

Прогностические критерии течения плоскоклеточного рака гортани (обзор литературы)

Н.А. Горбань, В.В. Попучиев, В.В. Барышев

ФГБУ «Медицинский радиологический научный центр» Минздрава России, Обнинск

Контакты: Владимир Викторович Барышев baryshev@mrrc.obninsk.ru

В обзоре дана оценка использования наиболее распространенных молекулярно-биологических маркеров для прогноза течения плоскоклеточного рака гортани.

В качестве критериев предлагается использовать маркеры Ki-67 и p53, а также учитывать особенности ангиоархитектоники опухоли.

Ключевые слова: плоскоклеточный рак гортани, прогноз, Ki-67, p53, ангиоархитектоника

Prognostic criteria for the course of squamous cell carcinoma of the larynx (a review of literature)

N.A. Gorban, V.V. Popuchiev, V.V. Baryshev

Medical Radiology Research Center, Ministry of Health of Russia, Obninsk

The review evaluates the use of the most common molecular biological markers to predict the course of squamous cell carcinoma of the larynx. It is proposed to use the markers Ki-67 and p53 as criteria and to take into account the specific features of the angioarchitectonics of a tumor.

Key words: squamous cell carcinoma of the larynx, prognosis, Ki-67, p53, angioarchitectonics

Рак гортани (РГ) составляет 4–6 % злокачественных опухолей человека и имеет тенденцию к росту, что нередко связано с бессимптомным течением и обуславливает неудовлетворительные отдаленные результаты лечения [7].

Важная роль в развитии РГ отводится вирусной теории, поскольку 20–50 % опухолей головы и шеи ассоциировано с вирусами папилломы человека и Эпштейна–Барр с последующим развитием злокачественного процесса до 20 % случаев [1, 56, 59, 61].

В настоящее время активно исследуются различные молекулярно-биологические тканевые маркеры, большинство из которых характеризует определенные биологические особенности опухоли, специфику ее «поведения» и регуляции. Количество изучаемых потенциальных молекулярных маркеров увеличивается лавинообразно. В их число входят онкогены, протоонкогены, онкобелки, различные факторы роста и их рецепторы, супрессорные гены и продукты их экспрессии, протеазы, участвующие в прогрессировании опухолевого процесса [15, 62].

Среди большого многообразия известных в настоящее время маркеров опухолевого роста, наиболее доступных для практического анализа с помощью иммуногистохимического метода, условно можно выделить 3 группы маркеров: пролиферации опухолевых клеток, регуляции клеточного цикла и ангиогенеза.

Однако результаты исследований носят достаточно противоречивый характер, поэтому представляется логичным, что комплексное использование клинических данных и молекулярно-биологических признаков с большей вероятностью будет способствовать определению индивидуального прогноза у онкологических больных вообще и при плоскоклеточном РГ в частности.

Цель обзора — определить клинико-морфологическое значение наиболее распространенных молекулярно-биологических маркеров прогноза и течения плоскоклеточного РГ.

Клиническое значение иммуногистохимических и молекулярно-биологических маркеров при плоскоклеточном раке гортани

В настоящее время имеется значительное количество работ, посвященных исследованию пролиферативной активности опухолей, уровней p53, bcl-2, циклина D1, ангиогенеза в опухолях различной локализации и гистогенеза, в том числе при плоскоклеточном РГ.

Ki-67. В большинстве публикаций показано, что высокий уровень пролиферации опухоли является независимым прогностическим маркером и свидетельствует о неблагоприятном прогнозе [29, 38]. Реже авторы не находят прогностического значения этого показателя [47]. В некоторых работах отмечена четкая

связь между высоким уровнем Ki-67 и степенью местного распространения опухоли в гортани (Т-стадий) [1, 29, 31], однако в других работах такая связь не выявляется [47]. Высокий уровень Ki-67, по данным ряда исследователей [1, 29], является фактором, указывающим на наличие метастазов в регионарных лимфатических узлах (ЛУ), а в большинстве работ выявлена статистически достоверная связь между высоким уровнем Ki-67 и наличием метастазов. В отдельных исследованиях при высоком уровне Ki-67 отмечают длительный период до выявления метастазов, что объясняют выраженным ответом опухоли на терапию [2, 4]. В других исследованиях связь между уровнем Ki-67 и мета-статическим потенциалом опухоли не обнаружена [31].

