

ЦИТОЛОГИЯ

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Пурсанова А.Е.¹, Казарина Л.Н.², Круглова И.А.³, Зиновьев С.В.⁴, Уткин О.В.⁵, Филатова Е.Н.⁵

ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ПРЕДРАКОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ И РАКА СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ РТА

¹ ФБГОУ ВО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева», 430005, г. Саранск, Республика Мордовия, Россия;

² ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет», 603005, г. Нижний Новгород, Россия;

³ ГБУЗ НО «Городская больница № 35», 603089, г. Нижний Новгород, Россия;

⁴ ГБУЗ НО «Нижегородский областной клинический онкологический диспансер», 603126, г. Нижний Новгород, Россия;

⁵ ФБУН Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, 603950, г. Нижний Новгород, Россия

Цель исследования: совершенствование диагностики предраковых заболеваний и рака слизистой оболочки рта (СОР) с применением флуоресцентного иммуноцитохимического исследования методом прямой иммунофлуоресценции. Проведено клинико-лабораторное обследование 111 пациентов: 46 больных с плоскоклеточным раком слизистой оболочки полости рта, 35 человек с предраковыми заболеваниями: лейкоплакия (n=17), красный плоский лишай (n=18) и 30 здоровых человек. Всем пациентам проведено традиционное цитологическое исследование и дополнительное иммуноцитохимическое исследование методом прямой иммунофлуоресценции, определены уровни экспрессии опухолевых маркеров P53, P16 и Ki67. Данные сопоставлены с результатами гистологического анализа.

В результате исследования выявлено, что у пациентов с раком СОР экспрессия онкомаркера P53 была в 4 раза выше, чем у пациентов с предраковой патологией. В 6,52% случаев обнаружена коэкспрессия маркеров Ki67 и P16.

Таким образом, преимуществами флуоресцентной иммуноцитохимической диагностики является отсутствие инвазивного травматичного забора биоматериала, сокращение сроков получения результата, высокая чувствительность, возможность дистанционной оценки результатов. Это повышает доступность метода и возможность использования данной методики для скринингового исследования населения.

Ключевые слова: предраковые заболевания; плоскоклеточный рак слизистой оболочки рта; диагностика; флуоресцентная иммуноцитохимия; онкомаркеры.

Для цитирования: Пурсанова А.Е., Казарина Л.Н., Круглова И.А., Зиновьев С.В., Уткин О.В., Филатова Е.Н. Флуоресцентная иммуноцитохимическая диагностика предраковых заболеваний и рака слизистой оболочки рта. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (4): 219-226. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-4-219-226>

Для корреспонденции: Пурсанова Анастасия Евгеньевна, канд. мед. наук, зав. каф.; e-mail: pursanova@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Финансирование. Авторы выражают благодарность за финансовую помощь в виде гранта от фонда «Сколково» (Россия).

Поступила 10.01.2022

Принята к печати 25.01.2022

Опубликовано 17.04.2022

Pursanova A.E.¹, Kazarina L.N.², Kruglova I.A.³, Zinovev S.V.⁴, Utkin O.V.⁵, Filatova E.N.⁵

THE FLUORESCENT IMMUNOCYTOCHEMICAL DIAGNOSTICS OF PRECANCEROUS DISEASES AND CANCER OF THE ORAL MUCOSA

¹ Federal state budgetary educational institution of higher professional education "N. P. Ogarev Mordovian State University", 430005, Saransk, Republic of Mordovia, Russia;

² Federal state budgetary educational institution of higher professional education "Privolzhskiy Research Medical University" of the Ministry of Health of the Russian Federatsii, 603005, Nizhny Novgorod, Russia;

³ State budgetary institution of health care "City hospital No. 35", 603089, Nizhny Novgorod, Russia;

⁴ State budgetary institution of health care "Nizhny Novgorod Regional Clinical Oncological Dispensary", 603126, Nizhny Novgorod, Russia;

⁵ Federal budgetary institution of science "Nizhny Novgorod research Institute of epidemiology and microbiology. academician I. N. Blokhina Rospotrebnadzor", 603950, Nizhny Novgorod, Russia

Purpose of the study improving the diagnosis of precancerous diseases and cancer of the oral mucosa using fluorescent immunocytochemical studies by direct immunofluorescence. A clinical laboratory examination of 111 patients was carried out: 46 patients with squamous cell carcinoma of the oral mucosa, 35 people with precancerous lesions (17 leukoplakia, 18 – oral lichen planus) and 30 healthy people. All patients underwent a traditional cytological examination and an additional immunocytochemical examination by direct immunofluorescence, the expression levels of tumor markers P53, P16 and Ki67 were determined. The data were compared with the results of histological analysis. As a result of the study, it was revealed that in patients with cancer, the expression of oncomarker P53 was four times higher than in patients with precancerous pathology. In 6.52% of cases, co-expression of markers Ki67 and P16 was found.

Thus, the advantages of fluorescent immunocytochemical diagnostics were the absence of invasive traumatic intake of the biomaterial in the patient, reduction in the timing of obtaining the result, high sensitivity, and the possibility of remote evaluation of the results. Therefore, that increases the accessibility of the method, and the possibility of using this method for a screening study of population.

