

На правах рукописи

**РЫБАЛЬСКАЯ ВИКТОРИЯ ФЕДОРОВНА**

**РОЛЬ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ФОРМИРОВАНИИ  
ОДОНТОГЕННОЙ ОПУХОЛИ – АМЕЛОБЛАСТОМЫ**

14.03.02– патологическая анатомия

**Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук**

Москва – 2018

Работа выполнена на базе Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов» Минобрнауки РФ, г. Москва

**Научный руководитель:**

**Бабиченко Игорь Иванович** - доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов»

**Официальные оппоненты:**

**Шехтер Анатолий Борухович** – доктор медицинских наук, профессор, руководитель лаборатории экспериментальной морфологии ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России», г. Москва (Сеченовский Университет)

**Омельяненко Николай Петрович** – доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией соединительной ткани ФГБУ "НМИЦ ТО им. Н.Н. Приорова" Минздрава России, г. Москва

**Ведущая организация:**

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Научно-исследовательский институт морфологии человека (ФГБНУ НИИМЧ)**

Защита диссертации состоится «20» июня 2018 года в \_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 212.203.06 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.8.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке и на сайте ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6; сайт <http://dissovet.rudn.ru>)

Автореферат размещен на сайте [www.vak.ed.gov.ru](http://www.vak.ed.gov.ru)

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Д 212.203.06

В.А. Горячев

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования:** Доброкачественные одонтогенные опухоли эпителиального происхождения являются группой заболеваний, которые вследствие разнообразия клинического поведения, патоморфологических особенностей и различных вариантов терапии вызывают большой интерес клиницистов и патологоанатомов. Амелобластома представляет собой доброкачественную одонтогенную эпителиальную опухоль, которая составляет от 1% до 11% всех опухолей головы и шеи и от 11% до 30% всех новообразований челюстных костей. Наиболее часто встречается у лиц трудоспособного возраста, что обуславливает социальную значимость этого заболевания (Faras F., 2017; Sekersi A-E. et al., 2015;)

Несмотря на тот факт, что амелобластома является доброкачественным образованием, нередки случаи ее рецидивирования и высокой инвазивности, что придает особую важность правильному выбору метода лечения. В связи с этим, серьезной задачей является определение прогностических факторов агрессивного роста амелобластомы. Данные последних исследований свидетельствуют о том, что характеристики гистологического варианта опухоли, могут являться необходимыми прогностическими критериями амелобластомы (Nagi R. et al., 2016; Milman T. et al., 2016).

В свою очередь современные гистологические классификации амелобластомы могут помочь выявить клинически агрессивные виды течения амелобластомы. (Shaikhi Kh. et al., 2012).

**Степень разработанности темы:** Ранее было показано, что маркер пролиферации Ki-67 позволяет оценить агрессивность кератокистозных одонтогенных опухолей (Yu Y.H. et al., 2015; Safadi R.A. et al., 2016). Исследование амелобластомы с маркером Ki-67 позволило сделать вывод о том, что максимальная пролиферативная активность в амелобластомах отмечается в периферическом клеточном слое, в то время как клетки звездчатого ретикулума обладают слабой пролиферативной активностью (Бабиченко И.И. и др., 2013; Усачев Е.С., 2014; Lei Y. et al., 2014), однако эти показатели не связаны с агрессивностью клинического течения амелобластомы. Было описано исследование, направленное на определение белка SOX2 мультипотентных стволовых клеток, как маркера амелобластической карциномы, но не проводилось изучение корреляционных взаимоотношений между агрессивностью клинического течения амелобластомы, гистологическим вариантом, пролиферативной

активностью клеток и наличием в опухоли плюрипотентных стволовых клеток (SOX2).

**Цель исследования:** Дать клинико-морфологическую характеристику различным гистологическим вариантам амелобластомы по возрастным группам, частоте рецидивирования, обширности поражений, пролиферативной активности (Ki-67) и наличию плюрипотентных стволовых клеток (с использованием белка SOX2) для прогнозирования тактики лечения пациентов.

**Задачи исследования:**

1. Провести анализ операционного и архивного биопсийного материала отделения хирургической стоматологии и лаборатории патологической анатомии ФГБУ «ЦНИИС и ЧЛХ» Минздрава РФ за 20 лет для выявления частоты встречаемости, особенностей клинического течения и рецидивирования различных морфологических вариантов амелобластом.

2. Изучить роль пролиферативных процессов в амелобластомах различных гистологических вариантов с помощью маркера клеточной пролиферации Ki-67.

3. Изучить клиническое значение наличия плюрипотентных стволовых клеток, содержащих белок SOX2, в различных гистологических вариантах амелобластом.

4. Проследить корреляционные связи между пролиферативной активностью клеток (по белку Ki-67), распределением плюрипотентных SOX2-позитивных стволовых клеток и клиническими проявлениями заболевания у пациентов с амелобластомами.

5. Выявить морфологические критерии, определяющие агрессивное клиническое течение амелобластомы для прогнозирования тактики лечения пациентов.

**Научная новизна:** Впервые показано, что повышенная способность к рецидивированию и обширность поражений костной ткани при базальноклеточном и плексиформном гистологических вариантах амелобластомы связаны с высокими показателями пролиферативной активности клеток по белку Ki-67.

Впервые установлено, что агрессивный характер клинического течения базальноклеточного и плексиформного вариантов амелобластомы

характеризуется высокой концентрацией в них плюрипотентных стволовых клеток по белку SOX2.

Впервые выявлена умеренная положительная и достоверная корреляционная взаимосвязь между гистологическим вариантом амелобластомы, размером опухоли, пролиферативной активностью клеток и наличием плюрипотентных стволовых клеток.

