исследования диагностики были распределены по группам: в 1-ю группу включили ЭГ, ЭДНС, ЭДВС и ПР; во 2-ю группу – ВГ и ВК. Были получены данные о последовательном и статистически значимом росте при ЭГ, ЭДНС, ЭДВС и ПР, а также ВГ и ВК индекса пролиферации по Ki-67, экспрессии маркеров апоптоза белка P53 по клонам DO-7 и Y-5 и TERT (Таблица 1) результат распределения экспрессии маркеров (Рисунок 6).

Таблица 1 – Результаты анализа экспрессии маркеров Ki-67, P53 клон DO-7 и клон Y-5, TERT по диагнозам ЭГ, ЭДНС, ЭДВС, ПР при $p < 0,01$.

Маркер	Диагнозы	F	Особенности экспрессии	Статистические различия
Ki-67	ЭГ, ЭДНС, ЭДВС, ПР	1892,03	Увеличение от ЭГ к ПР	Статистически значимые различия между всеми парами
Клон DO-7	ЭГ, ЭДНС, ЭДВС, ПР	674,38	Увеличение от ЭГ к ПР; минимальная или отсутствует при ЭГ и ЭДНС	
Клон Y-5	ЭГ, ЭДНС, ЭДВС, ПР	1528,35	Минимальная или отсутствующая при ЭГ и ЭДНС; резко возрастает при ЭДВС и ПР	Увеличение с ЭДВС к ПР
TERT	ЭГ, ЭДНС, ЭДВС, ПР	1778,11	Наращивание от ЭГ к ПР	Увеличение уровней экспрессии

