



Шляга И.Д.¹✉, Колядич Ж.В.², Ачинович С.Л.³, Мириленко Л.В.², Бич Т.А.⁴, Киселев П.Г.², Шалыго И.Ф.⁵

¹ Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь

² Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии имени Н.Н. Александрова, Минск, Беларусь

³ Гомельский областной клинический онкологический диспансер, Гомель, Беларусь

⁴ Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

⁵ Гомельское областное клиническое патологоанатомическое бюро, Гомель, Беларусь

Анализ результатов иммуногистохимического исследования биопсийного материала пациентов с хроническим гиперпластическим ларингитом

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования – Шляга И.Д., Колядич Ж.В., Ачинович С.Л.; сбор материала – Шляга И.Д., Колядич Ж.В., Ачинович С.Л., Шалыго И.Ф.; статистическая обработка данных, анализ и интерпретация результатов – Мириленко Л.В., Ачинович С.Л.; написание текста – Шляга И.Д., Колядич Ж.В., Мириленко Л.В., Ачинович С.Л.; редактирование, проверка критически важного материала – Колядич Ж.В., Бич Т.А., Киселев П.Г.

Подана: 09.02.2023

Принята: 12.03.2023

Контакты: irina.shlyga@gmail.com, janept@list.ru, ser.achinowitch2017@yandex.ru, ludamirilen@gmail.com

Резюме

Цель исследования. Провести анализ результатов иммуногистохимического исследования биопсийного материала пациентов с хроническим гиперпластическим ларингитом и дисплазией гортани.

Материалы и методы. В исследование включен 51 пациент с клиническим диагнозом «хронический гиперпластический ларингит» (ХГЛ) – код по МКБ-10 J37.0 (35 (69%) мужчин и 16 (39%) женщин в возрасте от 21 года до 76 лет).

Методами исследования были осмотр врача-оториноларинголога, морфологическое, в том числе иммуногистохимическое (ИГХ), исследование.

Все пациенты, включенные в исследование, проходили лечение в УЗ «Гомельская областная клиническая больница» и УЗ «Гомельская областная специализированная клиническая больница» в 2017–2021 гг. по поводу ХГЛ: 1-я группа пациентов (n=30) имела дисплазию многослойного плоского эпителия (МПЭ) легкой степени, 2-я (n=21) – дисплазию МПЭ тяжелой степени. В 1-й группе мужчин было 17 (57%), женщин – 13 (43%), во 2-й – 3 (14%) и 18 (86%) соответственно. Возраст пациентов 1-й группы составил 45,0 (SD 13,5) года, от 21 года до 76 лет, пациентов 2-й группы – 56,6 (SD 7,8) года, от 47 лет до 71 года.

Проведено патогистологическое, в том числе ИГХ, исследование биопсийного материала всех пациентов с ХГЛ. Для этого биопсийный материал фиксировался в 10% забуференном нейтральном формалине и подвергался стандартной парафиновой проводке: проводился через батарею спиртов, ксилол, парафин. Были изготовлены гистологические срезы толщиной 4 мкм, и гистологические препараты окрашивались гематоксилином и эозином.



Иммуногистохимическое исследование выполнялось с помощью системы визуализации MACH1 Universal HRP Polymer Kit (BioCare Medical, USA). В качестве хромогена применялся диаминобензидин. Использовались следующие первичные моноклональные антитела: p53, клон DO-7 (Leica Biosystems Newcastle, UK), BCL-2, клон bcl-2/100/D5 (Leica Biosystems Newcastle, UK), Epstein – Barr Virus, клон EBV6 (BioCare Medical, USA), Ki-67, клон MM1 (Leica Biosystems Newcastle, UK), CD31, клон 1A10 (Leica Biosystems Newcastle, UK) и набор EGFR Kit (BioCare Medical, USA). Результаты иммуногистохимической реакции оценивали при световой микроскопии: при позитивной экспрессии EGFR и CD31 оценивали окрашивание мембран, Ki-67 и p53 – ядер, Epstein – Barr Virus – мембран и парануклеарное окрашивание цитоплазмы, BCL-2 – ядерное и цитоплазматическое окрашивание. Экспрессию p53, BCL-2, Epstein – Barr Virus считали позитивной при окрашивании более 10% клеток.

Результаты. При патогистологическом исследовании биопсийного материала в 1 (4%) случае были выявлены патогенные грибы рода *Candida*, в 46 (90%) случаях – морфологические признаки вирусной койлоцитотической атипии: увеличение ядер, пикноз и гиперхромазия ядер, перинуклеарное гало, анизоцитоз, утолщение цитоплазматической мембраны, образование многоядерных клеток. В 10 (20%) случаях определялись морфологические признаки неспецифической воспалительной инфильтрации. Экспрессия Epstein – Barr Virus выявлена при ИГХ-исследовании в 27 (53%) случаях.

Было проведено сравнение экспрессии p53, bcl-2 и Ki-67 в группах с разной степенью дисплазии МПЭ. По числу случаев с экспрессией p53 в ядрах эпителиальных клеток (23% – в группе с дисплазией МПЭ легкой степени, 81% – в группе с дисплазией МПЭ тяжелой степени) исследуемые группы различались статистически значительно ($p=0,005$). По числу случаев экспрессии bcl-2 (13% – в 1-й группе и 76% – во 2-й) исследуемые группы также различались статистически значительно ($p=0,001$). По числу случаев с экспрессией Ki-67 в ядрах эпителиальных клеток в группах с дисплазией МПЭ легкой и тяжелой степени (30% и 57%) статистически значимых различий не было ($p=0,16$).