**Теоретическая и практическая значимость:** На основе изучения пролиферативной активности (Ki-67) и наличия плюрипотентных стволовых клеток (SOX2) удалось выделить базальноклеточный и плексиформный варианты амелобластомы, как наиболее агрессивные, требующие проведения более радикальных методов лечения. Агрессивный характер клинического течения фолликулярного, зернистоклеточного и акантоматозного вариантов амелобластомы зависит от выраженности пролиферативной активности клеток и наличия плюрипотентных стволовых клеток. Монокистозный и периферический гистологические варианты амелобластомы, характеризуются редкими рецидивами, слабой пролиферативной активностью и низким содержанием плюрипотентных стволовых клеток, для подобных морфологических вариантов целесообразно использовать кюретаж или краевую резекцию челюсти.

**Методология и методы исследования:** Исследование проведено на основании изучения историй болезни 76 пациентов с амелобластомой, с оценкой данных по возрасту, полу, наличию рецидива заболевания и обширности поражения. Проведены морфологические исследования различных гистологических вариантов амелобластомы.

Проведены иммуногистохимические исследования пролиферативной активности клеток по белку Ki-67 и распределения плюрипотентных стволовых клеток по белку SOX2 в различных гистологических вариантах амелобластомы.

Проведен статистический анализ корреляционных взаимоотношений между клиническими и иммуногистохимическими характеристиками амелобластом. Для сравнения межгрупповых различий использовались непараметрические тесты Манна-Уитни и Краскала-Уоллеса. Корреляционные взаимоотношения критериев выявляли с помощью коэффициента корреляции Спирмена.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Показатели пролиферативной активности клеток амелобластомы позволяют выявить базальноклеточный и плексиформный варианты амелобластомы в качестве наиболее агрессивных гистологических вариантов.
2. Агрессивность базальноклеточного и плексиформного гистологических вариантов амелобластомы характеризуется высокой плотностью распределения SOX2-позитивных плюрипотентных стволовых клеток.
3. Между наличием в амелобластомах плюрипотентных стволовых клеток и пролиферативной активностью эпителиальных клеток, а также размерами опухоли, существует умеренная и достоверная корреляционная связь.
4. Высокая пролиферативная активность клеток и обширность поражения костной ткани достоверно коррелируют с частотой рецидивирования опухоли.

**Степень достоверности:** Данное исследование произведено на основе изучения морфологического материала 76 случаев заболевания амелобластомой. Результаты исследований удалось систематизировать по основным заданным критериям работы, таким как гистологический вариант, возраст, пол, обширность поражения и наличие рецидива. В работе применен комплекс методов исследования, включающий методы световой микроскопии, иммуногистохимии и морфометрии. Иммуногистохимическое и светооптическое исследование проводили на сертифицированном оборудовании. В ходе последующего анализа данных, в котором были использованы адекватные методы статистики, были получены статистически значимые различия, что также позволяет сделать вывод о том, что объем выборки являлся достаточным.

### **Апробация работы**

Материалы диссертации доложены на Всероссийской научной конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 16-17 апреля 2014 г), на XVII Ежегодном научном форуме «Стоматология-2015» в рамках Российской недели здравоохранения (7-11 декабря 2015 года, Москва, Россия), VII международной научной конференции SCIENCE HEALTH-2016 (12 - 15 апреля 2016 года, Москва, Россия); Научно-практической конференции «Медицина и фармакология: научные приоритеты ученых», г. Пермь, ноябрь 2016; XIV международной научно-практической конференции «Достижения и проблемы современной науки» г. Санкт-Петербург (4 декабря 2016 г.); Международной научной

конференции «Эволюция научного знания», Москва, Россия (28-29 ноября 2016 г.); на XVIII Ежегодном научном форуме «Стоматология-2016» (5-9 декабря 2016 года), Москва, Россия.

Работа апробирована на совместном заседании кафедры патологической анатомии и кафедры общей патологии и патологической физиологии им. В.А. Фролова ФГАОУ ВО РУДН 1 марта 2018 года.

**Публикации результатов исследования:** По теме диссертации опубликовано 12 научных работ, из них 3 - в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для публикации результатов диссертационных исследований.

**Внедрение результатов исследования:** Результаты диссертационной работы внедрены в практическую работу лаборатории патологической анатомии ФБГУ «ЦНИИС и ЧЛХ» МЗ РФ, а также в учебный процесс на кафедре патологической анатомии медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Минобрнауки РФ в качестве лекционного материала и семинарских занятий для студентов групп по специальности «Стоматология».

**Объем и структура диссертации:** Диссертация представлена на 110 страницах текста, состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследования и их обсуждения, заключения, списка литературы, который содержит 126 источников, из них 43 российских и 83 зарубежных. Содержит 10 таблиц и 33 рисунка.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

В работе был использован операционный и биопсийный материал, который отправлялся в лабораторию патологической анатомии на гистологическое исследование. Пациенты, которым была сделана операция, проходили лечение в профильных отделениях «ЦНИИС и ЧЛХ» МЗ РФ: ДЧЛХ, I и II ЧЛХ, консультативном отделениях. Таблицы для клинического анализа лечения были сделаны с указанием возраста и пола пациентов, размеров опухоли, которые оценивались по рентгенологическим снимкам и выражены в условных единицах: за одну единицу измерения был принят объем опухолевого новообразования в челюсти, по размеру соответствующий двум молярам.

