

# Вплив ларингофарингеального рефлюксу на імунне мікрооточення карцином гортані

Д.І. Заболотний<sup>1</sup>, В.В. Кізім<sup>1</sup>, Д.Д. Заболотна<sup>1</sup>, Я.В. Кізім<sup>1</sup>, О.М. Сулаєва<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ДУ «Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України», Київ; <sup>2</sup>Медична лабораторія CSD, Київ; e-mail: o.sulaieva@csd.com.ua

*Метою нашого дослідження було оцінити зв'язок між наявністю ларингофарингеального рефлюксу (ЛФР) та кількістю Т-лімфоцитів при раку гортані (РГ). За результатами рН-моніторингування 87 пацієнтів з пухлинами гортані були сформовані групи, що включали: РГ без ЛФР (1-ша група), РГ на фоні ЛФР (2-га група), пацієнти з доброякісними новоутвореннями гортані на фоні ЛФР (3-тя група). Імунне мікрооточення пухлин оцінювали імуногістохімічно з підрахуванням числа Т-лімфоцитів (CD3<sup>+</sup>), Т-цитотоксичних клітин (CD8<sup>+</sup>) і Т-регуляторних клітин (Treg; FOXP3<sup>+</sup>) у межах пухлини, в перитуморозній стромі та в інтактних зонах. У пацієнтів з РГ на фоні ЛФР спостерігалася вища інтенсивність запальної інфільтрації пухлини. ЛФР асоціювався з розвитком хронічного запалення і визначав зміни складу імунного мікрооточення карцином гортані. При цьому не встановлено статистично значущих розбіжностей між кількістю CD3<sup>+</sup>- і CD8<sup>+</sup>-клітин у пухлинах пацієнтів 1-ї та 2-ї груп. Проте за умов ЛФР значно підвищувалася кількість Treg-клітин у межах пухлини та інтактній слизовій оболонці гортані, що може визначати посилення імунної толерантності й впливати на ефективність протипухлинного імунітету, створюючи передумови для прогресування РГ.*

*Ключові слова:* рак гортані; ларингофарингеальний рефлюкс; імунне мікрооточення пухлини; Т-лімфоцити; Т-регуляторні клітини.

## ВСТУП

Плоскоклітинні карциноми (ПКК) голови та шиї, включаючи рак гортані (РГ), за розповсюдженістю посідають шосте місце серед злоякісних новоутворень [1, 2]. Ключовими факторами ризику РГ є куріння, вживання алкоголю та інфікування онкогенними штамами вірусу папіломи людини (ВПЛ) [3, 4]. Крім того, обговорюється роль радіаційного опромінення, професійних хімічних чинників і ларингофарингеального рефлюксу (ЛФР) [5, 6]. Останній визначено серед найбільш поширених хронічних захворювань дорослих у багатьох розвинутих країнах світу [5]. Проте, незважаючи на численні дослідження, мало відомо про механізми впливу ЛФР на РГ. Рефлюкс асоційований зі зменшенням рН, зміною експресії карбоангідрази III і спричиняє розвиток

запалення, що може сприяти пухлинній трансформації та впливати на реалізацію протипухлинної імунної відповіді [2, 7, 8]. Ключовими клітинами протипухлинного імунітету є Т-цитотоксичні лімфоцити (CD8<sup>+</sup>) [9, 10]. Закономірно, що щільність інфільтрації пухлин CD8<sup>+</sup>-лімфоцитами, позитивно корелює з виживаністю хворих на РГ [8, 11]. Однак їх наявність не виключає можливість імуносупресії, що за умов метаболічного репрограмування може здійснюватися різними способами, в тому числі за рахунок активації Т-регуляторних лімфоцитів (Treg) [12–14]. Нині мало відомо про вплив ЛФР на параметри імунного мікрооточення та вираженість ПКК гортані CD8<sup>+</sup>- та Treg-клітинами.

Мета нашого дослідження – оцінити взаємозв'язок наявності ЛФР та показників імунного мікрооточення у ПКК гортані.