Многие исследователи выявляют корреляцию между уровнем Ki-67 и степенью дифференцировки опухоли [29, 31, 38]. В единичных работах связь между ними не обнаружена [1].

Ряд авторов сходит к мнению, что высокий уровень Ki-67 связан с коротким периодом общей и безрецидивной выживаемости [29, 38]. С. Sittel et al. [44] показали, что при РГ Т1- и Т2-стадии высокий уровень Ki-67 в опухоли коррелирует с коротким безрецидивным периодом. Поскольку экспрессия Ki-67 значительно выше у пациентов с неблагоприятным исходом болезни, то сделан вывод о возможности использования маркера как одного из критериев для корректировки планируемого лечения [44].

Значительная корреляция обнаружена между уровнем Ki-67 и рецидивом заболевания, причем наиболее важным прогностическим показателем рецидива считают уровень Ki-67 более 21 %. У пациентов с уровнем Ki-67 более 21 % рецидив возникал в среднем через 27 мес, менее 21 % – через 105 мес [30]. Эти данные согласуются с результатами исследования, где показано, что наличие метастазов в ЛУ и уровень Ki-67 более 20 % являются значимыми прогностическими факторами рецидива [27]. Время жизни пациентов с уровнем Ki-67 более 30 % значительно ниже, чем с уровнем менее 30 % [23].

В отдельных работах выявлена связь между уровнем Ki-67 и радиочувствительностью опухоли. Эти данные рекомендуют учитывать при выборе тактики лечения [18, 33]. Так, Т. Kanijo et al. [18] указывают, что уровень Ki-67, превышающий 40 %, влияет на радиочувствительность опухоли у пациентов при Т1- и Т2-стадиях, а А. Kropveld et al. [25] связывают высокий уровень Ki-67 с благоприятным ответом на лучевую терапию (ЛТ).

М. Motamed et al. [33] полагают, что Ki-67 может быть надежным маркером радиорезистентности РГ.

Циклин D1. Ряд авторов [16, 31] отмечает корреляцию между уровнем Ki-67 и экспрессией циклина D1 при плоскоклеточном РГ. Амплификация циклина D1 при плоскоклеточном РГ наблюдается в 1/3 случаев [34]. Экспрессия

циклина D1, по данным разных авторов, наблюдается от 30 до 75 % случаев РГ [16, 26, 32, 55]. Большинство исследователей считают экспрессию циклина D1 маркером агрессивного течения опухоли и предлагают учитывать эти данные для оптимизации схем лечения [3, 26, 50].

Корреляция экспрессии циклина D1 с местно-распространенной (Т3–4) стадией отмечается в научных исследованиях Т. Krecicki et al. [24] и А. Ziolkowski et al. [55]. По данным других авторов [16, 31, 32, 39, 41, 49], связи между экспрессией циклина D1 и выживаемостью (общей и безрецидивной), метастазами в регионарные ЛУ нет. В одной из работ [53] авторы проанализировали 60 случаев локализованного РГ (Т1–2/Н0), леченных только ЛТ. Экспрессию циклина оценивали по 4-балльной шкале, позитивной реакцией считали только 2 и 3 балла (умеренное и выраженное окрашивание). Уровень циклина D1 коррелировал с уровнем PCNA, а низкий уровень циклина коррелировал с локальным рецидивом. Эти данные показали, что низкий уровень циклина D1 коррелирует с относительной радиорезистентностью РГ на ранних стадиях [53].

Результаты наших исследований свидетельствуют, что высокий уровень пролиферации опухолевых клеток является фактором высокого риска наличия метастазов в регионарных ЛУ и развития рецидива заболевания после комбинированного лечения плоскоклеточного РГ. Уровень экспрессии Ki-67 в ядрах более 55 % опухолевых клеток связан с низкими показателями безрецидивной выживаемости и наличием пораженных метастазами регионарных ЛУ. Экспрессия циклина D1 наблюдается в 28,1 % случаев и связана с низкой специфической выживаемостью [58].

p53. В канцерогенезе РГ играет роль регуляторный белок p53. Мутация гена p53 выявляется у 42 % больных РГ [60], а сверхэкспрессия белка p53 обнаруживается, по данным разных авторов, от 36 до 68 % случаев [4, 47, 49]. Если точка зрения о важности регуляторного белка p53 для канцерогенеза считается общепринятой, то единое мнение о его клиническом и прогностическом значении отсутствует.