Полученный материал обработан в лаборатории патологической анатомии «ЦНИИС и ЧЛХ» МЗ РФ. Для иммуногистохимического исследования после гистологического подтверждения амелобластомы было отобрано 76 случаев заболевания амелобластомой с шифрами по МКБ-10 D16.4 и D16.5 и гистологическим кодом М 9310/0. Первичные антитела к антигенам человека, использованные в работе, имели следующие характеристики: моноклональные кроличьи антитела к Ki-67 (Clone SP6, изотип Rabbit IgG) производитель Cell Marque и моноклональные кроличьи антитела к SOX-2 (Clone SP76, изотип Rabbit IgG), производитель Cell Marque. ИГХ-реакции проводили с использованием системы детекции по протоколу QUANTO на приборе автоматизированного иммуногистохимического окрашивания Autostainer 360 производства Thermo Fisher Scientific (USA). Докрашивание срезов производилось гематоксилином Майера. В дополнение к традиционному протоколу иммуногистохимического исследования отдельно взятых биопсий был использован метод тканевых матриц (ТМА). В нашей работе использовался набор Manual Tissue Microarray Kit IW-121 EZ NVF (IHC World, USA). В настоящей работе было сделано 5 вариантов матриц, по три микросреза с каждого подготовленного парафинового блока, для иммуногистохимической реакции на белки Ki-67, SOX2, а также окраски гематоксилином и эозином. На каждой из матриц было расположено по составленной схеме от 15 до 25 образцов биопсийной ткани амелобластом.

Оценка результатов исследования начиналась с изучения стекла, окрашенного гематоксилином и эозином, под микроскопом AxioStar plus (Carl Zeiss, Германия). Затем производили подсчет ядер, давших положительную реакцию с антителами против Ki-67 и SOX-2: на 300 клеток в поле зрения в одинаковых участках при увеличении x200. По завершению анализа результатов исследования проводили фотографирование объектов с помощью камеры AxioCam MRc 5(D) (Carl Zeiss, Германия). В работе были описаны восемь гистологических вариантов соответственно классификации Shaikhi Kh. et al. (2012).

### **Статистический анализ полученных результатов**

Статистический анализ выполняли в программе Statistica 10.0. Нормальность распределения значений полученных параметров в исследуемых группах оценивали с помощью критерия Шапиро-Вилка. В группах с нормальным распределением данные представлены в виде среднего и среднеквадратического отклонения. Для сравнения двух групп с



нормальным распределением использовали t-критерий Стьюдента с коррекцией Вэлча. В группах, где значения не соответствовали критериям нормального распределения, данные представлены в виде Me, верхних и нижних квартилей Q1 и Q3 вариационного ряда. Для выявления меж- и внутригрупповых различий использовали двусторонние непараметрические тесты – тест Манна-Уитни для сравнения двух групп, ранговый дисперсионный анализ Краскала-Уоллеса для сравнения трех и более групп.

Корреляционные взаимоотношения выявляли с помощью коэффициента корреляции Спирмена. Различия считали достоверными при достигнутом уровне значимости  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Результаты анализа архивных и биопсийных данных

Анализ архивного биопсийного материала лаборатории патологической анатомии ФГБУ «ЦНИИС и ЧЛХ» Минздрава РФ за 20 лет позволил выявить 76 случаев заболевания амелобластомой, из которых 36 мужчин и 40 женщин (отношение 1:1,1). Материал для исследования был получен совместно с ассистентом кафедры патанатомии РУДН Цимбалист Н.С.

### Гистологическая характеристика амелобластом

В данном исследовании мы пользовались классификацией амелобластом, предложенной Shaikhi Kh. et al. (2012), в которой выделяются следующие гистологические варианты:

#### *Амелобластома: плексиформный тип*

Было выявлено 24 случая заболевания, среди которых рецидивы составляли 17 (71%). Средний размер плексиформной амелобластомы, выраженный в условных единицах составил 4 (3;4) усл.ед. Для амелобластом плексиформного варианта характерно наличие сети из эпителиальных трабекул, в которых эпителиоциты образуют двойные тяжи.

#### *Амелобластома: фолликулярный тип*

Встречалась в 18-ти случаях, из них в 15-ти (83%) был отмечен рецидив. Средний размер опухоли – 3 (1;4) усл.ед. Эпителий амелобластомы фолликулярного варианта образует островки и тяжи, которые окружает соединительнотканная строма с умеренно или сильно развитым коллагеном.

#### *Амелобластома: зернистоклеточный тип*

Выявлено 5 случаев, из которых 3 рецидива (60%). Размер амелобластомы по рентгеновским снимкам: медиана составляет 3 (2;3) усл.

ед. Для амелобластомы зернистоклеточного варианта характерно наличие эозинофильных гранулярных клеток с пузырьковидными ядрами.

***Амелобластома: акантоматозный тип***

Выявлено 9 случаев, из них в 6-ти отмечались рецидивы (67%). Размер опухоли составил 4 (2;4) усл.ед. Акантоматозный вариант амелобластомы по строению напоминает типичную фолликулярную амелобластому, но отличается тем, что клетки центральной части, похожие на звездчатый ретикулум, замещаются клетками с плоскоклеточной метаплазией, напоминающими клетки шиповатого слоя плоского эпителия. В центре опухолевых островков встречаются концентрические агрегаты кератина («кератиновые жемчужины»).