Key words: *precancerous diseases; oral mucosal squamous cell carcinoma; diagnosis; fluorescent immunocytochemistry; oncomarkers.*

For citation: Pursanova A.E., Kazarina L.N., Kruglova I.A., Zinoviev S.V., Utkin O.V., Filatova E.N. Fluorescent immunocytochemical diagnostics of precancerous diseases and cancer of the oral mucosa. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (4): 219-226 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869/2084-2022-67-4-219-226>

For correspondence: Pursanova Anastasia Evgenievna, Candidate of Sciences, Head of department; e-mail: pursanova@mail.ru

Information about authors:

Pursanova A.E. <http://orcid.org/0000-0002-4137-2834>;
Kazarina L.N. <http://orcid.org/0000-0001-5033-7945>;
Kruglova I.A. <http://orcid.org/0000-0001-7955-349X>;
Zinoviev S.V. <http://orcid.org/0000-0003-1037-2601>;
Utkin O.V. <http://orcid.org/0000-0002-7571-525X>;
Filatova E.N. <http://orcid.org/0000-0002-6683-7191>.

Conflict of interests. *The authors declare the absence of conflict of interests.*

Acknowledgment. *The authors express their gratitude for the financial assistance in the form of a grant from the Skolkovo Foundatio.*

Received 10.01.2022

Accepted 25.01.2022

Published 17.04.2022

Введение. По данным последних эпидемиологических исследований особую актуальность приобретает проблема своевременной диагностики рака слизистой оболочки рта (СОР), ее дифференциальной диагностики с предраковыми заболеваниями. Эта проблема носит как медицинский, так и социально-экономический характер и требует конкретных путей решения [1-5].

В 2012 г. Россия оказалась по абсолютным цифрам на 5-м месте в мире по абсолютному числу случаев смертности от рака слизистой оболочки рта и красной каймы губ (ККГ) [6]. В 2020 г. в Европе рак органов и тканевой полости рта диагностирован у 65 279 человек, умерло от этой патологии 24 575 человек. В Европе наиболее высокий риск заболевания этой патологией у жителей центральной и восточной ее части. В свою очередь, в Западной Европе с начала 90-х годов XX века также отмечается рост случаев рака СОР, что может быть связано с активной миграцией в эту часть мира жителей Южной и Юго-Восточной Азии [7-12].

В России заболеваемость раком СОР составила 6,63 на 100 000 населения, заболеваемость раком ККГ – 1,53 на 100 000. В течение последнего десятилетия наблюдается стабильная тенденция к снижению заболеваемости раком ККГ (на 40%) и, напротив, к росту случаев рака СОР (на 36%). В нашей стране рак СОР и ККГ поражает мужчин в 3 раза чаще, чем женщин, при этом за последние 10 лет отмечается значительный удельный рост показателя смертности от злокачественных опухолей губы, полости рта и глотки среди женщин почти на 20%. Общая смертность от данных злокачественных образований составила в 2018 г. 6,84%, а прирост за 10 лет – 11,5%. При раке ККГ летальность в первый год после установки диагноза составила лишь 4,3%, в то время как при раке СОР – 32,4%. При этом отмечается ежегодный прирост смертности у пациентов, страдающих раком СОР во многих регионах России. Установлено, что «грубый» и стандартизованный показатели смертности от злокачественных новообразований челюстно-лицевой области по Приволжскому Федеральному округу

несколько выше российских, и составляют 9,10 и 5,62 на 100 000 населения. Частота диагностики новообразований визуальных локализаций на поздних стадиях (III-IV) составляет 62,4-69,0% опухолей полости рта [13-18].

В этой связи становится очевидной актуальность внедрения в широкую стоматологическую практику современных неинвазивных и доступных методов диагностики новообразований СОР, что позволит избежать использования инвазивных методов исследования, уменьшить риск развития запущенных стадий рака и снизить смертность [7,16-18].

Цитологический метод исследования в настоящее время широко применяется в диагностике опухолевых и предопухолевых заболеваний различных локализаций. В стоматологии наиболее распространено морфологическое исследование эпителия СОР с целью выявления нарушений в дифференцировке эпителиальных клеток на фоне различных патологических процессов. Однако, при использовании только рутинного цитологического исследования, возникают трудности в диагностике предопухолевой патологии, чаще всего связанные с одновременным возникновением в клетках дегенеративных изменений и атипических признаков. Учитывая тот факт, что диапазон чувствительности данного способа составляет от 64% до 96% и он используется, прежде всего, в первичной диагностике, а его результаты во многом определяют дальнейшую лечебную тактику, возникает необходимость применения новых уточняющих методов [20-26].

В последние годы появились сведения об использовании молекулярных иммуноцитохимических исследований (ИЦХИ) в диагностике предопухолевых заболеваний и опухолей различной локализации, в том числе шейки матки, молочной железы, легкого, мочевого пузыря. Одной из разновидностей ИЦХИ является прямое флуоресцентное иммуноцитохимическое исследование (ФИЦХИ). Данная технология позволяет локализовать и идентифицировать клеточные и тканевые антигены, основываясь на их связывании с флуоресцентно мечеными антителами, а также визуализировать распреде-

ление «мишени» в исследуемом материале. Меченые флуорохромами антитела взаимодействуют с антигеном и визуализируются в виде яркого свечения практически мгновенно, что позволяет использовать методику в качестве инструмента экспресс-диагностики. Кроме того, данный метод позволяет обнаруживать немногочисленные опухолевые клетки и их скопления, не выявляемые с помощью традиционного цитологического исследования, а также снизить частоту гипо- и гипердиагностики опухолевого процесса. Имеющиеся данные об эффективности применения данной технологии в других областях медицины послужили основанием для оценки возможности ее использования в стоматологии [19-22].

Цель исследования – совершенствование диагностики предраковых заболеваний и рака слизистой оболочки рта с применением флуоресцентного иммуноцитохимического исследования методом прямой иммунофлуоресценции.