Многие исследователи [31, 39, 41] не находят связи между экспрессией p53 и клинко-морфологическими параметрами при РГ. В то же время другие авторы [13, 49] считают, что p53 может быть использован как прогностический маркер при плоскоклеточном РГ, который связан с короткой выживаемостью. Некоторые авторы обнаруживают корреляцию между экспрессией p53 и степенью дифференцировки опухоли, а также уровнем Ki-67 [38].

В. Khademi et al. [19] обнаружили корреляцию между экспрессией p53 и вовлечением ЛУ в метастатический процесс. В то же время R.P. Takes et al. [45] не находят связи между экспрессией p53 и метастазами в регионарные ЛУ. R.R. Vielba et al. [49] отмечают уменьшение безрецидивного периода и времени выживаемо-

сти при p53-позитивном плоскоклеточном раке. Авторы разделили пациентов на 2 группы: в 1-ю группу входили пациенты, в опухолях которых более 5 % клеток экспрессировали p53, во 2-ю — где экспрессия была менее 5 %, и рекомендовали выделять среди пациентов со сходной локализацией, клинической стадией, степенью дифференцировки опухоли группу пациентов с экспрессией p53 для более агрессивной терапии.

Результаты наших исследований показали, что экспрессия белка p53 наблюдается в 56,3 % случаев РГ. Наличие экспрессии p53 опухолевыми клетками является неблагоприятным прогностическим признаком, свидетельствующим о высокой вероятности развития рецидива заболевания и коротком безрецидивном периоде.

Коэкспрессия p53 и уровня Ki-67 более 55 % наблюдается в 34,4 % случаев и является фактором неблагоприятного прогноза, связанного с наличием метастазов в регионарных ЛУ, развитием рецидива заболевания, низкой специфической и безрецидивной выживаемостью [58].

bcl-2. Экспрессия bcl-2 наблюдается от 14 до 53 % РГ [12, 55]. Данные разных авторов относительно прогностического значения bcl-2 противоречивы, так, одни считают, что bcl-2 не имеет прогностического и клинического значения [13, 20, 37, 52], другие находят связь с худшим прогнозом и радиорезистентностью опухоли, коротким периодом выживаемости [11, 12], третьи считают его фактором благоприятного прогноза, лучшей выживаемости [13]. Некоторые авторы отмечают, что уровень экспрессии bcl-2 выше в p53-позитивных опухолях, а коэкспрессия этих маркеров является независимым прогностическим фактором, свидетельствующим о плохом прогнозе и короткой выживаемости [17]. В одной из работ [10] авторы пришли к противоположным выводам, что отсутствие экспрессии p53 и bcl-2 является плохим прогностическим признаком, и пациенты с таким иммунотипом имели худшую выживаемость. Многие авторы находят связь между bcl-2 и степенью дифференцировки опухоли [5, 48]. P. Nix et al. [35] связывают экспрессию bcl-2 с радиорезистентностью опухоли у пациентов с T1–2/N0 (71 %), и считают, что этот маркер может быть использован для выбора тактики лечения — органосохранного оперативного лечения как альтернативы ЛТ. T. Ogawa et al. [36] обнаруживают строгую связь p53 и bcl-2 с рецидивами плоскоклеточного РГ после ЛТ, но считают, что нельзя точно предсказать течение опухолевого процесса по биопсийному материалу до лечения. D.K. Trask et al. [48] выявили высокую экспрессию bcl-2 только в 15 % случаев, без достоверной связи с ответом на ЛТ при плоскоклеточном РГ. В то же время L.T. Condon et al. [8] указывают на статистически значимую связь между радиорезистентностью опухоли и высокой экспрессией bcl-2. Данные наших исследований показали, что экспрессия раковыми клетками bcl-2 обнаружена в 29,7 % случаев и является фактором благоприятного прогноза, связанным с высокой специфической выживаемостью [58].