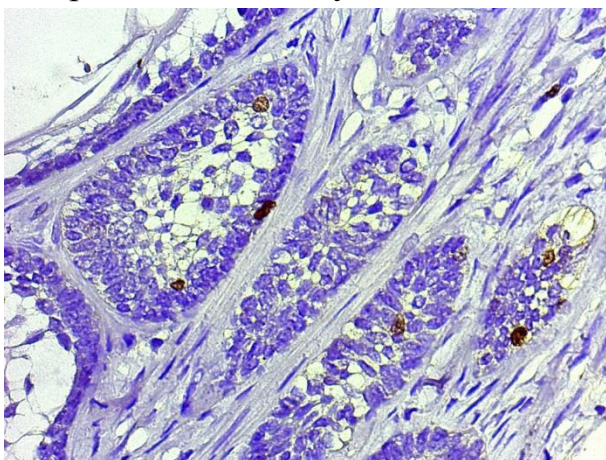


Рисунок 1– Иммуногистохимическая реакция в эпителии амелобластомы фолликулярного типа с антителами к белку Ki-67  
Окраска ДАБ-гематоксилин (x400)

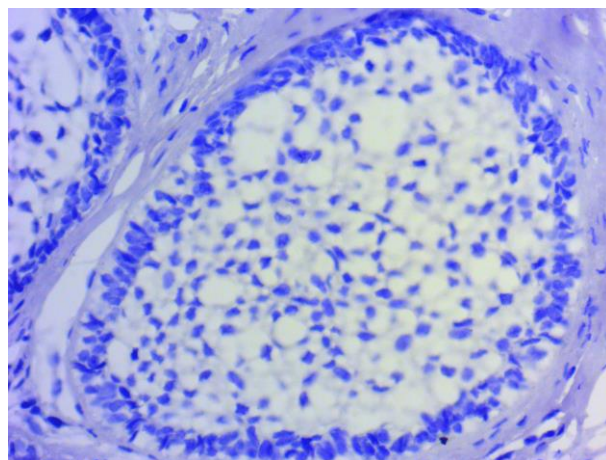


Рисунок 2– Иммуногистохимическая реакция в эпителии амелобластомы фолликулярного типа с антителами к белку SOX2  
Окраска ДАБ-гематоксилин (x400)

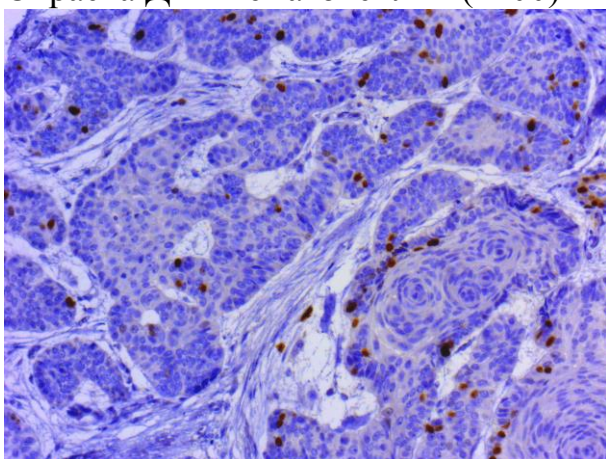


Рисунок 3– Иммуногистохимическая реакция в эпителии амелобластомы базальноклеточного типа с антителами к белку Ki-67  
Окраска ДАБ-гематоксилин (x200)

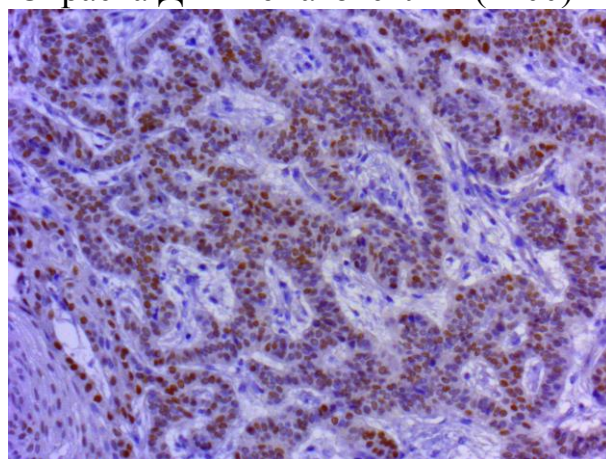


Рисунок 4– Иммуногистохимическая реакция в эпителии амелобластомы базальноклеточного типа с антителами к белку SOX2  
Окраска ДАБ-гематоксилин (x200)

### ***Амелобластома: базальноклеточный тип***

Выявлено 8 случаев, среди которых 7 рецидивов (88%). Размер опухоли составил 5 усл. ед. (5;5). Базальноклеточная амелобластома состоит из гнезд базофильных клеток со скудной цитоплазмой, интенсивно окрашенных гематоксилином. Как правило, гнезда клеток соединяются между собой, образуя сетчатую структуру.

### ***Амелобластома: монокистозный тип***

Выявлено 6 случаев, из них в 2-х выявлены рецидивы (33%). Размер 3 (1;4) усл. ед. Монокистозный (уникистозный) вариант амелобластомы содержит кистозные полости различной величины и формы, выстланные типичным амелобластическим эпителием. Строма сравнительно мало развита.

### ***Амелобластома: десмопластический тип***

Выявлено 3 случая, без рецидивов. Размер опухоли – 3 (1;3) усл.ед. Морфологически десмопластический вариант амелобластомы резко отличается от других амелобластом сильно выраженной коллагенизацией стромы (десмоплазией), в которой содержатся островки одонтогенного эпителия неправильной или звездчатой формы, окруженные узкой зоной рыхлой соединительной ткани.

### ***Периферическая амелобластома***

Выявлено 3 случая, без рецидивов. Размер составил 1 (1;1) усл.ед. Амелобластома периферического варианта представлена островками амелобластического эпителия, образующего фолликулярные и/или плексиформные структуры. Строма периферической амелобластомы хорошо развита и богата коллагеном.