Закключение. При медиане времени наблюдения за пациентами 29,6 мес. (от 4,4 до 41,7 мес.) по данным Белорусского канцер-регистра на 01.09.2022 в группе пациентов с ХГЛ с дисплазией МПЭ легкой степени выявлен 1 (3%) случай рака гортани, в то время как среди пациентов с дисплазией тяжелой степени число случаев рака гортани составило 10 из 21 (48%) ($p<0,001$), что свидетельствует о высоком потенциале малигнизации дисплазии МПЭ тяжелой степени.

При наличии экспрессии p53 в биопсийном материале озлокачествление произошло в 37,5% случаев, bcl-2 – в 40% случаев, Ki-67 – в 33% случаев. Следовательно, степень дисплазии МПЭ для пациентов с ХГЛ является наиболее значимым показателем в прогнозе малигнизации процесса. В случаях затруднения точного определения степени поражения МПЭ рекомендуется проводить дополнительно ИГХ-исследование с вышеперечисленными маркерами для определения принадлежности пациента с ХГЛ к группе высокого риска малигнизации.

Ключевые слова: хронический гиперпластический ларингит, поражение многослойного плоского эпителия, дисплазия, иммуногистохимическое исследование, биопсийный материал

Shlyaga I.¹, Kaliadich Zh.², Achinovich S.³, Mirylenka L.², Bich T.⁴, Kisialeu P.², Schalygo I.⁵

¹ Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

² N.N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus, Lesnoy, Belarus

³ Gomel Regional Clinical Oncological Dispensary, Minsk, Belarus

⁴ Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

⁵ Gomel Regional Clinical Pathoanatomical Bureau, Gomel, Belarus

Analysis of the Results of Immunohistochemical Study of Biopsy Material of Patients with Chronic Hyperplastic Laryngitis

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: the concept and design of the study – Shlyaga I., Kaliadich Zh., Achinovich S.; collection of material – Shlyaga I., Kaliadich Zh., Achinovich S., Shalygo I.; statistical data processing, analysis and interpretation of results – Mirylenka L., Achinovich S.; writing the text – Shlyaga I., Kaliadich Zh., Mirylenka L., Achinovich S.; editing, checking critical material – Kaliadich Zh., Bich T., Kisialeu P.

Submitted: 09.02.2023

Accepted: 12.03.2023

Contacts: irina.shlyaga@gmail.com, janept@list.ru, ser.achinowitch2017@yandex.ru, ludamirilen@gmail.com

Abstract

Purpose. To analyze the results of an immunohistochemical study of biopsy material from patients with chronic hyperplastic laryngitis and larynx dysplasia.

Materials and methods. The study included 51 patients with a clinical diagnosis of chronic hyperplastic laryngitis (CHL) – MCD-10 code J37.0 (35 (69%) men and 16 (39%) women aged 21 to 76 years).

The research methods included examination by an otorhinolaryngologist, morphological, including immunohistochemical (IHC) examination.

All patients included in the study were treated at the Gomel Regional Clinical Hospital and at the Gomel Regional Specialized Clinical Hospital in 2017–2021 about CHL: the 1st group of patients (n=30) had mild stratified squamous epithelium (SSE) dysplasia, the 2nd (n=21) had SSE dysplasia. In the 1st group, there were 17 men (57%), women 13 (43%), in the 2nd group – 3 (14%) and 18 (86%), respectively. The age of patients in the 1st group was 45.0 (SD 13.5) years, from 21 to 76 years, in the 2nd group – 56.6 (SD 7.8) years, from 47 to 71 years.

A pathohistological study, including IHC, of the biopsy material of all patients with CHL was performed. For this, the biopsy material was fixed in 10% buffered neutral formalin and subjected to standard paraffin wiring: it was passed through a battery of alcohols, xylene, and paraffin. Histological sections were made with a thickness of 4 µm and histological preparations were stained with hematoxylin and eosin.

Immunohistochemical study was performed using the MACH1 Universal HRP Polymer Kit imaging system (BioCare Medical, USA). Diaminobenzidine was used as a chromogen. The following primary monoclonal antibodies were used: p53, clone DO-7 (Leica Biosystems Newcastle, UK), BCL-2, clone bcl-2/100/D5 (Leica Biosystems Newcastle, UK), Epstein-Barr Virus, clone EBV6 (BioCare Medical, USA), Ki-67, clone MM1 (Leica Biosystems Newcastle, UK), CD 31, clone 1A10 (Leica Biosystems Newcastle, UK) and EGFR Kit (BioCare Medical, USA). The results of the immunohistochemical reaction were assessed by light microscopy:



with positive expression of EGFR and CD 31, membrane staining was assessed, Ki-67 and p53 – nuclei, Epstein – Barr Virus – membranes and paranuclear staining of the cytoplasm, BCL-2 – nuclear and cytoplasmic staining. Expression of p53, BCL-2, Epstein – Barr Virus was considered positive when more than 10% of cells were stained.

Results. Histopathological examination of biopsy material in 1 (4%) case revealed pathogenic fungi of the genus *Candida*, in 46 (90%) cases – morphological signs of viral koilocytotic atypia: enlarged nuclei, pyknosis and hyperchromasia of nuclei, perinuclear halo, anisocytosis, thickening of the cytoplasmic membrane, the formation of multinucleated cells. In 10 (20%) cases, morphological signs of nonspecific inflammatory infiltration were determined. Expression of the Epstein – Barr Virus was detected by IHC study in 27 (53%) cases.