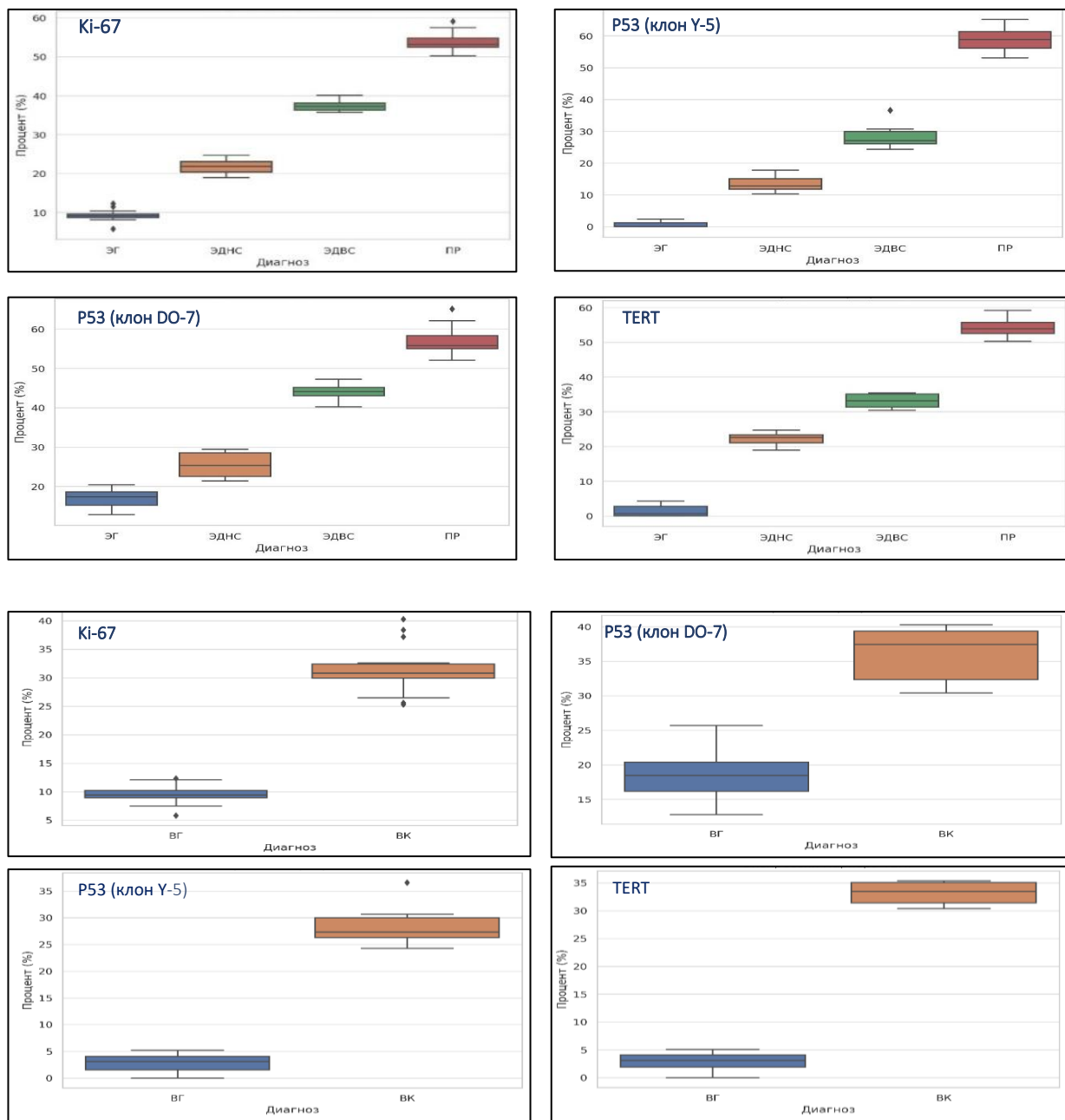


Рисунок 6 – Распределение экспрессии маркеров по диагнозам ЭГ, ЭДНС, ЭДВС, ПР, ВГ и ВК

Накопление генетических ошибок, которое возможно после увеличенной пролиферации генетически измененных клеток и активации теломеразы, вследствие инактивации P53, приводит к геномной нестабильности клеток.

Также было проведено исследование накопления геномной нестабильности, в частности амплификации гена *TERC*, что свидетельствует о нарушениях в структуре и функции генома, способствующих прогрессии опухоли. В данной работе этот процесс оценивался с помощью FISH-анализа гена *TERC*, который локализуется в локусе 3q26. Амплификация гена *TERC* является

относительно ранним событием и может быть зафиксирована уже при ЭДНС. При исследовании и сравнении амплификации гена *TERC* в исследуемых группах отмечается увеличение сигналов от ЭДВС к ПР. Это подтверждает данные о том, что амплификация плеча 3q является одним из пусковых механизмов в развитии ПР и детекция этого события может служить маркером высокого риска даже при минимальных морфологических изменениях. Важным результатом нашего исследования стало выявление разных механизмов этой нестабильности. Для классического пути развития ПР была характерна сильная корреляция между амплификацией *TERC* и анеуплоидией 3-й хромосомы (по зонду *CCP3*), что свидетельствует о преобладании анеуплоидии. В то же время, для ВК была характерна амплификация *TERC* при нормальном числе копий *CCP3*. Сочетанное увеличение числа копий *TERC* и *CCP3* характерно для классического пути развития ПР через анеуплоидию. Анеуплоидия по *CCP3* при наличии амплификации *TERC* является отличительным признаком ВК от ВГ, что может быть использовано для их дифференциальной диагностики, так как эти результаты указывают на фокальную амплификацию гена *TERC*, что может объяснять менее агрессивное течение ВК (Рисунок 7).