## **Оценка распределения белков и прогностического значения различных гистологических типов амелобластомы**

### ***Размеры амелобластомы***

Среди всех морфологических вариантов амелобластомы самых больших размеров опухоль достигала в базальноклеточном варианте, тогда как периферический отличался наименьшими размерами по сравнению с другими вариантами, что графически отображено на Рисунке 5.

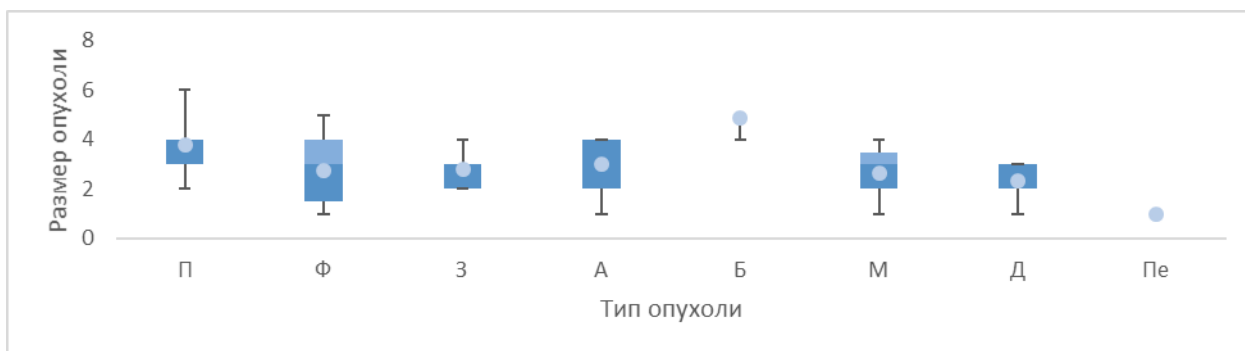


Рисунок 5 – Размеры амелобластомы в сравнении периферической амелобластомы (Пе) с другими морфологическими вариантами.

По критерию Манна-Уитни провели сравнение размеров амелобластомы разных гистологических вариантов. Результаты занесены в Таблицу 1.

Таблица 1.

Сравнение размеров вариантов амелобластомы по Манн-Уитни с выявленными достоверными различиями (при  $p \leq 0,05$ )

Сравниваемые варианты	Критерий достоверности различий, p
Базальноклеточный и монокистозный	0,022
Базальноклеточный и десмопластический	0,016
Базальноклеточный и периферический	0,016
Базальноклеточный и плексиформный	0,014
Базальноклеточный и зернистоклеточный	0,005
Базальноклеточный и акантоматозный	0,004
Базальноклеточный и фолликулярный	0,002
Плексиформный и фолликулярный	0,032
Плексиформный и периферический	0,006
Фолликулярный и периферический	0,050
Зернистоклеточный и периферический	0,025
Акантоматозный и периферический	0,040

Таким образом, достоверно обширный объем опухоль занимает в базальноклеточном варианте амелобластомы, по сравнению со всеми другими гистологическими вариантами (Рыбальская В.Ф. и соавт., 2016). Объем поражения при плексиформном варианте выше по сравнению с фолликулярным и периферической амелобластомой. Фолликулярный, зернистоклеточный и акантоматозный достоверно отличаются от периферического.

### *Маркер пролиферативной активности Ki-67*

Результаты подсчета индекса Ki-67 в разных гистологических вариантах представлены на Рисунке 6. Наименьшая пролиферативная активность была отмечена в периферической амелобластоме, а базальноклеточный вариант отличался самыми высокими показателями наличия белка Ki-67.

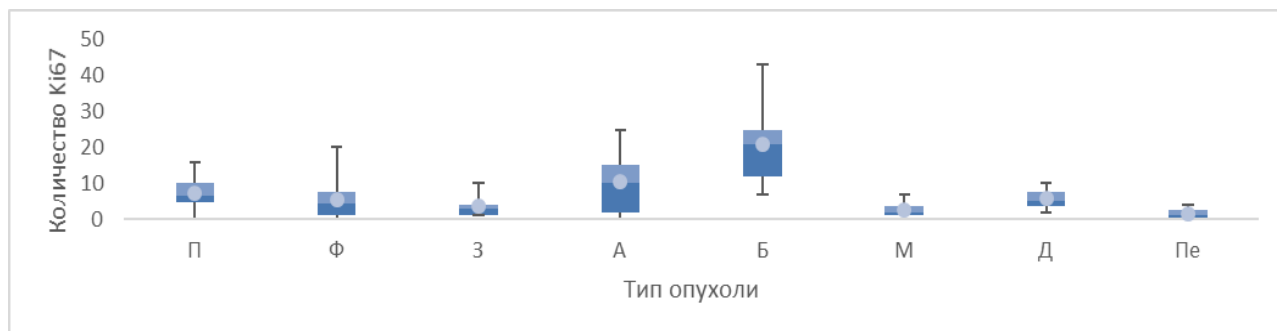


Рисунок 6 –Содержание Ki-67 в различных морфологических вариантах амелобластом ( П – плексиформный, Ф – фолликулярный, З – зернистоклеточный, А – акантоматозный, Б – базальноклеточный, М – монокистозный, Д – десмопластический).

По критерию Манна-Уитни провели сравнение пролиферативной активности разных гистологических вариантов амелобластомы. Результаты достоверных различий занесены в Таблицу 2.

Таблица 2.