Ангиогенез. Как было указано выше, ген p53 влияет на опухолевый ангиогенез через регуляцию фактора роста эндотелия сосудов (VEGF). W. Cheng et al. [6] обнаруживают положительную корреляцию между VEGF и p53. По их данным, микрососудистая плотность (МСП), определяемая с помощью CD34, у пациентов с p53- и VEGF-позитивными опухолями значительно выше в группе больных с наличием метастазов в регионарных ЛУ, чем без метастазов. Некоторые авторы [14] считают, что ангиогенез может быть использован как прогностический показатель при РГ. J. Li et al. [28] проанализировали МСП, определенную с помощью CD31, в опухолях 59 пациентов с плоскоклеточным РГ и выявили связь между МСП и наличием метастазов в регионарных ЛУ, а также с общей выживаемостью. L. Zhang et al. [54] считают МСП прогностически значимым показателем. Учеными выявлено, что МСП значительно выше в опухолях пациентов с наличием метастазов, чем без метастазов, в опухолевой ткани по сравнению с прилежащей окружающей тканью, однако не выявили различия МСП в опухолях различной степени дифференцировки. В ряде работ [30, 54] авторы обнаруживают четкую связь между интенсивностью ангиогенеза и наличием метастазов, худшим клиническим исходом при высоком уровне МСП [13] и низкой радиочувствительностью опухоли. По данным T.N. Teknos и et al. [46], МСП, определяемая с помощью антител к фактору Виллебранда (FVIII), значительно ниже в опухолях с частичным или полным (уменьшение опухоли более чем на 50 %) ответом на химиолучевую терапию (20,9 в поле зрения), чем без ответа на терапию (32,99 в поле зрения). Выживаемость также зависит от МСП, прогноз хуже при высоких значениях МСП [46]. Только некоторые авторы [22, 47] не обнаруживают связи между интенсивностью ангиогенеза, в частности МСП, с клинико-морфологическими параметрами.

По нашим данным, степень васкуляризации и варианты строения кровеносного русла влияют на вероятность развития рецидива заболевания, на специфическую и безрецидивную выживаемость. Высокий уровень васкуляризации опухоли и разветвленный тип строения кровеносных сосудов являются благоприятными прогностическими признаками. Показатели МСП (менее 17) и суммарного периметра сосудистой стенки (менее 779 μm) связаны с высоким риском развития рецидива заболевания, а также низкой специфической и безрецидивной выживаемостью. Суммарная площадь сосудов на биологическое и клиническое поведение опухоли, а, следовательно, и прогноз заболевания, не влияет [57].

Таким образом, идеальный прогностический фактор должен предусматривать информацию о биологическом поведении опухоли, позволяющую надежно предсказать исход заболевания или ответ на проводимую терапию. Прогностический тест должен быть

легко выполнимым и достаточно дешевым, чтобы быть рутинным исследованием. В настоящее время для плоскоклеточного РГ таких маркеров, удовлетворяющих всем этим требованиям, пока нет.

Морфологические изменения «неопухолевого» покровного эпителия при плоскоклеточном раке гортани

В классификации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) [51] выделены 5 категорий гиперпластических изменений эпителия гортани: плоскоклеточная гиперплазия, слабая дисплазия, умеренная дисплазия, тяжелая дисплазия и карцинома *in situ*. Плоскоклеточная гиперплазия относится к доброкачественным поражениям гортани и характеризуется увеличенным количеством клеточных слоев преимущественно базально-парабазального, возможно с наличием акантоза, отсутствием признаков клеточной атипии. Группа дисплазий и карциномы *in situ* относится к потенциально злокачественным процессам и характеризуется клеточной атипией разной степени выраженности. Так, при слабой дисплазии атипичные клетки располагаются только до трети эпителиального пласта, при умеренной — до 2/3, а при тяжелой — клеточная атипия занимает более 2/3 эпителиального пласта. Карцинома *in situ* характеризуется поражением всего эпителиального пласта, выраженной клеточной атипией, наличием фигур митоза.

С классификацией ВОЗ перекликается Люблянская классификация эпителиальных гиперпластических поражений гортани [9], в которой выделены 4 категории: простая гиперплазия, базально-парабазальноклеточная (аномальная) гиперплазия, атипичная гиперплазия, карцинома *in situ*. Категория атипичной гиперплазии объединила в себе умеренную и тяжелую дисплазию по классификации ВОЗ.

Результаты клинического наблюдения подтвердили новое классификационное разделение эпителиальных гиперпластических поражений гортани на 2 группы: доброкачественные изменения (простая гиперплазия, базально-парабазальноклеточная гиперплазия), сопровождающиеся малигнизацией у 0,9 % больных, и потенциально злокачественные (атипичная гиперплазия и карцинома *in situ*), подвергающиеся малигнизации у 11,0 % пациентов [51].