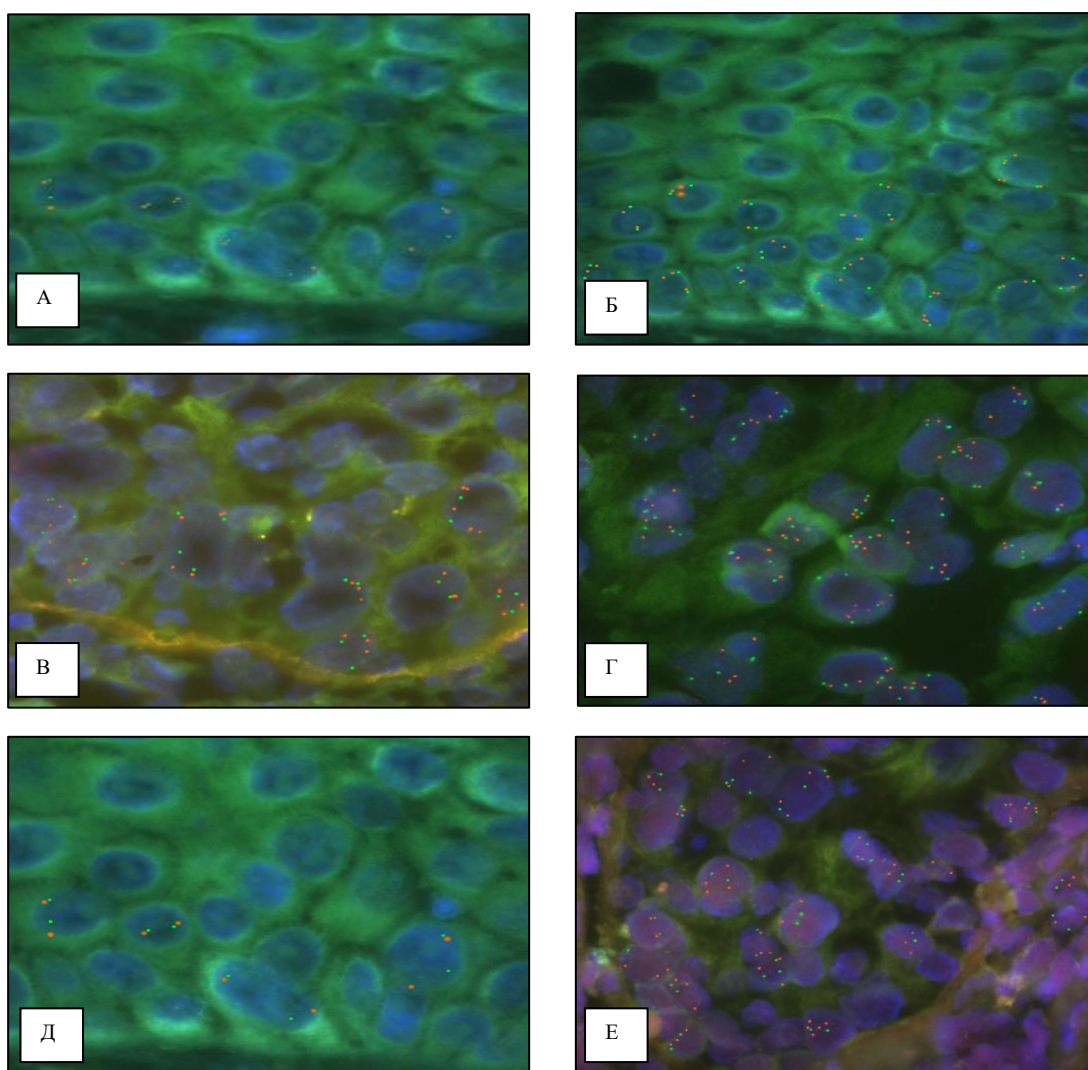


Рисунок 7 – А – ЭГ; Б – ЭДНС; В – ЭДВС; Г – ПР; Д – ВГ; Е – ВК,
FISH амплификация гена *TERC*×1000

Анализ частоты амплификации гена *TERC* выявил статистически значимые различия между нозологиями ЭГ, ЭДНС, ЭДВС, ПР, ВГ и ВК критерий Краскела-Уоллиса, $p < 0,05$). Наиболее низкие значения отмечены в группах ЭГ и ЭДНС, где амплификация *TERC* либо полностью отсутствовала, либо регистрировалась лишь в единичных случаях (Me 0,0%). При ЭДВС доля ядер с амплификацией *TERC* оставалась невысокой и находилась на уровне редких наблюдений, тогда как при ПР и ВК зафиксированы наиболее высокие показатели частоты амплификации *TERC* медианные значения: около 29% для ПР и 3% для ВК. Попарное сравнение диагнозов с использованием U-критерия Манна-Уитни показало статистически значимые различия $p < 0,05$ между большинством диагнозов, в частности между ЭГ и ЭДНС, ЭГ и ЭДВС, а также между ПР и ВК, что отражает резкое нарастание амплификации *TERC* в ходе перехода от доброкачественных и диспластических изменений к ПР. Исключением стало сравнение между ЭДВС и ВК, где различия оказались статистически незначимыми ($p = 0,2046$), что свидетельствует о сходном уровне амплификации *TERC* на стадии ЭДВС и ВК (Рисунок 8).