Сравнение пролиферативной активности разных вариантов амелобластомы по Манн-Уитни с выявленными достоверными различиями (при  $p \leq 0,05$ )

Сравниваемые варианты	Критерий достоверности различий, p
Базальноклеточный и десмопластический	0,0247
Базальноклеточный и периферический	0,0143
Базальноклеточный и зернистоклеточный	0,0054
Базальноклеточный и монокистозный	0,0024
Базальноклеточный и плексиформный	0 0007
Базальноклеточный и фолликулярный	0,0006
Плексиформный и периферический	0,0448
Плексиформный и монокистозный	0,0314

Таким образом, пролиферативная активность клеток базальноклеточного варианта амелобластомы достоверно выше по сравнению со всеми исследованными гистологическими вариантами (Бабиченко И.И. и соавт., 2017).

Пролиферативная активность клеток в плексиформном варианте опухоли достоверно отличается от монокистозного и периферического вариантов амелобластомы.

Сравнение распределения маркера пролиферации Ki-67 с помощью рангового дисперсионного анализа Краскала-Уоллеса в эпителиоцитах амелобластом с рецидивами и без рецидивов, не обнаружило статистически значимых различий между вариантами.

### *Маркер стволовых клеток SOX2*

Подсчет количества SOX2 положительных клеток проводили в восьми гистологических вариантах амелобластомы. Самые высокие показатели были выявлены у плексиформного, базальноклеточного и десмопластического варианта, самые низкие - в акантоматозном и монокистозном. Отрицательная реакция по SOX2 отмечалась в фолликулярном, зернистоклеточном и периферическом вариантах. На диаграмме (Рисунок 7) меньшее количество клеток с плюрипотентными свойствами отмечалось в фолликулярном, зернистоклеточном и периферическом варианте.

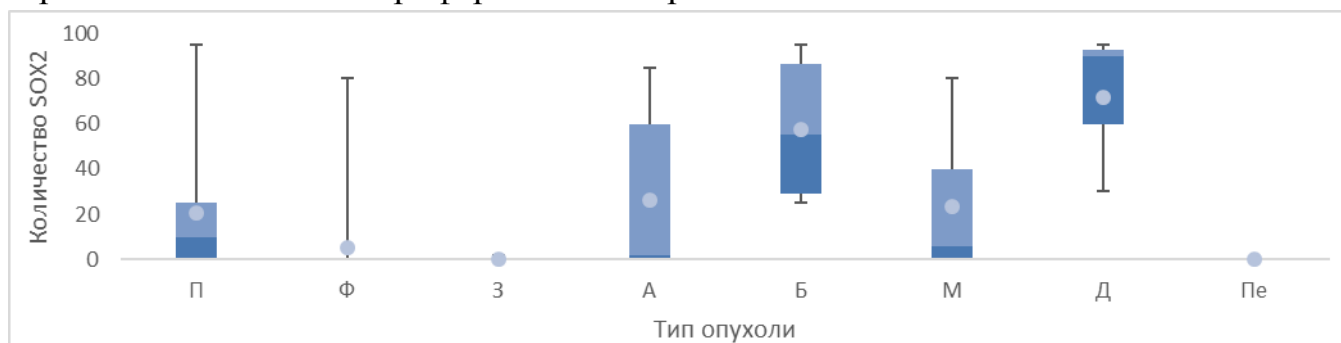


Рисунок 7- Количество SOX2 в различных гистологических вариантах амелобластомы.

По критерию Манна-Уитни провели сравнение распределения белка SOX2 в разных гистологических вариантах амелобластомы, результаты достоверных различий занесены в Таблицу 3.

Таблица 3.

Сравнение распределения маркера SOX2 различных вариантов амелобластомы по Манн-Уитни с выявленными достоверными различиями (при  $p \leq 0,05$ )

Сравняемые гистологические варианты	Критерий достоверности различий, p
Базальноклеточный и монокистозный	0,045
Базальноклеточный и акантоматозный	0,034
Базальноклеточный и периферический	0,014
Базальноклеточный и плексиформный	0,004
Базальноклеточный и зернистоклеточный	0,003
Базальноклеточный и фолликулярный	0,000
Плексиформный и зернистоклеточный	0,044
Плексиформный и десмопластический	0,027
Плексиформный и фолликулярный	0,007
Десмопластический и периферический	0,049
Десмопластический и зернистоклеточный	0,025
Десмопластический и фолликулярный	0,008

Таким образом, распределение SOX2-положительных плюрипотентных стволовых клеток позволило подтвердить агрессивный характер базальноклеточного варианта амелобластомы.

Кроме того, высокая достоверная концентрация SOX2-положительных клеток выявлена в плексиформном варианте амелобластомы по сравнению с фолликулярным и зернистоклеточным.

Высокая концентрация SOX2 также отмечена в десмопластическом варианте по сравнению с плексиформным, фолликулярным, зернистоклеточным и периферической амелобластомой (Бабиченко И.И. и соавт., 2017).

### ***Корреляционная взаимосвязь по Спирмену в амелобластомах***

Для оценки взаимосвязи между показателями был проведен корреляционный анализ по Спирмену, полученные результаты представлены в таблице 4, с описанием силы связи (SIZE – обозначение размера опухоли, REC- обозначение рецидива).