Материал и методы. На базе кафедры пропедевтической стоматологии Института стоматологии ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава и ГБУЗ НО «Нижегородский областной онкологический диспансер» обследованы 111 человек в возрасте от 29 до 69 лет. Согласно нозологическим формам все исследуемые были разделены на три группы: в 1-ю группу вошли 46 больных с плоскоклеточным раком СОР, во 2-ю – 35 пациентов с предраковой патологией (17 человек с диагнозом «лейкоплакия СОР», 18 – с диагнозом «красный плоский лишай СОР»), 3-ю контрольную группу составили 30 человек без патологии СОР. Группы были стандартизированы по возрасту и полу участников. Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией (Хельсинки, Финляндия, 1964 г.), пересмотренной в Эдинбурге (Шотландия) в 2000 г., одобрено Этическим комитетом ПИМУ. От каждого пациента получено информированное согласие.

Забор материала для цитологического исследования осуществляли путем соскоба на предметное стекло. Для дополнительной ФИЦХ-диагностики пациенты самостоятельно проводили смыв с ротовой полости. Окраску цитологических препаратов выполняли методом Романовского, визуализацию осуществляли с применением микроскопа «Zeiss Primo Star» (Carl Zeiss, Германия), используемые увеличения $\times 100-1000$. При традиционном цитологическом исследовании оценивали клеточный состав препарата с оформлением морфологического заключения, а также рассчитывали индекс кератинизации (ИК) согласно формуле:

$$\text{ИК} = \left(\frac{\text{число ороговевших клеток}}{\text{общее число клеток}} \right) \times 100\%$$

Для оценки уровней экспрессии белков P53, P16 и Ki67 выполнено ИЦХИ методом прямой иммунофлуоресценции с использованием первично меченых флуоресцентных антител к P53-Cy5 (мышинные, моноклональные, клон Pab240), P16-AlexaFluor488 (кроличьи, моноклональные, клон EP1551Y), Ki67-Cy3 (мышинные, моноклональные, клон EPR3610) («Abcam», Великобритания). Для подтверждения отсутствия неспецифического связывания применяемых антител с целевыми белками использованы изотипические контроли к P53 (мышинные, моноклональные, меченые Cy5, IgG2a, клон MG2a-53), к P16 (кроличьи, моноклональные, меченые AlexaFluor488, IgG, клон EPR25A), к Ki67 (мышинные, моноклональные, меченые Cy3, IgG1, клон CT6) («Abcam», Великобритания).

В исследовании использовали нефиксированный материал, полученный путем смыва с ротовой полости.

Время инкубации с антителами составляло 15-30 мин в темноте. Визуализация флуоресценции проводилась с помощью микроскопа «Leica DM1000» (Leica, Германия), используемое увеличение $\times 200$. Анализ полученных изображений проводили с помощью программы AxioVision Rel.4.8 (Carl Zeiss, Германия), в ходе которого было определено количество клеток с положительной экспрессией исследуемых антигенов, т.е. наличием в клетке интенсивного свечения ядра в диапазоне эмиссии выбранных флуорофоров. Замеры интенсивности свечения выполнены в программе AxioVision Rel.4.8 (Carl Zeiss, Германия), при этом значимым считалось свечение ядра, превышающее таковое у цитоплазмы исследуемой клетки в 3 и более раза. В каждом препарате просматривали не менее 10 полей зрения. Полученный результат представлен в процентах в расчете на 100 клеток.

Также в исследовании использовали результаты гистологического анализа, выполненного в процессе планового лечения пациентов с онкологическими и предраковыми заболеваниями СОР. Материал от пациентов контрольной группы, характеризующейся отсутствием признаков стоматологической патологии, был получен путем самостоятельного смыва с ротовой полости и использовался для проведения традиционного цитологического анализа на стекле с последующей оценкой экспрессии белков P16, P53, Ki67. В контрольной группе гистологическое исследование не проводили в связи с отсутствием показаний для взятия биопсии.

Статистическую обработку результатов проводили в свободно распространяемой программной среде «R» версии 4.0.0 (The R Foundation, Австрия). Поскольку изучаемые параметры характеризовались распределением, отличным от нормального, сравнение экспрессии белков P16, P53 и Ki67 в исследуемых группах проводили с применением Н-критерия Краскела-Уоллиса и апостериорного анализа методом рангового критерия Манна-Уитни с поправкой Бенджамини-Хохберга. Различия между исследуемыми группами считали статистически значимыми при значении $p < 0,05$.

Для оценки возможности применения ФИЦХИ в целях улучшения дифференциальной диагностики злокачественных новообразований СОР и предраковых состояний применяли метод анализа ROC-кривых. Строили ROC-кривые вероятности выявления злокачественного новообразования СОР методами гистологического исследования, классического цитологического исследования и цитологического исследования, комбинированного с ФИЦХИ. Данные контрольной группы в анализе не использовали. В качестве истинного результата считали диагноз пациентов. Для гистологического и классического цитологического исследования ROC-кривые строили на основании заключения гистолога/цитолога по всей совокупности данных. Для построения ROC-кривой в отношении метода цитологического исследования с ФИЦХИ строили модель логистической регрессии, используя в качестве независимых переменных значения экспрессии белков P16, P53 и Ki67 и результат классического цитологического исследования. При этом проводили процедуру кросс-валидации (50 раз), случайным образом разделяя массив данных на обучающую и тестовую выборки в соотношении 2:1. Для оценки качества моделей использовали коэффициент детерминации МакФаддена. Далее, для каждой из 50 полученных логит-моделей строили ROC-кривую и рассчитывали значение площади под ней (AUC). Усредненную ROC-

кривую и среднее значение AUC использовали для оценки диагностической значимости метода.