The expression of p53, bcl-2 and Ki-67 was compared in groups with different degrees of SSE dysplasia. According to the number of cases with p53 expression in the nuclei of epithelial cells (23% in the group with mild SSE dysplasia, 81% in the group with severe SSE dysplasia), the studied groups differed statistically significantly ($p=0.005$). 2 (13% in group 1 and 76% in group 2), the study groups also differed statistically significantly ($p=0.001$). In terms of the number of cases with Ki-67 expression in the nuclei of epithelial cells in groups with mild and severe (30% and 57%) there were no statistically significant differences ($p=0.16$).

Conclusion. With a median follow-up time of 29.6 months (from 4.4 to 41.7 months), according to the Belarusian Cancer Registry as of September 1, 2022, 1 (3%) case of laryngeal cancer was detected in the group of patients with CHL with mild SSE dysplasia, while among In patients with severe dysplasia, the number of cases of laryngeal cancer was 10 out of 21 (48%) ($p<0.001$), which indicates a high potential for malignancy of severe SSE dysplasia.

In the presence of p53 expression in the biopsy material, malignancy occurred in 37.5% of cases, bcl-2 – in 40% of cases, Ki-67 – in 33%. Therefore, the degree of SSE dysplasia for patients with CHL is the most significant indicator in the prognosis of the process malignancy. In cases where it is difficult to accurately determine the degree of SSE damage, it is recommended to conduct an additional IHC study with the above markers to determine whether a patient with CHL belongs to a high-risk group for malignancy.

Keywords: chronic hyperplastic laryngitis, lesions of stratified squamous epithelium, dysplasia, immunohistochemical study, biopsy material

■ ВВЕДЕНИЕ

Хронические воспалительные процессы в гортани играют важную роль в развитии дисплазии и, в дальнейшем, рака гортани. Особое значение имеет вирусное поражение, так как порядка 20–50% опухолей головы и шеи связаны с вирусами папилломы человека и Эпштейна – Барр с вероятной малигнизацией до 20% случаев [1, 2]. В этиологии рака гортани значительную роль играют курение и сочетание курения со злоупотреблением алкоголем [2, 3]. Дисплазия эпителия на фоне хронического ларингита включает в себя совокупность структурных и цитологических изменений, ассоциированных с повышенным риском возникновения рака гортани. Дисплазия

чаще наблюдается в зрелом и пожилом возрасте, соотношение между мужчинами и женщинами составляет 4,6:1. Ежегодная заболеваемость в США соответствует 10,2 на 100 000 мужского населения и 2,1 на 100 000 женского населения [4].

В Республике Беларусь в последние десятилетия имеет место тенденция к увеличению заболеваемости раком гортани преимущественно сельских жителей: так, в 2019 г. заболеваемость городских жителей составила 3,7 на 100 000 населения, сельских жителей – 6,0 на 100 000 населения (стандартизованный World показатель), причем прирост заболеваемости населения Республики Беларусь за 10 лет (2010–2019 гг.) составил 7,4% [5]. Рак гортани определяется преимущественно у мужчин (94%), чаще в возрастном диапазоне 40–60 лет (86%); в 2016 г. данный диагноз был установлен в I стадии заболевания в 21,9% случаев, во II стадии – в 28,8%, в III стадии – в 31,1%, в IV стадии – в 18,2% по отношению к вновь выявленным случаям [5–7]. Вероятность развития рака на фоне дисплазии, по данным разных авторов, – от 3,5% до 90%, но большинство исследователей оценивают риск злокачественной трансформации в 11–18% в зависимости от степени дисплазии [8–10]. Таким образом, представляет интерес дальнейшее изучение предраковых процессов гортани.

Согласно 3-й редакции Международной классификации опухолей головы и шеи ВОЗ 2005 г. выделяли три группы степеней: слабую, умеренную и тяжелую степени дисплазии. В настоящее время согласно действующей Международной классификации опухолей головы и шеи (ВОЗ, 2017) выделяют две группы поражения многослойного плоского эпителия (МПЭ). Так, low grade соответствует дисплазии легкой степени с выраженной пролиферацией клеток базального и парабазального слоев МПЭ в нижней половине эпителиального пласта, в то время как верхняя половина пласта – с признаками зрелого МПЭ. Вторая группа – тяжелая степень (high grade) – включает в себя умеренную и тяжелую дисплазию, а также рак «на месте» (in situ), при этом в МПЭ определяется нарушение стратификации, выявляются клетки с атипией, в патологический процесс вовлечено более половины пласта МПЭ.

Нами было проведено патогистологическое, в том числе иммуногистохимическое (ИГХ), исследование биопсийного материала пациентов с хроническим гиперпластическим ларингитом (ХГЛ), выполнен сравнительный анализ ИГХ-маркеров в группах с легкой и тяжелой степенями поражения МПЭ, исследована взаимосвязь ИГХ-маркеров с риском последующей малигнизации процесса.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Провести анализ результатов иммуногистохимического исследования биопсийного материала пациентов с хроническим гиперпластическим ларингитом и дисплазией гортани.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все пациенты, включенные в исследование, проходили лечение в УЗ «Гомельская областная клиническая больница» и УЗ «Гомельская областная специализированная клиническая больница» в период 2019–2021 гг. по поводу ХГЛ: 1-я группа пациентов (n=30) имела дисплазию легкой степени, 2-я (n=21) – дисплазию тяжелой степени. В 1-й группе мужчин было 17 (57%), женщин – 13 (43%), во 2-й – 3 (14%) и 18 (86%) соответственно. Возраст пациентов 1-й группы в среднем составил 45,0 (SD 13,5) года (от 21 года до 76 лет), 2-й группы – 56,6 (SD 7,8) года (от 47 лет до 71 года).