## Результаты корреляционного анализа по Спирмену

№пп	Сравниваемые показатели	Число случаев, n	Сила взаимосвязи, r	Коэффициент достоверности, p
1	SIZE / Ki-67	n= 61	r=0,330	p=0, 009
2	SIZE / SOX2	n= 60	r=0,373	p=0, 003
3	SOX2/ Ki-67	n= 75	r=0,388	p<0,001
4	REC / SOX2	n= 75	r=0,2027	p=0,081
5	REC / Ki-67	n= 76	r=0,2498	p=0,029
6	REC/ SIZE	n= 61	r=0,424	p<0,001

В результате были получены следующие данные:

- 1) Между размерами амелобластомы (SIZE) пролиферативной активностью (Ki-67) выявлена умеренная достоверная корреляция;
- 2) Между размерами амелобластомы (SIZE) и уровнем белка SOX2 выявлена умеренная достоверная корреляция;
- 3) Между белком SOX2 и пролиферативной активностью амелобластомы (Ki-67) выявлена умеренная достоверная корреляция;
- 4) Между наличием рецидивов (REC) и белком SOX2 не выявлено достоверной корреляционной связи;
- 5) Между наличием рецидивов (REC) и белком Ki-67 слабая достоверная корреляционная связь;
- 6) Между наличием рецидивов (REC) и размером опухоли (SIZE) умеренная достоверная корреляция.

При сравнении морфологических характеристик амелобластом в случае с рецидивом и без рецидива с помощью U-критерия Манна-Уитни были исследованы различия по показателям пролиферативной активности (Ki-67), SOX2 и размерам опухоли (SIZE)(Таблица 5).



Таблица 5.

Сравнение показателей по группе рецидив (REC) с помощью U-критерия

Сравниваемые показатели	U-критерий	Коэффициент вероятности, p	Количество случаев
REC/Ki-67	U= 442	p=0,031	25/51
REC/SIZE	U=164	p=0,001	16/45
REC/SOX2	U=478	p=0,098	25/50

Выявлены достоверные различия при сравнении группы с рецидивом амелобластомы и уровнем Ki-67, а также при сравнении группы с рецидивом и размером опухоли. Однако различия между рецидивом заболевания и уровнем SOX2 в амелобластоме не оказались статистически значимыми.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Анализ операционного и архивного материала историй болезни пациентов с заболеванием амелобластомой показал, что наиболее распространенными вариантами являются плексиформный и фолликулярный вариант, на которые приходится 55% всех случаев амелобластом. Наиболее частое формирование рецидивов от 60 до 80% случаев отмечено в базальноклеточном, плексиформном, фолликулярном и акантоматозном вариантах амелобластомы.
2. Повышенная способность к рецидивированию и обширность поражений костной ткани при базальноклеточном и плексиформном гистологических вариантах амелобластомы связаны с высокими показателями пролиферативной активности клеток по белку Ki-67.
3. Агрессивный характер клинического течения базальноклеточного и плексиформного вариантов амелобластомы характеризуется высокой концентрацией в них плюрипотентных стволовых клеток по белку SOX2.
4. Между размером опухоли, пролиферативной активностью клеток по белку Ki-67 и концентрацией в амелобластоме плюрипотентных стволовых клеток (SOX2) существуют достоверные умеренные положительные корреляционные связи.

5. Иммуногистохимическое исследование пролиферативной активности клеток и наличие в опухолях плюрипотентных стволовых клеток определяет агрессивное клиническое течение амелобластомы.

### **Практические рекомендации**

1. Для клинико-морфологической характеристики амелобластомы рекомендуется проводить иммуногистохимическое исследование.
2. Результаты настоящей работы свидетельствует о том, что при постановке диагноза амелобластомы, следует обратить внимание на высокую пролиферативную активность клеток по белку Ki-67, количество SOX2 положительных клеток, большой объем поражения опухолью, что свидетельствует об агрессивном росте амелобластомы.
3. Агрессивный рост наиболее характерен для базальноклеточного и плексиформного вариантов. При выявлении этих вариантов с агрессивным ростом следует проводить более радикальные оперативные вмешательства.
4. Неагрессивный рост характерен для зернистоклеточного, монокистозного, периферического вариантов. При выявлении этих вариантов радикальное вмешательство в объеме резекции необязательно, объем оперативного вмешательства следует определять в зависимости от объемов опухоли.

### **Перспективы дальнейшей разработки темы:**

В ходе настоящего исследования были получены данные, указывающие на необходимость проведения иммуногистохимического исследования опухоли с использованием маркеров, выявляющих плюрипотентные стволовые клетки и пролиферативную активность клеток, для составления плана лечения пациента и выбора наиболее подходящего оперативного вмешательства в зависимости от гистологического варианта амелобластомы.

Учитывая, что опухоль имеет одонтогенное происхождение, для составления более полной характеристики необходимо дальнейшие исследования причин роста амелобластомы. Так, например, в основе развития и дифференцировки тканей организма, в том числе и зубов, а также некоторых злокачественных опухолей, лежат сигнальные пути, более подробное изучение которых предположительно поможет выявить и уточнить механизмы ее роста и формирования на молекулярном уровне.