Результаты и обсуждение. На первом этапе исследования, представляющего собой гистологический и классический цитологический анализы, были получены следующие результаты. У пациентов со злокачественными новообразованиями СОР гистологическое исследование позволило установить наличие онкологического заболевания в 93,5% (43 пациента из 46) случаев. Три образца были ошибочно отнесены к предраковой патологии, вероятно, вследствие неадекватного забора

биоматериала. Применение классической цитологии позволило в 54,3% (у 25 пациентов из 46) установить признаки злокачественного новообразования СОР, в то время как в 45,7% (у 21 пациента из 46) ошибочно установлена предраковая патология. При этом, в микроскопической картине препаратов, классифицированных как онкопатология, преобладали раздельно лежащие клетки многослойного плоского эпителия с клеточной и ядерной атипией, а также наличием в цитоплазме признаков патологического ороговения (рис.1, а). Рассчитанный ИК составил $68,17 \pm 18,96\%$.

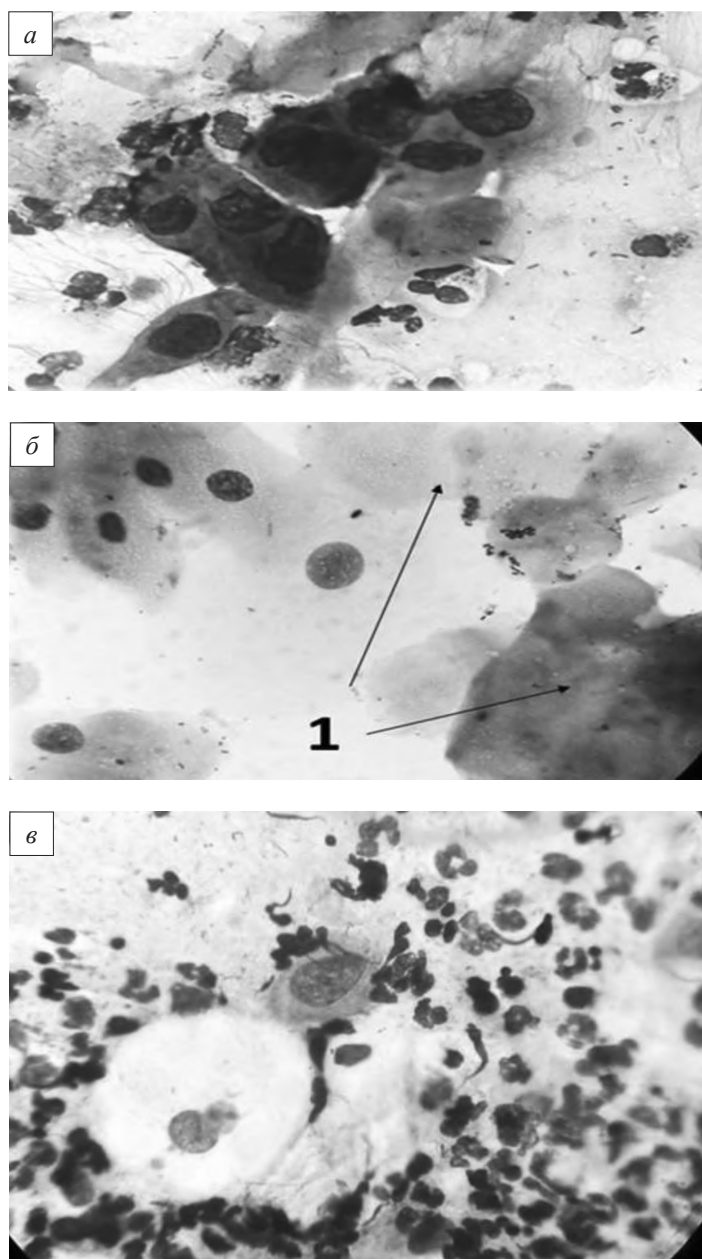


Рис.1. Мазок-отпечаток со слизистой оболочки рта.

а – в цитологическом препарате наблюдалось умеренное количество нейтрофильных лейкоцитов, на фоне которых представлены клетки плоского эпителия с признаками атипии различной степени выраженности и патологическим ороговением. Цитологическая картина плоскоклеточной карциномы с ороговением; б – в большей части цитологического препарата наблюдались признаки гиперкератоза (1). Цитологическая картина гиперкератоза без атипии; в – в цитологическом препарате обнаружено умеренное количество нейтрофильных лейкоцитов, на фоне которых представлены клетки плоского эпителия с признаками дегенеративных изменений и паракератозом. Цитологическая картина воспалительных изменений. Окраска по Романовскому, ув. $\times 1000$.

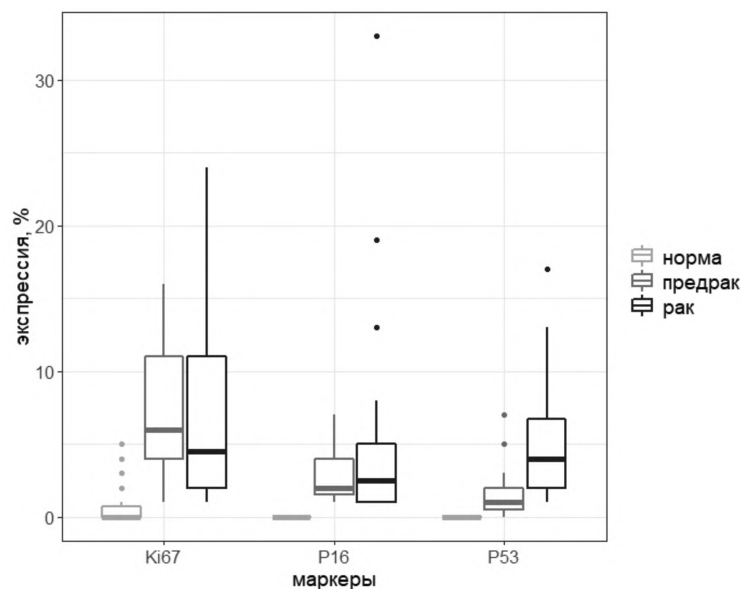


Рис. 2. Экспрессия белков Ki67, P16, P53 в исследуемых группах. * – статистически значимые отличия по сравнению с контрольной группой; ** – статистически значимые отличия по сравнению с группой пациентов с предраковыми заболеваниями СОР.