В работе S. Sengiz et al. [42] проведена сравнительная характеристика классификаций ВОЗ и Люблянской по экспрессии Ki-67 и p53. В категориях ВОЗ уровень экспрессии Ki-67 различался между слабой и умеренной дисплазией, умеренной и тяжелой, а также умеренной дисплазией и карциномой *in situ*, однако между категориями тяжелой дисплазии и карциномы *in situ* различия не обнаружены. Экспрессия p53 различалась в различных категориях, однако между слабой и умеренной дисплазией, а также между тяжелой дис-

плазией и карциномой *in situ* различия не достоверны. Таким образом, возникают сложности в разграничении категорий тяжелая дисплазия — карцинома *in situ*. При работе с этими маркерами по Люблянской классификации также плохо поддаются разграничению категории атипичная гиперплазия и карцинома *in situ*. Это нашло отражение в работах других ученых [43], которые также показывают возникающие сложности в разграничении различных степеней дисплазии при предраковых поражениях гортани. Так, при диагностике LINI и LINII наблюдается до 31 % ошибок.

Сверхэкспрессия p53 выявляется еще в прединвазивных стадиях роста опухоли. Так, B. Kleist et al. [21] показали, что очень выражены различия между экспрессией p53 при простой гиперплазии по Люблянской классификации и аномальной гиперплазии. Имеются данные о значении мутации p53 на ранних стадиях канцерогенеза легкого. При дисплазии мутации p53 выявляются в 12–53 % случаев, а при карциноме *in situ* — в 60–90 %. Обнаружение экспрессии p53 более чем в 20 % клеток в очагах дисплазии является маркером необратимых предраковых изменений. При исследовании папиллом гортани коэкспрессия bcl-2 и Ki-67 может играть роль в неконтролируемой пролиферации и помогает выявить предраковые поражения гортани [40].

Представляется целесообразным обратить внимание на процесс опухолевой трансформации покровного эпителия гортани. Большинство исследователей считают p53 и Ki-67 значимыми маркерами злокачественной трансформации покровного многослойного плоского эпителия гортани, однако ни в одной работе мы не нашли четких критериев оценки этих маркеров. Что касается циклина D1 и bcl-2, то существуют отдельные работы, посвященные исследованию этих маркеров в нормальном и гиперпластическом покровном эпителии гортани, а также значению их для диспластических изменений.

Заключение

Таким образом, анализ литературы и результатов собственных исследований свидетельствует, что плоскоклеточный РГ представляет собой разнородную группу опухолей с разным биологическим и клиническим поведением. Для прогностических целей при плоскоклеточном РГ рекомендуется использовать иммуногистохимические маркеры Ki-67 и p53, а также учитывать особенности ангиоархитектоники опухоли. Высокая пролиферативная активность опухолевых клеток является показателем биологической агрессивности плоскоклеточного РГ — в наших исследованиях уровень экспрессии Ki-67 более 55 % и наличие экспрессии циклина D1 коррелировали с низкой специфической и безрецидивной выживаемостью, развитием рецидива заболевания и наличием метастазов в регионарных ЛУ.

Одним из важных морфологических признаков, свидетельствующих об агрессивности РГ, является экспрессия p53. По нашим данным, позитивная реакция с p53 выявлялась в 56,3 % опухолей. Наличие экспрессии p53 в ядрах опухолевых клеток плоскоклеточного РГ свидетельствовало о высоком риске развития рецидива заболевания, коротком безрецидивном периоде и низкой безрецидивной 5-летней выживаемости.

Особенности ангиоархитектоники в опухоли влияли на клиническое поведение РГ. Значительно васкуляризированные опухоли с высокими значениями МСП и суммарного периметра сосудистой стенки