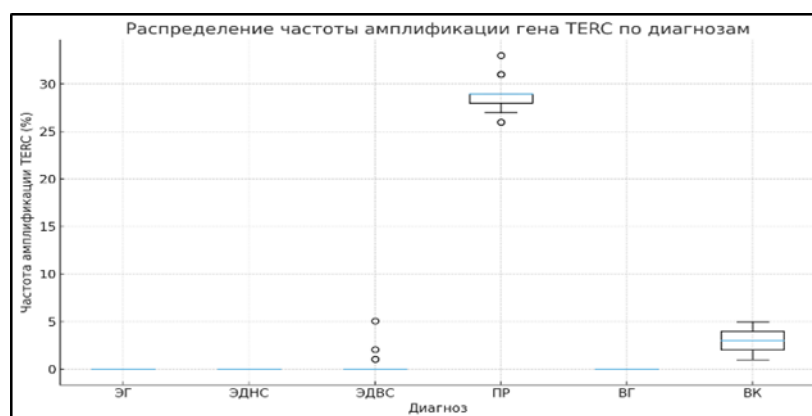


Рисунок 8 – Частота амплификации гена *TERC* по диагнозам

Таблица 2 – Количественное соотношение сигналов *TERC/CCP3* в процентах при различных диагнозах эпителия СОПР

Диагноз	Количество случаев	2:2	2:3	2:4	3:3	3:4	4:4	4:5
ЭГ	15	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ЭДНС	10	83,9	17,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ЭДВС	27	6,4	25,9	30,1	22,2	15,2	0,0	0,0
ПР	20	10,2	11,3	3,1	18,5	25,4	24,6	6,9
ВГ	10	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ВК	10	12,4	19,2	47,7	11,5	9,2	0,0	0,0

Как видно из представленных данных в таблице 2, при ЭГ и ВГ во всех наблюдениях регистрировался только диплоидный вариант соотношения сигналов 2:2, что свидетельствует об отсутствии выраженной геномной нестабильности при данных поражениях.

Распределение различных вариантов соотношения сигналов *TERC/CCP3*, полученное на основании результатов FISH-анализа, отражает совокупность цитогенетических нарушений, включая амплификацию гена *TERC* и изменения соотношения сигналов *TERC/CCP3* (Таблица 3).

Таблица 3 – Доля анеуплоидии по *CCP3* в структуре *TERC*-ассоциированных нарушений при различных диагнозах эпителия СОПР

Диагноз	<i>TERC</i> , %	<i>CCP3</i> , %	<i>CCP3/TERC</i> , %
ЭГ	0,0	0,0	—
ЭДНС	17,1	0,0	0,0
ЭДВС	93,6	37,4	39,9
ПР	89,8	75,4	83,9
ВГ	0,0	0,0	—
ВК	87,6	20,7	23,6

Следует отметить, что, несмотря на более высокий процент *TERC*-ассоциированных нарушений при ЭДВС по сравнению с ПР, при злокачественной трансформации происходит не столько увеличение их доли, сколько качественное усложнение геномной нестабильности, сопровождающееся значительным ростом вклада анеуплоидии по *CCP3*. При ЭДВС данный показатель составляет 39,9%, а при ПР – 83,9%, что отражает нарастание геномных нарушений в процессе малигнизации эпителия СОПР (Рисунок 9).