Забранный биопсийный материал фиксировали в 10% забуференном нейтральном формалине и подвергали стандартной парафиновой проводке: через батарею спиртов, ксилол, парафин. Были выполнены гистологические срезы толщиной 4 мкм и окраска гематоксилином и эозином.

Выполнение ИГХ-исследования осуществляли с помощью системы визуализации MACH1 Universal HRP Polymer Kit (BioCare Medical, USA). В качестве хромогена применялся диаминобензидин. Использовались следующие первичные моноклональные антитела: p53 – клон DO-7 (Leica Biosystems Newcastle, UK), BCL-2 – клон bcl-2/100/D5 (Leica Biosystems Newcastle, UK), Epstein – Barr Virus – клон EBV6 (BioCare Medical, USA), Ki-67 – клон MM1 (Leica Biosystems Newcastle, UK), CD31, клон 1A10 (Leica Biosystems Newcastle, UK) и набор EGFR Kit (BioCare Medical, USA).

Результаты иммуногистохимической реакции оценивали при световой микроскопии: при позитивной экспрессии EGFR и CD31 оценивали окрашивание мембран, Ki-67 и p53 – ядер, Epstein – Barr Virus – мембран и парануклеарное окрашивание цитоплазмы, BCL-2 – ядерное и цитоплазматическое окрашивание.

Количество позитивно окрашенных клеток оценивалось в пяти различных полях зрения при увеличении $\times 400$ (окуляр $\times 10$, объектив $\times 40$). Для подсчета выбирались различные поля зрения, обязательно с включением поля зрения с максимальным количеством позитивных клеток. Подсчитывалось количество позитивно окрашенных клеток и общее число исследуемых клеток в каждом выбранном поле зрения, определялось процентное соотношение числа позитивных клеток и общего числа исследуемых клеток. Окончательный результат – среднее арифметическое полученных пяти значений – округляли до целого числа, результат выражали в процентах. Результаты иммуногистохимического исследования Ki-67 оценивали полуколичественным методом: показатель пролиферации Ki-67 – количество положительных ядер в поле зрения микроскопа при увеличении $\times 400$ (окуляр $\times 10$, объектив $\times 40$) при исследовании пяти полей зрения. Для маркеров p53, BCL-2, Epstein – Barr Virus, CD31 при подсчете позитивных клеток использовали следующую систему оценки: экспрессия менее 10% клеток – отрицательная, 10–30% – слабоположительная, 31–49% – умеренно положительная, более 50% – выраженная. Интенсивность окрашивания оценивали при помощи «правила увеличения». Окрашивание, легко определяемое при увеличении объектива $\times 5$, относилось к выраженной интенсивности окраски. Окрашивание, четко идентифицируемое при увеличении объектива $\times 20$, идентифицировалось как умеренное. Окрашивание, которое было заметно только при увеличении объектива $\times 40$, оценивалось как слабое.

Оценка количества в стромальном компоненте лимфоцитов, плазматических клеток, макрофагов, нейтрофильных гранулоцитов, эозинофильных гранулоцитов проводилась в пяти различных полях зрения при увеличении $\times 400$ (окуляр $\times 10$, объектив $\times 40$) путем вычисления среднего арифметического полученных пяти значений.

Определение площади сосудистого русла и определение микрососудистой плотности проводились с использованием ИГХ-маркера эндотелия сосудов CD31 при помощи программы для морфометрии Aperio Image Score путем анализа цифрового изображения, полученного с помощью микроскопа и фотокамеры при увеличении $\times 400$ (окуляр $\times 10$, объектив $\times 40$), минимальное количество полей зрения – 5. Гистологические препараты фотографировали в 5 полях зрения при увеличении $\times 400$ (окуляр $\times 10$, объектив $\times 40$) и в 5 полях зрения (объектив 40) при помощи

микроскопа Olympus CX41 RF и цифровой камеры Olympus SC20 с разрешением 1596×1196 пикселей. Площадь поля зрения исследуемого изображения составила $190\,816\ \mu\text{m}^2$ (объектив 10) и $119\,301\ \mu\text{m}^2$ (объектив $\times 40$).

Исследование на ВПЧ-инфекцию не проводилось в связи с результатами последнего исследования авторов статьи по распространенности указанной инфекции среди пациентов со злокачественными новообразованиями гортани стадий T₁₋₂N₀M₀ в Республике Беларусь (ОТЧЕТ О НИР, УДК 616.711-006.6:616-089.28/.29(476), Рег. № НИОКТР 20192190, Рег. № ИКРБС), которая составила 0,9% (95% ДИ 0,1–3,2%), что связано с социально-поведенческими, религиозными и территориальными факторами и свидетельствует о нецелесообразности проведения ВПЧ-теста пациентам с предраковыми и злокачественными заболеваниями гортани как с клинической, так и с экономической точки зрения. Результаты нашего исследования совпадают с данными ряда научных публикаций [4–7].

Статистическая обработка результатов исследования проведена в соответствии с требованиями концепции доказательной медицины [7]. Качественные признаки представлены абсолютными величинами и относительными частотами. Проверка на нормальность распределения количественных признаков осуществлена по критерию Shapiro – Wilk W. В соответствии с правилами представления количественных данных количественные показатели, подчиняющиеся нормальному закону распределения, представлены средним значением (M), среднеквадратичным отклонением (SD), минимальным и максимальным значениями (min, max), количественные показатели, не подчиняющиеся нормальному закону распределения, представлены медианой (Me), нижним и верхним квартилями (LQ, UQ). Сравнение двух и более независимых групп по качественным показателям выполнено по критерию χ^2 Пирсона, двух групп по бинарным показателям (таблицы сопряженности 2 $\times$ 2) – по критериям хи-квадрат с поправкой Йейтса или точному критерию Фишера, если в ячейках ожидаемых частот хотя бы одно значение было менее 5 [8]. Сравнение двух независимых групп по количественным показателям, не соответствующим нормальному закону распределения, выполнено по непараметрическому критерию Манна – Уитни U, трех и более групп – по непараметрическому критерию Краскела – Уоллиса. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Все значения p были двухсторонними.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При патогистологическом исследовании биопсийного материала в 1 (4%) случае были выявлены патогенные грибы рода *Candida*, в 46 (90%) случаях определялись морфологические признаки вирусного поражения (рис. 1).