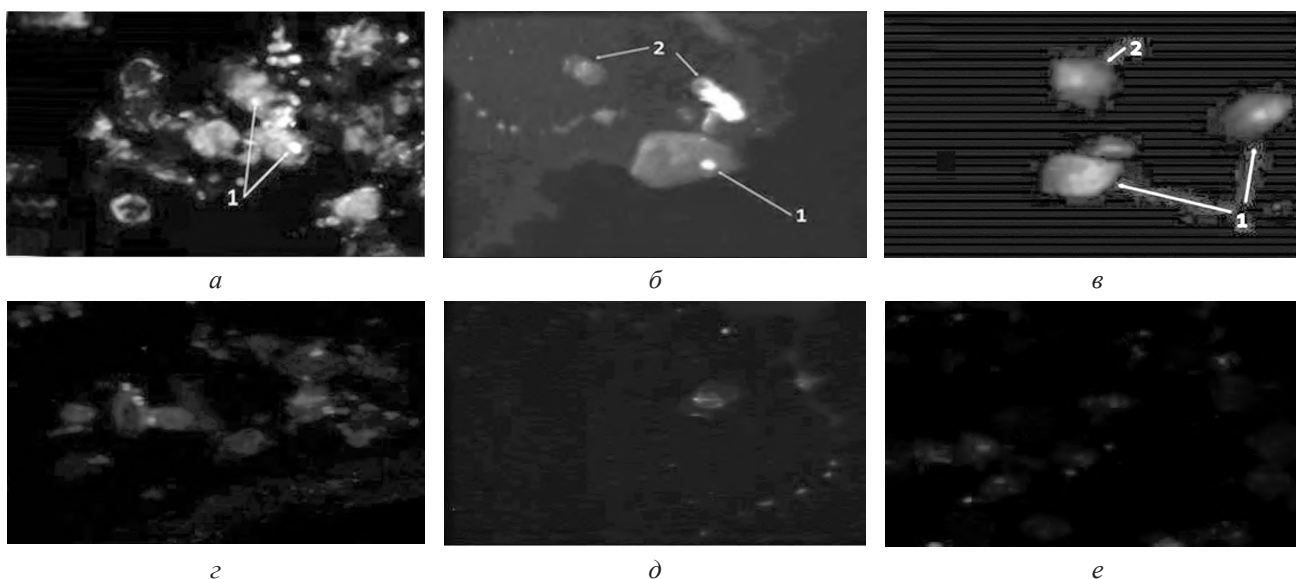


Рис. 3. Соскоб с новообразования слизистой оболочки щек.

a – положительная экспрессия Ki67 (1); *б* – положительная экспрессия P16 (1), отрицательная экспрессия P16 (2); *в* – положительная экспрессия P53 (1), отрицательная экспрессия P53 (2). Ув. x200; *г*, *д*, *е* – изотипический контроль на антитела к Ki67, P16 и P53, соответственно. Ув. x200.

У пациентов с клиническими диагнозами «лейкоплакия» и «красный плоский лишай» гистологическое исследование позволило идентифицировать предраковую патологию в 100% случаев (у 35 пациентов из 35). Только цитологическое исследование позволило установить диагноз «лейкоплакия» в 82,4% случаев (у 14 пациентов из 17). При этом в морфологической картине исследуемых цитологических препаратов отмечались обширные поля клеток плоского эпителия с признаками гиперкератоза, единичные эпителиальные клетки с явлениями паракератоза; фон препаратов был чистым (рис.1, б). У пациентов с красным плоским лишаем цитологически подтвердить диагноз удалось в 50,0% случаев (у 9 па-

циентов из 18). В препаратах таких пациентов, в основном, отмечались воспалительные элементы в различном процентном соотношении, а также единичные клетки или мелкие группы клеток многослойного плоского эпителия с признаками гиперкератоза и/или акантолиза (рис.1, в). Рассчитанный ИК для всей группы пациентов с предраковой патологией составил 51,66±16,24%.

Классическое цитологическое исследование материала пациентов контрольной группы не выявило отличительных особенностей от нормальной морфологической картины СОР. Рассчитанный ИК составил 41,95±7,72%.

При оценке соотношения ИК в группе больных к группе контроля наблюдалось повышение данного по-