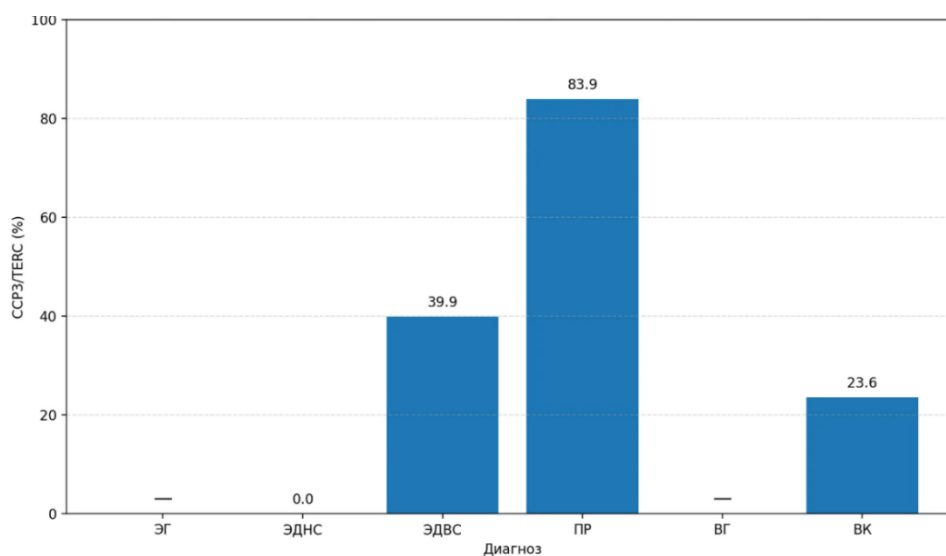


Рисунок 9 – Показатели *CCP3/TERC* (%) при различных диагнозах эпителия СОПР

Количественная оценка анеуплоидии по *CCP3* выявила статистически значимые различия между группами ($p < 0,001$). Минимальные значения доли ядер с *CCP3* > 2 отмечены при ЭГ и ВГ (Me 0,0%), промежуточные — при ЭДНС, ЭДВС и ВК, максимальные — при ПР (Me 51,5% [49,0; 52,0]). Это отражает нарастание геномной нестабильности по мере злокачественной трансформации. Попарный анализ не выявил различий между ЭГ и ВГ ($p > 0,05$); между большинством остальных групп различия были значимыми ($p < 0,05$), а между ЭДВС и ВК — пограничными ($p \approx 0,07$)

Взаимосвязь между амплификацией *TERC* и *CCP3*

Для оценки связи между амплификацией гена *TERC* и анеуплоидия *CCP3* был рассчитан коэффициент ранговой корреляции Спирмена на основании средних значений частоты амплификации по исследуемым диагнозам ЭГ, ЭДНС, ЭДВС, ПР, ВГ, ВК. Получено значение $r = 1,0$ при $p = 0,01$, что свидетельствует о наличии выраженной положительной корреляции между *TERC* и *CCP3*. Иными словами, по мере увеличения частоты анеуплоидии *CCP3* при ЭГ/ВГ к ЭДВС, ВК и ПР параллельно возрастает и частота амплификации *TERC*, что отражает согласованное вовлечение локуса *TERC* и хромосомы 3 в процесс опухолевой трансформации эпителия СОПР (Рисунок 10).

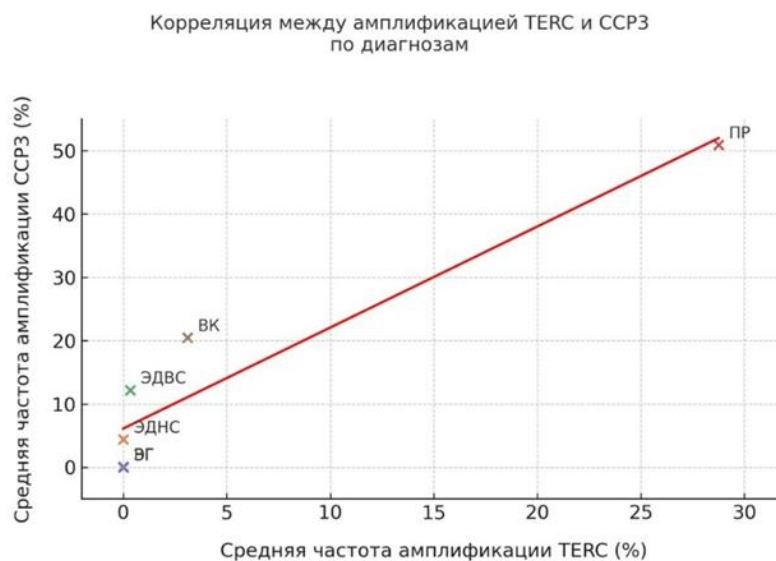


Рисунок 10 – Корреляционный график между средней амплификацией *TERC* и *CCP3* по диагнозам

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Экспрессия маркера пролиферации Ki-67 и белка теломеразной обратной транскриптазы TERT увеличивается от ЭГ к ПР ($p < 0,01$). Отмечается достоверная корреляция экспрессии белка Ki-67 и TERT при ЭГ, ЭД и ПР СОПР.