Имели место признаки койлоцитотической атипии: увеличение ядер, пикноз и гиперхромазия ядер, перинуклеарное гало, анизоцитоз, утолщение цитоплазматической мембраны, образование многоядерных клеток.

В 10 (20%) случаях выявлены морфологические признаки неспецифической воспалительной инфильтрации (рис. 2).

Позитивное окрашивание с антителами к Epstein – Barr Virus установлено в 27 (53%) случаях (рис. 3).

В группе с дисплазией МПЭ легкой степени медиана количества лимфоцитов в строме составила 69,5 (58; 77), медиана количества нейтрофильных гранулоцитов – 4,5 (2,1; 8,1), медиана эозинофильных гранулоцитов составила 0,9 (0,6; 2,1). Медиана

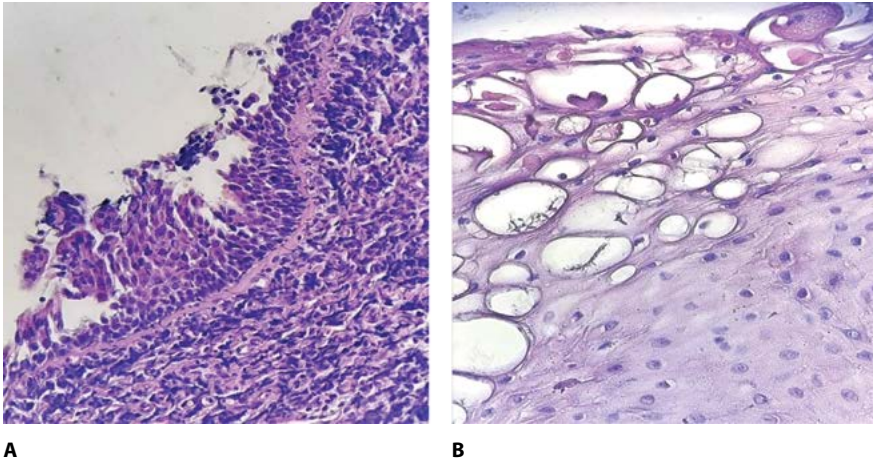


Рис. 1. Инфильтрация стромы лимфоцитами, плазмócитами, гранулоцитами, макрофагами при хроническом кандидозном поражении (А), признаки вирусного поражения – койлоцитоз (В), окраска: гематоксилин и эозин, увеличение объектив $\times 40$
Fig. 1. Infiltration of the stroma with lymphocytes, plasmocytes, granulocytes, macrophages in chronic candidiasis (A), signs of viral damage – koilocytosis (B), stain: hematoxylin and eosin, magnification $\times 40$ lens

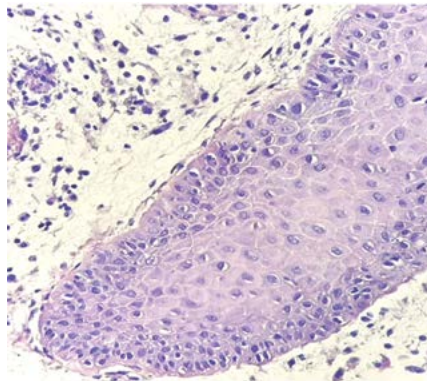


Рис. 2. Неспецифическая воспалительная инфильтрация стромы лимфоцитами, плазмócитами, гранулоцитами, макрофагами. Окраска: гематоксилин и эозин, увеличение объектив $\times 40$
Fig. 2. Nonspecific inflammatory infiltration of the stroma by lymphocytes, plasma cells, granulocytes, macrophages. Stain: hematoxylin and eosin, magnification $\times 40$ lens

количества макрофагов составила 14 (8,3; 20,1), при этом в 3 (10%) случаях были выявлены макрофаги, нагруженные гемосидерином, и в 4 (13%) случаях определялись гигантские многоядерные клетки типа инородных тел. Медиана количества плазмócитов составила 5 (4,2; 10,3), медиана плотности межэпителиальной лимфоцитарной инфильтрации – 5 (2,1; 12,2).

Медиана относительной плотности распределения сосудов на единицу площади (микрососудистой плотности), определяемая при помощи оценки экспрессии CD31, составила 0,036 (0,027; 0,043) (рис. 4).