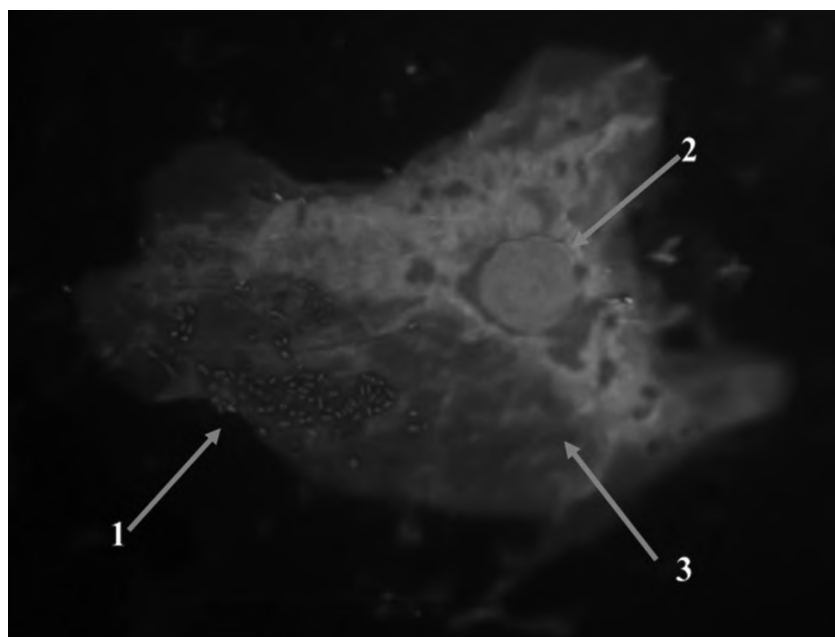


Рис. 4. Коэкспрессия P16 (2) и Ki67 (3) в одной клетке эпителия ротовой полости. Сопутствующая микрофлора ротовой полости (1). Ув. x200.

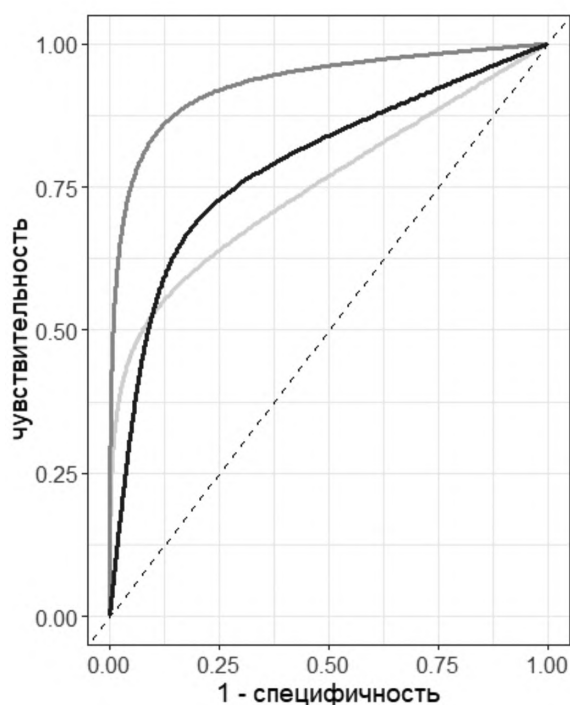


Рис. 5. ROC-анализ предиктивной силы методов дифференциальной диагностики злокачественных новообразований СОР и предраковой патологии.

казателя при переходе от контрольной группы к предраковым процессам и раку (ИК 1:1,23:1,62, соответственно). Рост значений ИК обусловлен увеличением числа клеток с признаками ороговения в цитоплазме.

В ходе проведения ФИЦХИ получены результаты, представленные на рис. 2 и 3. Показано, что экспрессия

всех трех маркеров повышалась в группах пациентов с раковой и предраковой патологией по сравнению с контролем (рис. 2). При этом в цитологических препаратах контрольной группы не выявлено клеток, экспрессирующих белки P16 и P53. Экспрессию белка Ki67 (рис. 3, а) в этой группе детектировали в 26,7% случаев (8 образцов из 30), при этом исследуемые образцы характеризовались наличием признаков воспаления. Обнаружено, что у пациентов со злокачественными новообразованиями СОР экспрессия P53 (рис. 3, в) в 4 раза превышала таковую у пациентов с предраковой патологией. Экспрессия белков Ki67 и P16 (рис.3, б) в группах с онкологической и предраковой патологиями статистически значимо не отличалась (см. рис. 2).

Постановка изотипических контролей продемонстрировала наличие низкого уровня фоновой флуоресценции, что свидетельствует об отсутствии неспецифического связывания используемых нами моноклональных антител с целевыми белками (см. рис.3, г-е).

Следует отметить, что в группе пациентов с раком СОР в 6,52% (3 образца из 46) детектировалась коэкспрессия белков Ki67 и P16 (рис. 4). Исходя из существующих данных по новообразованиям других локализаций [10], отмеченный факт коэкспрессии требует дальнейшего изучения для определения возможной клинической значимости в стоматологической практике.

В соответствии с задачами данного этапа работы проведен анализ эффективности дифференциальной диагностики злокачественных новообразований СОР и предраковых патологий СОР методом цитологического исследования в комбинации с ФИЦХИ. В этой связи построены 50 логит-моделей зависимости вероятности выявления онкологического заболевания СОР от результатов цитологического исследования и показателей экспрессии белков Ki67, P16 и P53. Значение коэффициента детерминации для построенных моделей составило $0,54 \pm 0,07$, а показатель AUC – $0,82 \pm 0,07$.

Таким образом, в отношении дифференциальной диагностики рака и предраковых состояний СОР, метод цитологии в комбинации с ФИЦХИ по соотношению чувствительности и специфичности занимает промежуточное положение между методами гистологии (AUC=0,97) и классической цитологии (AUC=0,77) (рис. 5).

По сравнению с использованием только классической цитологии, проведение дополнительного ФИЦХИ привело к повышению чувствительности и значительному снижению количества ложноотрицательных результатов (в среднем, на 14 случаев из 21). Одновременно с этим, комбинированный подход характеризовался снижением специфичности и появлением ложноположительных результатов (в среднем, 6 случаев), а при использовании метода классической цитологии ложноположительные результаты отсутствовали. Несмотря на это мы полагаем, что комбинация методов цитологии и ФИЦХИ является более выигрышной в контексте поиска оптимального баланса чувствительности и специфичности в сравнении с классической цитологией. Кроме того, применение ФИЦХИ позволяет повысить чувствительность традиционного цитологического исследования и увеличить количество выявляемых случаев злокачественных новообразований СОР на этапе донозологической диагностики.