(СПСС) продемонстрировали более спокойное клиническое поведение, чем опухоли с низкой МСП и небольшим СПСС. Экспрессия p53 и высокий уровень Ki-67 являются маркерами необратимой опухолевой трансформации эпителиальных клеток многослойного плоского эпителия гортани. Экспрессия Ki-67 в ядрах эпителиальных клеток, расположенных на уровне 2/3 эпителиального пласта и выше, наличие экспрессии p53 отражают развитие тяжелой дисплазии и карциномы *in situ* покровного эпителия гортани и могут быть использованы для дифференциальной диагностики предраковых и доброкачественных гиперпластических процессов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Acikalin M.F., Oner U., Tel N. et al. Prognostic significance of Ki-67 expression for patients with laryngeal squamous cell carcinoma primarily treated by total laryngectomy. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2004;261(7):376–80.
2. Alicikus Z.A., Akman F., Ataman O.U. et al. Importance of patient, tumour and treatment related factors on quality of life in head and neck cancer patients after definitive treatment. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2009 Sep;266(9):1461–8. Epub 2008 Dec 19.
3. Arisi E., Pruneri G., Carboni N. et al. Prognostic significance of P27 and cyclin D1 co-expression in laryngeal squamous cell carcinoma: possible target for novel therapeutic strategies. *J Chemother* 2004;16(5):3–6.
4. Ataman O.U., Bentzen S.M., Wilson G.D. et al. Molecular biomarkers and site of first recurrence after radiotherapy for head and neck cancer. *Eur J Cancer* 2004;40(18):2734–41.
5. Chen G.G., Vlantis A.C., Chak E.C. et al. The expression of Bcl-2 family proteins and spontaneous apoptosis in laryngeal carcinomas. *Oncol Res* 2006;16(6):273–80.
6. Cheng W., Li X., Quan C., Guo X. Role of P53, nm23 proteins and vascular endothelial growth factor in angiogenesis and metastasis of laryngeal cancer. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* 2000;35(2):147–9.
7. Ciardiello F., Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med* 2008;358(11):1160–74.
8. Condon L.T., Ashman J.N., Ell S.R. et al. Overexpression of Bcl-2 in squamous cell carcinoma of the larynx: a marker of radioresistance. *Int J Cancer* 2002;100(4):472–5.
9. Gale N., Kambic V., Michaels L. et al. The Ljubljana classification: a practical strategy for the diagnosis of laryngeal precancerous lesions. *Adv Anat Pathol* 2000 Jul;7(4):240–51.
10. Georgiou A., Gomatos I.P., Ferekidis E. et al. Prognostic significance of p53, bax and bcl-2 gene expression in patients with laryngeal carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 2001;27(6):574–80.
11. Georgiou A., Gomatos I.P., Pararas N.B. et al. Cell kinetics and apoptosis in laryngeal carcinoma patients. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2003;112(3):206–13.
12. Gomatos I.P., Georgiou A., Giotakis J. et al. The role of host immune response and apoptosis in patients with laryngeal squamous cell carcinoma. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2007;69(3):159–66.
13. Gryczyński M., Kobos J., Murlewska A., Pietruszewska W. Survival of patients with laryngeal cancer and some prognostic factors. *Otolaryngol Pol* 2003;57(3):329–40.
14. Gryczyński M., Kobos J., Niewiadomska H., Pietruszewska W. Assessment of cell proliferation antigen Ki-67, protein p53 related to apoptosis and angiogenesis in laryngeal cancer. *Otolaryngol Pol* 2000;54(31):191–5.
15. Guo T., Sun J.W., Lv Q.P., Li X.G. Allelic imbalance on chromosomes 3p, 9p and 17p in malignant progression of laryngeal mucosa. *J Laryngol Otol* 2008;122(1):72–7.
16. Ioachim E., Peschos D., Goussia A. et al. Expression patterns of cyclins D1, E in laryngeal epithelial lesions: correlation with other cell cycle regulators (p53, pRb, Ki-67 and PCNA) and clinicopathological features. *J Exp Clin Cancer Res* 2004;23(2):277–83.
17. Jäkel M.C., Sellmann L., Dorudian M.A. et al. Prognostic significance of p53/bcl-2 co-expression in patients with laryngeal squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 2000;110(8):1339–45.
18. Kanijo T., Yokose T., Hasebe T. et al. Potential role of microvessel density in predicting radiosensitivity of T1 and T2 stage laryngeal squamous cell carcinoma treated with radiotherapy. *Clin Cancer Res* 2000;6:3159–65.
19. Khademi B., Shirazi F. M., Vasei M. et al. The expression of p53, c-erbB-1 and c-erbB-2 molecules and their correlation with prognostic markers in patients with head and neck tumors. *Cancer Lett* 2002 Oct 28;184(2):223–30.
20. Klatka J. Prognostic value of the expression of p53 and bcl-2 in patients with laryngeal carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2001;258(10):537–41.
21. Kleist B., Junghans D., Lorenz G. et al. The supplementary diagnostic power of selection immunohistochemical, molecular genetic and infective parameters in epithelial hyperplastic laryngeal lesions. *Oncology* 2003;65:347–54.
22. Krecicki T., Dus D., Kozlak J. et al. Quantitative evaluation of angiogenesis in laryngeal cancer by digital image measurement of the vessel density. *Auris Nasus Larynx* 2002;29(3):271–6.
23. Krecicki T., Jeleń M., Zalesska-Krecicka M., Szkudlarek T. Ki-67 immunostaining and prognosis in laryngeal cancer. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 1998;23(6):539–42.
24. Krecicki T., Smigiel R., Fraczek M. et al. Studies of the cell cycle regulatory proteins P16, cyclin D1 and retinoblastoma protein in laryngeal carcinoma tissue. *J Laryngol Otol* 2004;118(9):676–80.
25. Kropveld A., Slootweg P.J., Blankenstein M.A. et al. Ki-67 and p53 in T2 laryngeal cancer. *Laryngoscope* 1998;108(10):1548–52.
26. Kumar R.V., Shenoy A.M., Daniel R., Shah K.V. Cyclin D1, p53, MIB1, intratumoral microvessel density, and human papillomavirus in advanced laryngeal carcinoma: association with nodal metastasis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;131(4):509–13.
27. Lazaris A.Ch., Rigopoulou A., Tseleni-Balafouta S. et al. Immunodetection and