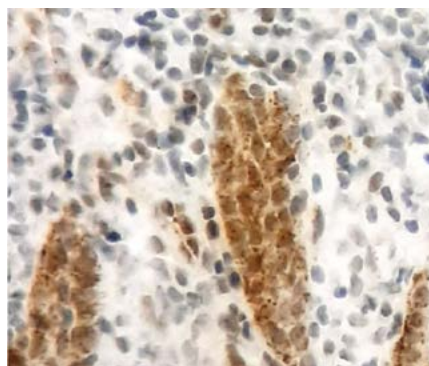


Рис. 3. Иммуногистохимическое исследование с антителами к Epstein – Barr Virus при хроническом гиперпластическом ларингите с дисплазией МПЭ легкой степени. Контрокраска: гематоксилин Майера, увеличение объектив ×40

Fig. 3. Immunohistochemical study with antibodies to Epstein – Barr Virus in chronic hyperplastic laryngitis with low grade SSE dysplasia. Counterstain: Mayer's hematoxylin, magnification ×40 lens

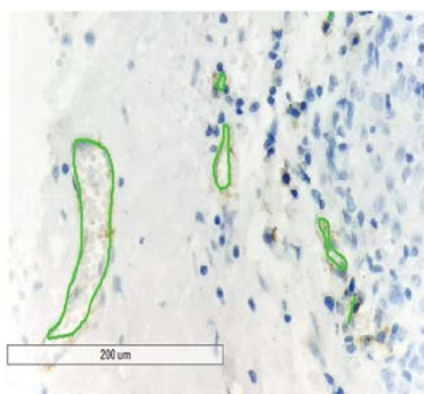


Рис. 4. Иммуногистохимическое исследование с антителами к CD31 при ХГЛ с дисплазией МПЭ легкой степени. Контрокраска: гематоксилин Майера, увеличение объектив ×40

Fig. 4. Immunohistochemical study with antibodies to CD31 in CHL with low grade SSE dysplasia. Counterstain: Mayer's hematoxylin, magnification ×40 lens

При ИГХИ экспрессия p53 в ядрах эпителиальных клеток, расположенных на уровне нижней 1/3 эпителиального пласта, была выявлена в 7 (23%) случаях. Экспрессия bcl-2 отмечена в 4 (13%) случаях (рис. 5).

Экспрессия Ki-67 в ядрах эпителиальных клеток была выявлена в 9 (30%) случаях (рис. 6).

В группе с дисплазией тяжелой степени медиана количества лимфоцитов стромы составила 61 (58; 75), медиана количества нейтрофильных гранулоцитов – 12 (5; 22), медиана количества макрофагов составила 11 (9; 15), медиана количества плазмочитов – 11 (6; 13).

Определялись потеря созревания эпителиоцитов и их цитологическая атипия на всех уровнях эпителия, незрелые клетки с высоким ядерно-цитоплазматическим

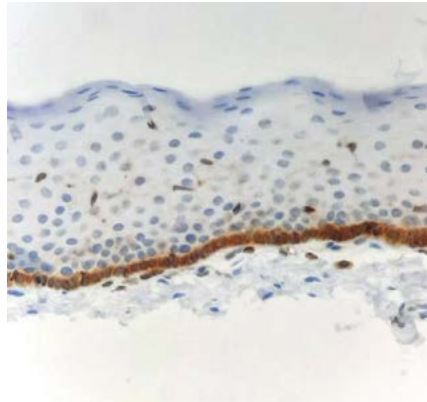


Рис. 5. Иммуногистохимическое исследование с антителами к bcl-2 при ХГЛ с дисплазией МПЭ легкой степени. Контрокраска: гематоксилин Майера, увеличение объектив ×40
Fig. 5. Immunohistochemical study with antibodies to bcl-2 in CHL with low grade SSE dysplasia. Counterstain: Mayer's hematoxylin, magnification ×40 lens

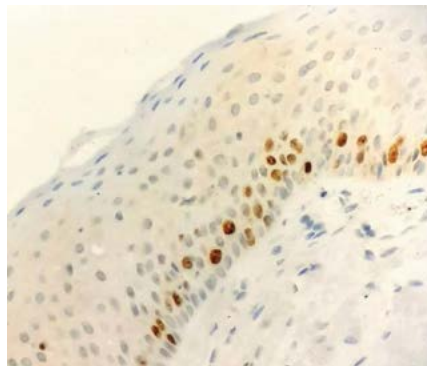


Рис. 6. Иммуногистохимическое исследование с антителами к Ki-67 при ХГЛ с дисплазией легкой степени. Контрокраска: гематоксилин Майера, увеличение объектив ×40
Fig. 6. Immunohistochemical study with antibodies to Ki-67 with CHL low grade dysplasia. Counterstain: Mayer's hematoxylin, magnification ×40 lens

соотношением, иррегулярным контуром ядерной мембраны, наличием грубых глыбок хроматина и нечетко определяющимися ядрышками. Часто встречались фигуры митозов, в том числе атипические митозы на всех уровнях эпителия.

Медиана микрососудистой плотности (относительной плотности распределения сосудов на единицу площади) составила 0,021 (0,013; 0,032) (рис. 7).

Экспрессия p53 в ядрах эпителиальных клеток была выявлена в 17 (81%) случаях (рис. 8).

Экспрессия bcl-2 была выявлена в 16 (76%) случаях (рис. 9).

Маркер Ki-67 в ядрах эпителиальных клеток был выявлен в 12 (57%) случаях (рис. 10).