2. При сравнительной оценке экспрессии различных клонов белка P53, иммуноположительные клетки по клону DO-7 определяются на всех этапах малигнизации от ЭГ к ПР. Экспрессия белка P53 (клон Y-5) выявляется при ЭДВС и ПР, что позволяет использовать данный клон как маркер ранней малигнизации эпителия СОПР.

3. Частота аномальной амплификации гена *TERC* по зонду (LSP *TERC*) увеличивается от ЭДНС к ПР ($p < 0,05$), а по зонду, который отвечает за количество хромосомы (*CCP3*), увеличивается только при ПР ($p < 0,05$), что свидетельствует о появлении анеуплоидии и является достоверным маркером для диагностики малигнизации эпителия.

4. Экспрессия белков Ki-67, TERT и P53 (клон DO-7) демонстрирует увеличение количества иммуноположительных ядер от ВГ к ВК ($p < 0,01$). Экспрессия белков P53 (клон Y-5), TERT и амплификация гена *TERC* появляется только при ВК ($p < 0,05$), по данному критерию, ВК сопоставима с ЭДВС.

5. Для ранней диагностики малигнизации эпителия СОПР на этапе ЭДВС и ВК, оптимальной панелью маркеров является: Ki-67, P53 (клон Y-5), TERT и амплификация гена *TERC* методом FISH.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

На основании результатов, полученных в ходе диссертационного исследования, для повышения точности диагностики и стратификации риска малигнизации эпителия СОПР в клиническую практику врача-патологоанатома предлагаются следующие рекомендации:

1. В сложных диагностических случаях, при наличии ЭД или при трудностях в дифференциальной диагностике между реактивными изменениями и истинной неоплазией, рекомендуется использовать стандартное гистологическое и ИГХ исследование с применением панели маркеров: Ki-67, P53 (клон Y-5) и TERT.

2. Выявление экспрессии клона Y-5 белка P53 в клетках эпителия СОПР следует расценивать как молекулярный признак высокого риска злокачественной трансформации, что подтверждает такие диагнозы как: ЭДВС, ВК и ПР.

3. Обнаружение амплификации *TERC* при ЭДНС указывает на повышенный риск дальнейшей прогрессии и требует более активного динамического наблюдения.

4. Амплификация гена *TERC* является ключевой для дифференциальной диагностики веррукозных поражений, так как амплификация *TERC* характерна для ВК. Обнаружение только (оранжевого сигнала) без анеуплоидии по зонду *CCP3* (зелёный сигнал) является дифференциальной диагностикой между ВГ и ВК.

5. При диагностике ЭДВС и ВК рекомендована панель из следующих маркеров: Ki-67, P53 (клон Y-5), TERT и амплификация гена *TERC*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Особенности молекулярно-генетической диагностики веррукозной лейкоплакии / А. А. Ивина, Ю. О. Тигай, О. Ф. Рабинович, И. М., Рабинович И. И. Бабиченко. – DOI 10.17116/stomat20231020416 // Стоматология. – 2023. – № 4 (102). – С.6–10. **(Scopus)**
2. Молекулярно-генетические критерии малигнизации эпителия слизистой оболочки рта / А. А. Ивина, Ю. О. Тигай, О. Ф. Рабинович, В. А. Горячев, Д. Р. Фамилья Фриас, И.И. Бабиченко. – DOI 10.31088/CEM2023.12.4.23-31 // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2023. – № 12. – С. 423–431. **(Scopus)**
3. Изучение продукции белков Ki67 и p53 при развитии веррукозной карциномы / Ю. О. Тигай, А. А. Ивина, И. И. Бабиченко, О. Ф. Рабинович, И. М. Рабинович, Д. Р. Фамилья Фриас. – DOI 10.31088/CEM2025.14.3.42-48 // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2025. – № 3 (14). – С. 42–48. **(Scopus)**
4. Immunohistochemical study of P53 protein expression in the development of squamous cell carcinoma of the oral mucosa // A. A. Ivina, Yu. O. Tigay, D. R. Familia Frias, O. F. Rabinovich, I. I. Babichenko // Rudn journal of medicine. – 2025. – № 4(29). **(Scopus)**
5. Тигай, Ю. О. Особенности молекулярно-генетической диагностики веррукозной лейкоплакии / Ю. О. Тигай / X ежегодная международная научно-практическая конференция «Актуальные вопросы медицины» и «IV спутниковый форум по общественному здоровью и политике здравоохранения». – 2023. – С. 49–50. **(Конференция)**
6. Тигай, Ю. О. Использование белков Ki-67 и P53 в ранней диагностике плоскоклеточного рака полости рта / Ю. О. Тигай // XI ежегодная международная научно-практическая конференция «Актуальные вопросы медицины» и «V спутниковый форум по общественному здоровью и политике здравоохранения». – 2024. – С. 72–73. **(Конференция)**
7. Тигай Ю.О. Изучение экспрессии p53 при развитии плоскоклеточного рака слизистой оболочки полости рта / Ю.О. Тигай, Фамилья Фриас Д.Р. // 78-я Международная научно-практическая конференция «Достижения фундаментальной, прикладной медицины и фармации». – 2024. – С.337. **(Конференция)**
8. Тигай, Ю. О. Изучение экспрессии p53 при развитии веррукозной карциномы слизистой оболочки полости рта / Ю. О. Тигай // XX Международная (XXIX Всероссийская) Пироговская научная медицинская конференция студентов и молодых учёных. – 2025. С. 143. **(Конференция)**