Заключение. В настоящей работе проанализирована возможность применения ФИЦХИ в стоматологии для дифференциальной микроскопической диагностики пред- и онкологической патологии СОР. Выявленные особенности экспрессии маркеров пролиферативной активности P16, P53, Ki67 в клетках эпителия ротовой полости методом ФИЦХИ в комбинации с классической цитологией позволили повысить эффективность диагностики злокачественных новообразований органов и тканей полости рта, что в перспективе может способствовать более раннему началу лечения и снижению числа случаев онкологических заболеваний на поздней стадии.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 5-12, 22-26 см. REFERENCES)

1. Сулимов А.Ф., Кузнецова А.Б. Клиническая значимость морфологических методов диагностики слизистой оболочки полости рта и красной каймы губ с целью выявления ранних признаков малигнизации. *Российский стоматологический журнал*. 2013; 2: 30-2.
2. Вильданов М. Н., Оптимизация диагностики и консервативного лечения кератозов слизистой оболочки рта и красной каймы губ. Дисс. канд. мед. наук. Уфа; 2017.
3. Максимовская Л.Н., Абрамова М.Я., Лукина Г.И. Государственная программа онкоскрининга заболеваний слизистой оболочки рта в России. *Кафедра*. 2018; 65: 56-8.
4. Рабинович О.Ф., Рабинович И.М., Частота выявления онкологической патологии в структуре заболеваний слизистой оболочки рта. *Клиническая стоматология*. 2020; 3 95: 32-5. DOI: 10.37988/1811-153X_2020_3_32.
13. Гельфанд И.М., Романов И.С., Минкин А.У. Тактика лечения плоскоклеточного рака полости рта стадий T1–2cN0m0. *Опухоли головы и шеи*. 2014;(2):33-6. DOI:10.17650/2222-1468-2014-0-2-33-36.
14. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Состояние онкологической помощи населению России в 2017 году. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; 2018.
15. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2018 году. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; 2019.

16. Кряжинова И.А., Олесов Е.Е., Садовский В.В., Степанов А.Ф., Попов А.А. Онкологическая настороженность врачей-стоматологов по данным анкетирования в Московской области. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2019; 21(2): 244-50.
17. Шухорова Ю.А., Ткач Т.М., Буракшаев С.А., Постников М.А. Онконастороженность в практике врача стоматолога на амбулаторном приеме. *Институт стоматологии*. 2020; 3 (88): 20-2.
18. Постников М.А., Трунин Д.А., Габриелян А.Г., Потапов В.Г., Кириллова В.П. Диагностические возможности врача-стоматолога при выявлении новообразований слизистой оболочки полости рта. *Клиническая стоматология*. 2021, 4: 32-6. DOI:10.37988/1811-153X_2020_4_32.
19. Зиновьева О.С., Мотовилова О.М., Качалина Т.С., Зиновьев С.В., Кузнецов С.С., Круглова И.А., Уткин О.В. Исследование пролиферативного потенциала гипопластического эндометрия у пациенток с репродуктивными нарушениями в анамнезе методом флуоресцентной иммуноцитохимии. *Медицинский альманах*. 2017; 6 (51): 84-7.
20. Савостикова М.В., Фурминская Е.Ю., Федосеева Е.С., Кудайбергенова А.Г. Флуоресцентное иммуноцитохимическое исследование вышото и смывов с серозных полостей при интраоперационной цитологической диагностике. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62(12): 742-5. DOI: 10.18821/0869-2084-2017-62-12-742-5.
21. Савостикова М.В., Федосеева Е.С., Фурминская Е.Ю. Современная цитоморфологическая диагностика опухолей легких. *Новости клинической цитологии России*. 2018; 22 (3–4): 3-7.

REFERENCES

1. Sulimov A. F., Kuznetsova A. B. The clinical significance of morphological methods for diagnosing the oral mucosa and the red border of the lips in order to identify early signs of malignancy. *Rossiyskiy stomatologicheskiy zhurnal*. 2013; 2: 30-2. (in Russian)
2. Vildanov M. N. Optimization of diagnostics and conservative treatment of keratosis of the oral mucosa and the red border of the lips. Diss. ... Ufa; 2017. (in Russian)
3. Maksimovskaya L. N., Abramova M. Ya., Lukina G. I. State program of oncoscreening of diseases of the oral mucosa in Russia. *Kafedra*. 2018; 65: 56-8. (in Russian)
4. Rabinovich O. F., Rabinovich I. M. The frequency of detection of oncological pathology in the structure of diseases of the oral mucosa. *Klinicheskaya stomatologiya*. 2020; 3 95: 32-5. DOI: 10.37988/1811-153X_2020_3_32. (in Russian)
5. Aguirre-Urizar J.M., Lafuente-Ibáñez de Mendoza I., Warnakulasuriya S. Malignant transformation of oral leukoplakia: systematic review and meta-analysis of the last 5 years. *Oral Dis*. 2021 Feb 19. DOI: 10.1111/odi.13810. Epub ahead of print. PMID: 33606345.
6. Salehiniya H., Raei M. Oral cavity and lip cancer in the world: An epidemiological review. *Biomedical Research and Therapy*. 2020 7(8), 3898-3905. DOI: 10.15419/bmrat.v7i8.619.
7. Montero P.H., Patel S.G. Cancer of the oral cavity. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* 2015; 24(3):491-508. DOI:10.1016/j.soc.2015.03.006.
8. Rivera C. Essentials of oral cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2015; 8(9):11884-94. PMID: 26617944; PMCID: PMC4637760.
9. Baom N., Hamid B. Epidemiology of oral and pharyngeal cancer. *European journal of pharmaceutical and medical research*. 2017; 4(9):155-64.
10. Kujan O., Camile S. Farah, Newell W. Oral and oropharyngeal cancer in the Middle East and North Africa: Incidence, mortality, trends, and gaps in public databases as presented to the Global Oral Cancer Forum. *Johnson First Published*. 2017. Research Article DOI:10.1177/2057178X17698480.
11. Capote-Moreno A., Brabyn P., Muñoz-Guerra M.F., Sastre-Pérez J., Escorial-Hernandez V., Rodríguez-Campo F.J., García T., Naval-Gías L. Oral squamous cell carcinoma: epidemiological study and risk factor assessment based on a 39-year series. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2020; 49(12):1525-34. DOI:10.1016/j.ijom.2020.03.009. Epub 2020 Apr 30. PMID: 32360101.
12. Inchingolo F., Santacroce L., Ballini A., Topi S., Dipalma G., Haxhiresha K. et al. Oral Cancer: A Historical Review. *Int. J. Environ.*