- clinico-pathological correlates of two tumour growth regulators in laryngeal carcinoma. *Histol Histopathol* 2002;17(1):131–8.
28. Li J., Tang L., Ren Z., Pan Z. Distribution and prognostic significance of microvessel density in supraglottic laryngeal squamous cell carcinomas. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* 2004;18(9):513–5.
29. Liu M., Lawson G., Delos M. et al. Prognostic value of cell proliferation markers, tumour suppressor proteins and cell adhesion molecules in primary squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2003;260(1):28–34.
30. Lu Y.Y., Shen P., Ding W. Study on the relationship between microvascular density and prognosis in laryngeal cancer. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* 2000;14(12):538–9.
31. Mielcarek-Kuchta D., Olofsson J., Golusinski W. p53, Ki67 and cyclin D1 as prognosticators of lymph node metastases in laryngeal carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2003;260(10):549–54.
32. Morshed K., Skomra D., Korobowicz E. et al. An immunohistochemical study of cyclin D1 protein expression in laryngeal squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol* 2007;127(7):760–9.
33. Motamed M., Banerjee A.R., Bradley P.J., Powe D. MIB-1 and p53 expression in radiotherapy-resistant T1aN0M0 glottic squamous cell carcinoma. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 2001;26(3):227–30.
34. Nadal A., Cardesa A. Molecular biology of laryngeal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 2003;442(1):1–7.
35. Nix P., Cawkwell L., Patmore H. et al. Bcl-2 expression predicts radiotherapy failure in laryngeal cancer. *Br J Cancer* 2005;92(12):2185–9.
36. Ogawa T., Shiga K., Tateda M. et al. Protein expression of p53 and Bcl-2 has a strong correlation with radiation resistance of laryngeal squamous cell carcinoma but does not predict the radiation failure before treatment. *Oncol Rep* 2003;10(5):1461–6.
37. Ozdek A., Sarac S., Akyol M.U. et al. C-myc and bcl-2 expression in supraglottic squamous cell carcinoma of the larynx. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;131(1):77–83.
38. Pastuszewski W., Dziegiel P., Krecicki T. et al. Prognostic significance of metallothionein, p53 protein and Ki-67 antigen expression in laryngeal cancer. *Anticancer Res* 2007;27(1A):335–42.
39. Peschos D., Stefanou D., Vougiouklakis T. et al. Cell cycle proteins in laryngeal cancer: role in proliferation and prognosis. *J Exp Clin Cancer Res* 2005;24(3):431–7.
40. Rodrigo J.P., Garcia-Carracedo D., Garcia L.A., Menendez S. Distinctive clinicopathological associations of amplification of the cortactin gene at 11q13 in head and neck squamous cell carcinomas. *J Pathol* 2009;217(4):516–23.
41. Segal J.V., Lazaris A.C., Nikolopoulos T.P. et al. Cyclin D1 protein tissue detection in laryngeal cancer. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2005;67(6):319–25.
42. Sengiz S., Pabuccuoglu U., Sarioglu S. Immunohistological comparison of the World Health Organization (WHO) and Ljubljana classifications on the grading of preneoplastic lesions of the larynx. *Pathol Res Pract* 2004;200(3):181–8.
43. Serio G., Giardina C., Valente T. et al. Quantitative morphometrical investigation of basal cell layer in laryngeal premalignant lesions. *J Exp Clin Cancer Res* 2002;21(4):495–502.