## Список научных работ, опубликованных по теме исследования:

1. Бабиченко И.И., Семкин В.А., Усачев Е.С., **Рыбальская В.Ф.**  
ИГХ - исследования фолликулярной кисты, кератокистозных одонтогенных опухолей и амелобластомы. Сборник материалов Всероссийской научной конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии с международным участием. М.; 2014. - С. 156-157.
2. Цимбалист Н.С., **Рыбальская В.Ф.**, Семкин В.А., Бабиченко И.И.  
Особенности экспрессии белка SOX2 стволовых клеток в амелобластоме. Ж-л «Стоматология». 2015. Т. 94, №6, Вып. 2. - С.21.
3. Цимбалист Н.С., **Рыбальская В.Ф.**, Семкин В.А., Бабиченко И.И.  
Wnt-сигнальный путь и амелобластомы. Сборник тезисов VII Международной научной конференции SCIENCE4HEALTH-2016. М.; - С. 162-163.
4. Цимбалист Н.С., **Рыбальская В.Ф.**, Семкин В.А., Бабиченко И.И.  
Особенности экспрессии белка  $\beta$ -катенина в амелобластомах. Ж-л «Стоматология». 2016. Т. 95. № 6. - С.53.
5. **Рыбальская В.Ф.**, Цимбалист Н.С., Семкин В.А., Бабиченко И.И.  
Распределение маркера пролиферативной активности Ki-67 в различных гистологических вариантах амелобластом. Сборник научно-практической конференции «Медицина и фармакология: научные приоритеты ученых». Пермь; 2016.- С.62-65.
6. **Рыбальская В.Ф.**, Цимбалист Н.С., Семкин В.А., Бабиченко И.И.  
SOX2 как потенциальный маркер выявления клеток, обладающих плюрипотентными свойствами в амелобластомах различных гистологических вариантов. Сборник материалов Международной научной конференции «Эволюция научного знания». М.; 2016.- С.59-65.
7. **Рыбальская В.Ф.**, Цимбалист Н.С., Семкин В.А., Бабиченко И.И.  
Взаимосвязь размеров амелобластомы с ее гистологическими вариантами. Мультидисциплинарный сборник научных публикаций XIV международной научно-практической конференции «Достижения и проблемы современной науки». Часть 2. С-П.;- 2016. - С.23–27.
8. Бабиченко И.И., **Рыбальская В.Ф.**, Цимбалист Н.С., Семкин В.А.  
Иммуногистохимические показатели агрессивности клинического течения амелобластомы. Ж-л «Трудный пациент». 2017. Том 15. №3. - С. 55-57.

9. Бабиченко И.И., **Рыбальская В.Ф.**, Цимбалист Н.С., Семкин В.А.  
Изучение роли канонического Wnt-сигнального пути в формировании амелобластомы. Ж-л «Трудный пациент». 2017. -Т. 15, № 6-7.- С. 40 - 42.

#### **Статьи в журналах, рекомендованных ВАК для публикации:**

10. Н.С. Цимбалист, **В.Ф. Рыбальская В.Ф.**, В. А. Сёмкин, А.И. Неробеев, И.И. Бабиченко.

К вопросу об особенностях хирургического лечения различных гистологических вариантов амелобластомы». Ж-л «Медицинский совет» 2017. №14 . - С. 128–131.

11. И.И. Бабиченко, **В.Ф. Рыбальская**, Н.С. Цимбалист, В.А. Сёмкин  
Пролиферативная активность клеток опухоли и распределение SOX2+ плюрипотентных стволовых клеток в различных гистологических вариантах амелобластомы». Ж-л «Архив патологии». 2018.- Т. 80, №1. - С. 21-26.

12. И.И.Бабиченко, Н.С.Цимбалист, **В.Ф.Рыбальская**, А.А.Шерстнев, В.А. Семкин.

Роль Wnt/ $\beta$ -катенин сигнального пути в формировании амелобластомы. Ж-л «Стоматология». 2018.- Т. 97. №2. - С. 22-24.

### **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

ДЧЛХ - отделение детской челюстно-лицевой хирургии при ЦНИИСе

ИГХ - иммуногистохимическое исследование (иммуногистохимия)

ЦНИИС и ЧЛХ - Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии

Ki-67- маркер пролиферативной активности клеток

REC - обозначение рецидива

SIZE - обозначение размера опухоли

SOX2 - маркер плюрипотентных стволовых клеток

TMA - метод тканевых матриц (tissue microarray)

## РЕЗЮМЕ

### **Кандидатской диссертации Рыбальской Виктории Федоровны «Роль стволовых клеток в формировании одонтогенной опухоли – амелобластомы»**

В представленной диссертации был произведен поиск прогностических маркеров, определяющих агрессивный рост амелобластомы и дана характеристика по каждому гистологическому варианту опухоли. Объем исследования составил 76 случаев амелобластомы. Для определения агрессивного клинического течения опухоли исследовали размеры опухоли, пролиферативную активность и наличие плюрипотентных клеток в опухоли на основании анализа подсчетов содержания белков Ki-67 и SOX2. ИГХ-исследование проводилось с применением метода тканевых матриц ТМА (tissue microarray). Были установлены достоверные умеренные положительные корреляционные связи между размером опухоли, пролиферативной активностью клеток по белку Ki-67 и концентрацией в амелобластоме плюрипотентных стволовых клеток (SOX2). В настоящем диссертационном исследовании были выявлены гистологические варианты с агрессивным клиническим течением – базальноклеточный и плексиформный, в которых были отмечены высокие показатели пролиферативной активности клеток по белку Ki-67 и высокая концентрация плюрипотентных стволовых клеток по белку SOX2.

## SUMMARY

### **PhD thesis the Rybalskaya Viktoria Fedorovna "The role of stem cells in the formation of an odontogenic tumor - ameloblastoma"**

In the presented thesis was made for prognostic marker determining for aggressive growth of ameloblastoma and a characteristic for each histological variant of the tumor. The volume of the study was 76 cases of ameloblastoma. To determine the aggressive clinical course of the tumor, the tumor size, proliferative activity and the presence of pluripotent cells in the tumor were examined on the basis of an analysis of the counts of the protein content of Ki-67 and SOX2. IHC-study was carried out with the use of the tissue matrix TMA (tissue microarray) method. Reliable moderate correlation relationships between tumor size, proliferative activity of cells over the Ki-67 protein and concentration in ameloblastoma of pluripotent stem cells (SOX2) has been received. In this thesis, histological variants with aggressive clinical course - basal cell and plexiform - were detected, in which high values of proliferative activity of cells on the Ki-67 protein and a high concentration of pluripotent stem cells along the SOX2 protein were noted.