ЦИТОЛОГИЯ

- Res. Public Health.* 2020; 17(9): 3168. Published 2020 May 2. DOI:10.3390/ijerph17093168.
13. Gelfand I.M., Romanov I.S., Minkin A.U. Tactics of treatment of squamous cell cancer of the oral cavity stages Ct1-2sp0m0. *Opukholi golovy i shei.* 2014; (2):33-6. DOI:10.17650/2222-1468-2014-0-2-33-36. (in Russian)
 14. Kaprin A. D., Starinskiy V. V., Petrova G. V. State of cancer care in Russia in 2017. [Sostoyanie onkologicheskoy pomoshchi naseleniyu Rossii v 2017 godu]. Moscow: MMIOI. P. A. Gertsena – filial of the FBGOU “NMIC radiologii” Minzdrava Rossii; 2018. (in Russian)
 15. Kaprin A. D., Starinskiy V. V., Petrova G. V. Malignant neoplasms in Russia in 2018. [Zlokachestvennye novoobrazovaniya v Rossii v 2018 godu]. Moscow: MMIOI. P. A. Gertsena – filial of the FBGOU “NMIC radiologii” Minzdrava Rossii; 2019. (in Russian)
 16. Kryazhinova I.A., Olesov E.E., Sadovsky V.V., Stepanov A.F., Popov A.A. Oncological alertness of dentists according to the survey data in the Moscow region. *Meditsina ekstremal'nykh situatsiy.* 2019; 21(2): 244-50. (in Russian)
 17. Shukhorova Yu.A., Tkach T.M., Burakshaev S.A., Postnikov M.A. Oncological alertness in the practice of a physician at an outpatient appointment. *Institut stomatologii.* 2020; 3 (88): 20-2. (in Russian)
 18. Postnikov M.A., Trunin D.A., Gabrielyan A.G., Potapov V.G., Kirillova V.P. Diagnostic capabilities of a dentist in the detection of neoplasms of the oral mucosa. *Klinicheskaya stomatologiya.* 2021; 4: 32-6. DOI:10.37988/1811-153X_2020_4_32. (in Russian)
 19. Zinov'eva O.S., Motovilova O.M., Kachalina T.S., Zinoviev S.V., Kuznetsov S.S., Kruglova I.A., Utkin O.V. Study of the proliferative potential of hypoplastic endometrium in patients with a history of reproductive disorders by fluorescent immunocytochemistry. *Meditsinskiy al'manakh.* 2017; 6 (51): 84-7. (in Russian)
 20. Savostikova M.V., Furminskaya E.Yu., Fedoseeva E.S., Kudaibergenova A.G. Fluorescent immunocytochemical study of effusions and flushes from serous cavities during intraoperative cytological diagnosis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2017; 62(12): 742-5. DOI:10.18821/0869-2084-2017-62-12-742-5. (in Russian)
 21. Savostikova M.V., Fedoseeva E. S., Furminskaya E.Yu. Modern cytomorphological diagnostics of lung tumors. *Novosti klinicheskoy tsitologii Rossii.* 2018; 22 (3-4): 3-7. (in Russian)
 22. Dash K.C., Mahapatra N., Bhuyan L., Panda A., Behura S.S., Mishra P. An Immunohistochemical Study Showing Ki-67 as an Analytical Marker in Oral Malignant and Premalignant Lesions. *J. Pharm. Bioallied Sci.* 2020; 12 (Suppl. 1): S274-S278. DOI: 10.4103/jpbs.JPBS_83_20.
 23. Roelens J., Reuschenbach M., von Knebel Doeberitz M., Wentzensen N., Bergeron C., Arbyn M. p16INK4a immunocytochemistry versus human papillomavirus testing for triage of women with minor cytologic abnormalities: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Cytopathology.* 2012; 120(5): 294-7.
 24. Monteiro L., Mello F., Warnakulasuriya S. Tissue biomarkers for predicting the risk of oral cancer in patients diagnosed with oral leukoplakia: A systematic review, *Oral Diseases,* 2021; 27 (8): 1977-92. DOI:10.1111/odi.13747.
 25. Ramos-García P., González-Moles M., Warnakulasuriya S. Oral cancer development in lichen planus and related conditions—3.0 evidence level: A systematic review of systematic reviews, *Oral Diseases.* 2021; 27 (8): 1919-35. DOI:10.1111/odi.13812.
 26. McParland H., Warnakulasuriya S. Lichenoid morphology could be an early feature of oral proliferative verrucous leukoplakia, *Journal of Oral Pathology and Medicine,* 2021; 50 (2): 229-35.