44. Sittel C., Eckel H.E., Damm M. et al. Ki-67 (MIB1), p53, and Lewis-X (LeuM1) as prognostic factors of recurrence in T1 and T2 laryngeal carcinoma. *Laryngoscope* 2000;110(6):1012–7.
45. Takes R.P., Baatenburg De Jong R.J., Alles M.J. et al. Markers for nodal metastasis in head and neck squamous cell cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002;128(5):512–8.
46. Teknos T.N., Cox C., Barrios M.A. et al. Tumor angiogenesis as a predictive marker for organ preservation in patients with advanced laryngeal carcinoma. *Laryngoscope* 2002;112(5):844–51.
47. Teppo H., Soini Y., Melkko J. et al. Prognostic factors in laryngeal carcinoma: the role of apoptosis, p53, proliferation (Ki-67) and angiogenesis. *APMIS* 2003;111(4):451–7.
48. Trask D.K., Wolf G.T., Bradford C.R. et al. Expression of Bcl-2 family proteins in advanced laryngeal squamous cell carcinoma: correlation with response to chemotherapy and organ preservation. *Laryngoscope* 2002;112(4):638–44.
49. Vielba R., Bilbao J., Ispizua A. et al. p53 and cyclin D1 as prognostic factors in squamous cell carcinoma of the larynx. *Laryngoscope* 2003;113(1):167–72.
50. Volavsek M., Bracko M., Gale N. Distribution and prognostic significance of cell cycle proteins in squamous carcinoma of the larynx, hypopharynx and adjacent epithelial hyperplastic lesions. *J Laryngol Otol* 2003;117(4):286–93.
51. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics. Head and Neck Tumours. Barnes L., Eveson J.W., Reichart P., Sidranski D. Lyon.: IARC Press, 2005.
52. Yildirim S., Cermik H., Işitmengil T. et al. Significance of p53 and bcl-2 immunoexpression in the prognosis of laryngeal squamous cell carcinoma. *J Int Med Res* 2002;30(6):597–600.
53. Yoo S.S., Carter D., Turner B.C. et al. Prognostic significance of cyclin D1 protein levels in early-stage larynx cancer treated with primary radiation. *Int J Cancer* 2000;90(1):22–8.
54. Zhang L., Luan X., Pan X. et al. Measurement of microvessel density in laryngeal carcinoma and its clinical significance. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* 2001;15(3):115–7.
55. Ziolkowski A., Olszewski W.P., Gabriel A. et al. DNA ploidy, cyclin D1, bcl-2 and lymphocytic infiltration of the tumor microenvironment as prognostic factors in laryngeal cancer patients. *Pol J Pathol* 2005;56(4):171–8.
56. Барышев В.В., Андреев В.Г., Попучиев В.В. Современные аспекты изучения респираторного папилломатоза. Ч. 1. Этиология, патогенез, диагностика. Сибирский онкологический журнал 2009; 5(35):67–72.
57. Горбань Н.А. Тен В.П., Панкратов В.А. Ангиогенез в плоскоклеточном раке гортани и его прогностическое значение. Вопросы онкологии 2008;54(6):732–76.
58. Горбань Н.А., Тен В.П., Панкратов В.А. Экспрессия антигена Ki-67 и белка p53 как показателей агрессивности течения плоскоклеточного рака гортани. Вопросы онкологии 2007;53(1):668–73.
59. Лушников Е.Ф., Абросимов А.Ю. Гибель клетки (апоптоз). М.: Медицина, 2001. 190 с.
60. Ушаков В.С., Иванов С.В. Рак гортани: современные возможности и перспективы. Практическая онкология 2003;4(3):56–60.
61. Шилова О.Ю. Ассоциация рака гортани с вирусами папилломы человека и Эпштейна–Барр. Сибирский онкологический журнал 2007; Прил. 2. С. 126–27.
62. Шилова О.Ю., Уразова Л.Н. Молекулярно-генетические методы прогноза и течения рака гортани. Сибирский онкологический журнал 2010;5(41):64–70.