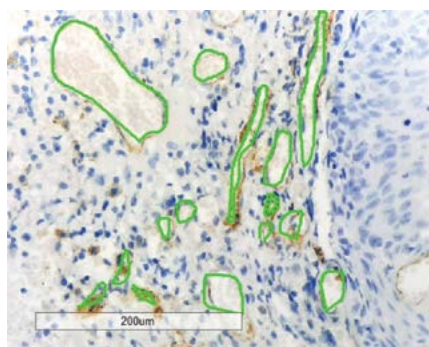


Рис. 7. Иммуногистохимическое исследование с антителами к CD31 при ХГЛ с дисплазией МПЭ тяжелой степени. Контрокраска: гематоксилин Майера, увеличение объектив ×40
Fig. 7. Immunohistochemical study with antibodies to CD31 CHL with high grade SSE dysplasia. Counterstain: Mayer's hematoxylin, magnification ×40 objective

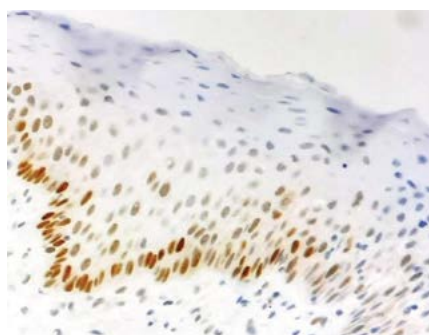


Рис. 8. Иммуногистохимическое исследование с антителами к p53 при ХГЛ с дисплазией МПЭ тяжелой степени. Контрокраска: гематоксилин Майера, увеличение объектив ×40
Fig. 8. Immunohistochemical study with antibodies to p53 in CHL with high grade SSE dysplasia. Counterstain: Mayer's hematoxylin, magnification ×40 objective

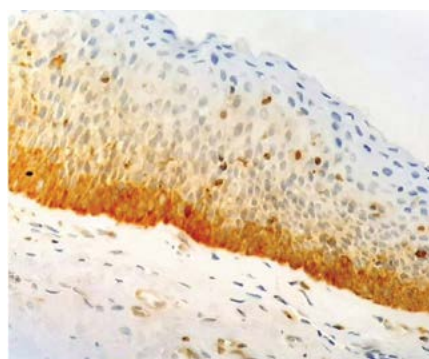


Рис. 9. Иммуногистохимическое исследование с антителами к bcl-2 при ХГЛ с дисплазией МПЭ тяжелой степени. Контрокраска: гематоксилин Майера, увеличение объектив ×40
Fig. 9. Immunohistochemical study with antibodies to bcl-2 in CHL with high grade SSE dysplasia. Counterstain: Mayer's hematoxylin, magnification ×40 lens

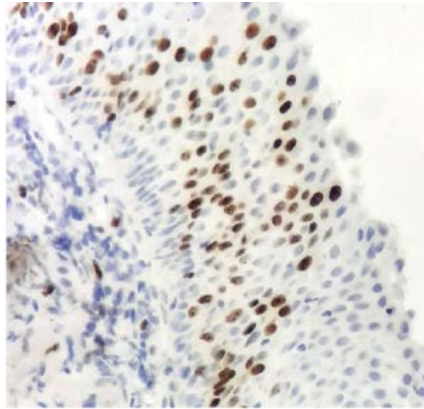


Рис. 10. Иммуногистохимическое исследование с антителами к Ki-67 при ХГЛ с дисплазией МПЭ тяжелой степени. Контрокраска: гематоксилин Майера, увеличение объектив $\times 40$
Fig. 10. Immunohistochemical study with antibodies to Ki-67 in CHL with high grade SSE dysplasia. Counterstain: Mayer's hematoxylin, magnification objective $\times 40$

Было проведено сравнение экспрессии p53, bcl-2 и Ki-67 в группах с разной степенью дисплазии.

По числу случаев с экспрессией p53 в ядрах эпителиальных клеток (23% – в группе с легкой степенью дисплазии, 81% – в группе с тяжелой степенью) исследуемые группы различались статистически значимо ($p=0,005$). По числу случаев экспрессии bcl-2 (13% – в 1-й группе и 76% – во 2-й) исследуемые группы также различались статистически значимо ($p=0,001$). По числу случаев с экспрессией Ki-67 в ядрах эпителиальных клеток (30% и 57% соответственно) статистически значимых различий выявлено не было ($p=0,19$).

Медиана времени наблюдения за пациентами составила 29,6 месяца (от 4,4 до 41,7 месяца). На 01.09.2022 в группе пациентов с ХГЛ с дисплазией МПЭ легкой степени выявлен 1 (3%) случай рака гортани, в то время как среди пациентов с дисплазией тяжелой степени число случаев рака гортани составило 10 из 21 (48%) ($p<0,001$), что свидетельствует о высоком потенциале малигнизации дисплазии МПЭ тяжелой степени.

Далее нами была проанализирована взаимосвязь наличия экспрессии p53, bcl-2 и Ki-67 с малигнизацией процесса (см. таблицу). Для сравнения: в таблице аналогично названным показателям представлен показатель тяжести дисплазии.

Как следует из данных, представленных в таблице, с последующей малигнизацией процесса при отсутствии адекватного лечения ХГЛ связаны все исследуемые ИГХ-маркеры. Так, среди пациентов с наличием в биопсийном материале экспрессии p53 рак гортани развился в 37,5% случаев, в то время как при отсутствии экспрессии – в 7% ($p=0,015$). При наличии экспрессии bcl-2 злокачественная трансформация была установлена в 40% случаев, при отсутствии – в 10% случаев ($p=0,015$). У пациентов с наличием гиперэкспрессии Ki-67 рак гортани выявлен на 20% (33% против 13%) случаев чаще в сравнении с пациентами, у которых гиперэкспрессия Ki-67 отсутствовала, однако различия не достигли статистической значимости ($p=0,16$). Здесь следует

Взаимосвязь иммуногистохимических показателей с малигнизацией процесса у пациентов с ХГЛ
The relationship of immunohistochemical parameters with malignancy of the process in patients with CHL

Показатель	Количество пациентов			Р-уровень*
	Всего, абс.	Малигнизация, абс. (%)	Отсутствие малигнизации, абс. (%)	
Экспрессия p53: наличие отсутствие	24 27	9 (37,5) 2 (7)	15 (62,5) 25 (93)	0,015
Экспрессия bcl-2: наличие отсутствие	20 31	8 (40) 3 (10)	12 (60) 28 (90)	0,015
Экспрессия Ki-67: наличие отсутствие	21 30	7 (33) 4 (13)	14 (67) 26 (87)	0,16
Дисплазия легкой степени Дисплазия тяжелой степени	21 30	10 (48) 1 (3)	21 (52) 29 (97)	<0,001

Примечание: * уровень значимости рассчитан по точному критерию Фишера.