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВГ – веррукозная гиперплазия

ВК – веррукозная карцинома

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ИГХ – иммуногистохимия

КПЛ – красный плоский лишай

ПР – плоскоклеточный рак

СОПР – слизистая оболочка полости рта

ЭГ – эпителиальная гиперплазия

ЭД – эпителиальная дисплазия

ЭДВС – эпителиальная дисплазия высокой степени

ЭДНС – эпителиальная дисплазия низкой степени

ЭДСС – эпителиальная дисплазия средней степени

ССР3 – центромерный контрольный зонд 3

FISH – fluorescence *in situ* hybridization (флюоресцентная гибридизация *in situ*)

Ki-67 – ядерный белок пролиферации

P53 – ядерный белок P53

TERC – telomerase RNA component (теломеразный РНК компонент)

TERT - telomerase reverse transcriptase (теломеразная обратная транскриптаза)

Тигай Ю. О.

**«Молекулярно-генетические исследования малигнизации
эпителия слизистой оболочки полости рта»**

Диссертационное исследование посвящено выявлению молекулярно-генетических особенностей малигнизации эпителия СОПР. Получены данные, расширяющие представления о молекулярных механизмах данного многоступенчатого процесса. Установлена диагностическая значимость экспрессии Ki-67, P53 (клоны DO-7 и Y-5), TERT и амплификации гена *TERC* при развитии неоплазии СОПР. Проведён сравнительный анализ иммуногистохимических и молекулярно-генетических характеристик ЭГ, ЭД разной степени и ПР СОПР. Показана высокая информативность амплификации гена *TERC* в диагностике ранних стадий малигнизации, а также диагностическая ценность клона Y-5 белка P53 при верификации ВК и ПР. На основании результатов исследования установлено, что ВК следует рассматривать как ЭДВС. Для практического здравоохранения разработан научно обоснованный алгоритм ранней диагностики малигнизации эпителия СОПР, направленный на повышение точности дифференциальной диагностики предраковых и злокачественных поражений, включая отличие ВГ и ВК.

Tigay Yu. O.

**“Molecular-genetic studies of malignant transformation
of the oral mucosal epithelium”**

The dissertation study is aimed at identifying the molecular and genetic features of malignant transformation of the oral mucosal epithelium. The findings expand current understanding of the molecular mechanisms involved in this multistep process. The diagnostic significance of the expression of Ki-67, P53 (clones DO-7 and Y-5), TERT, and amplification of the *TERC* gene in the development of oral epithelial neoplasia has been established. A comparative analysis of the immunohistochemical and molecular-genetic characteristics of EH, ED of different degrees, and OSCC was performed. The high informativeness of *TERC* gene amplification in the diagnosis of early stages of malignant transformation, as well as the diagnostic value of the Y-5 clone of the P53 protein in the verification of VC and OSCC, was demonstrated. Based on these results, it has been established that VC should be considered as HGED. For practical healthcare, a scientifically substantiated algorithm for the early diagnosis of malignant transformation of the oral mucosal epithelium has been developed, aimed at increasing the accuracy of the differential diagnosis of precancerous and malignant lesions, including the distinction between VH and VC.