отметить, что, как показано в таблице, частота малигнизации наиболее связана со степенью дисплазии МПЭ. Практически у половины (48%) пациентов с дисплазией тяжелой степени впоследствии, при медиане времени наблюдения 29,6 месяца, был обнаружен рак гортани, в то время как из 30 пациентов с дисплазией легкой степени озлокачествление было диагностировано только у 1 (3%) ($p<0,001$). Таким образом, можно сделать вывод о том, что степень дисплазии для пациентов с ХГЛ является наиболее значимым показателем в прогнозе малигнизации процесса. Иммуногистохимическое исследование для определения принадлежности пациента с ХГЛ к группе высокого риска малигнизации целесообразно проводить в случаях затруднения определения степени дисплазии.

■ **ВЫВОДЫ**

1. При проведении иммуногистохимического исследования в группе пациентов с ХГЛ с дисплазией МПЭ легкой степени экспрессия p53 в ядрах эпителиальных клеток была выявлена в 7 (23%) случаях из 30, в группе с дисплазией тяжелой степени – в 17 (81%) из 21 случая ($p=0,005$). В группе пациентов с дисплазией МПЭ легкой степени число случаев экспрессии bcl-2 составило 13%, с дисплазией тяжелой степени – 76% случаев ($p<0,001$). По числу случаев экспрессии Ki-67 в ядрах эпителиальных клеток групп с дисплазией МПЭ легкой и тяжелой степени (30% и 57% случаев соответственно) уровень статистической значимости не достиг порогового значения ($p=0,16$).
2. На 01.09.2022 при медиане времени наблюдения за пациентами 29,6 месяца в группе пациентов с ХГЛ с дисплазией МПЭ легкой степени отмечен 1 (3%) случай развития рака гортани, в то время как среди пациентов с дисплазией тяжелой степени число случаев рака гортани составило 10 из 21 (48%).
3. У пациентов с наличием экспрессии p53 рак гортани развился в 37,5% случаев, экспрессии bcl-2 – в 40% случаев, Ki-67 – в 33% случаев. В случаях затруднения точного определения степени дисплазии МПЭ рекомендуется проводить дополнительно ИГХ-исследование с вышеперечисленными маркерами для определения принадлежности пациента с ХГЛ к группе высокого риска малигнизации.



■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. American Cancer Society. *Key statistics about laryngeal and hypopharyngeal cancers, 2018*. Available at: <https://www.cancer.org/cancer/laryngeal-and-hypopharyngeal-cancer/about/key-statistics.html> (accessed 28 October 2022).
2. Kolyadich Zh.V. Dynamics of the incidence of laryngeal cancer in the Republic of Belarus in 2000–2019. *Otorhinolaryngology. Eastern Europe*. 2019;10(3):245–257. doi: 10.34883/Pl.2020.10.3.048. (in Russian)
3. Tatchikhin V.V., Shlyaga I.D., Medvedeva E.P. *Cancer of the larynx, laryngopharynx, root of the tongue*. Gomel: GomGMU. 2008. (in Russian)
4. Obid R., Redlich M., Tomeh C. The Treatment of Laryngeal Cancer. *Oral and maxillofacial surgery clinics of North America*. 2019;31(1):1–11. doi: 10.1016/j.coms.2018.09.001
5. Okeanov A.E. *Statistics of oncological diseases in the Republic of Belarus (2011–2019)*. Minsk: N.N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus; 2022. (in Russian)
6. Kozhanov A.L. Current aspects of treatment and rehabilitation of patients with pharyngeal cancer. *Head and Neck Tumors (HNT)*. 2016;6(2):17–25. Available at: <https://doi.org/10.17650/2222-1468-2016-6-2-17-25>. (in Russian)
7. Hashim D., Genden E., Posner M., Hashibe M., Boffetta P. Head and neck cancer prevention: from primary prevention to impact of clinicians on reducing burden. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2019;30(5):744–756. doi: 10.1093/annonc/mdz084
8. Gorban N.A., Popuchiev V.V., Baryshev V.V. Prognostic criteria for the course of squamous cell carcinoma of the larynx (a review of literature). *Head and Neck Tumors (HNT)*. 2013;1:33–38. Available at: <https://doi.org/10.17650/2222-1468-2013-0-1-33-38>. (in Russian)
9. Ministry of Health of the Republic of Belarus. *Algorithms for the diagnosis and treatment of malignant neoplasms: a clinical protocol*. Minsk: Ministry of Health of the Republic of Belarus; 2019. (in Russian)
10. El-Naggar A.K., Chan J.K.C., Takata T., Grandis J.R., Slootweg P.J. The fourth edition of the head and neck World Health Organization blue book: editors' perspectives. *Hum Pathol*. 2017;66:10–12. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2017.05.014>
11. Fletcher Christopher D.M. *Diagnostic Histopathology of Tumors. Fourth edition Fourth ed.* Saunders: Elsevier; 2013.
12. Lang T.A. *How to describe statistics in medicine. Annotated guide for authors, editors and reviewers. Translate from English*. Moscow: Practical Medicine; 2011. (in Russian)