© Д.І. Заболотний, В.В. Кізім, Д.Д. Заболотна, Я.В. Кізім, О.М. Сулаєва

## МЕТОДИКА

Обстежено 87 пацієнтів (72 чоловіки та 15 жінок), які проходили лікування на базі онкологічної клініки ДУ «Інституту отоларингології ім. О.С. Коломійченка НАМН України». Всі вони підписали інформовану згоду на участь у обстеженні та публікацію результатів. Дизайн дослідження було схвалено комісією з біоетики ДУ «Інституту отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка» НАМН України.

Ендоларингоскопію проводили з використанням відеосистеми Stryker™ (США), фібрларингоскопію – Olympus™ CV 150 (Японія), устатковану фіброскопом і бронхоскопом. Об'єктивізацію оцінки ларингоскопічної картини і динамічне спостереження здійснювали за RFS-шкалою (The Reflux Finding Score). Для верифікації наявності та оцінки ступеня тяжкості ЛФР проводили добуву рН-метрію ацидогастрографом АГ-1 рН-М (Україна). Ступінь тяжкості рефлюксу визначали згідно з загальноприйнятими критеріями [6]. За результатами рН-моніторингу були сформовані групи обстежених по 10 хворих у кожній: 1-ша група – РГ без ЛФР; 2-га – РГ на фоні ЛФР; 3-тя – 10 пацієнти з доброякісними новоутвореннями гортані на фоні ЛФР.

Отриманий операційний матеріал фіксували у 10%-му розчині забуференого нейтрального формаліну. Обробку біоматеріалу здійснювали у автоматизованих гістопроекторах (Milestone LOGOS Microwave Hybrid Tissue Processor, «Milestone», Італія). Парафінові блоки виготовляли на заливочних станціях Thermo Scientific HistoStar («Thermo Fisher Scientific», США). Гістологічні зрізи товщиною 4 мкм – на напівавтоматизованому ротаційному мікротомі Thermo Scientific HM 340E. Патогістологічну оцінку пухлин проводили відповідно до Міжнародної гістологічної класифікації пухлин голови та шиї ВООЗ (2017). Визначали розмір і глибину інвазії пухлини, її гістологічний тип і ступінь

диференціювання (грейд). Для подальшого морфологічного дослідження відбирали ВПЛ-негативних пацієнтів 1-ї та 2-ї груп з ПКК гортані I-II стадії (T1-2N0M0).

Для оцінки інфільтрації ПКК гортані Т-лімфоцитами досліджували матеріал пухлини та інтактних ділянок слизової оболонки, не ураженою ПКК. Різні типи Т-клітин визначали імуногістохімічно з використанням антитіл до CD3 (загальний маркер Т-лімфоцитів; DAKO, поліклональні), CD8 (маркер Т-цитотоксичних лімфоцитів; DAKO, клон C8/144B), FOXP3 (маркер Treg; Abscam, клон 236A/E7). При цьому враховували кількість клітин у межах пухлинних гнізд та в перитуморозній стромі, а також в інтактних зонах. Щільності лімфоцитів визначали в 10 полях зору кожного зрізу, з наступним перерахунком на 1 мм<sup>2</sup>.

Статистичний аналіз результатів здійснювали за допомогою програмного пакета MedCalc (Бельгія). Нормальність розподілу оцінювали за допомогою тесту Шапіро–Уїлка. Результати представлені у форматі середнє ± стандартна похибка середнього значення (SEM) з 95%-м довірчим інтервалом. Для визначення ролі ЛФР на показники імунного мікрооточення проводили дисперсійний аналіз (ANOVA). Статистично значущими вважали розбіжності при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження матеріалу пацієнтів з РГ показало, що інтенсивність лімфогістіоцитарної інфільтрації була значно вищою у пацієнтів з супутнім ЛФР. У хворих 1-ї групи виявлено помірну кількість CD3<sup>+</sup>-клітин у поверхневих ділянках пухлини та концентрування Т-лімфоцитів у перитуморозній стромі навколо краю інвазії (рис. 1). Проте порівняння числа Т-лімфоцитів у ПКК пацієнтів 1-ї та 2-ї груп не визначило статистично значущих міжгрупових розбіжностей як щодо CD3<sup>+</sup>-клітин, так і CD8<sup>+</sup>-лімфоцитів (таблиця). В межах інтактної слизової оболонки кіль-

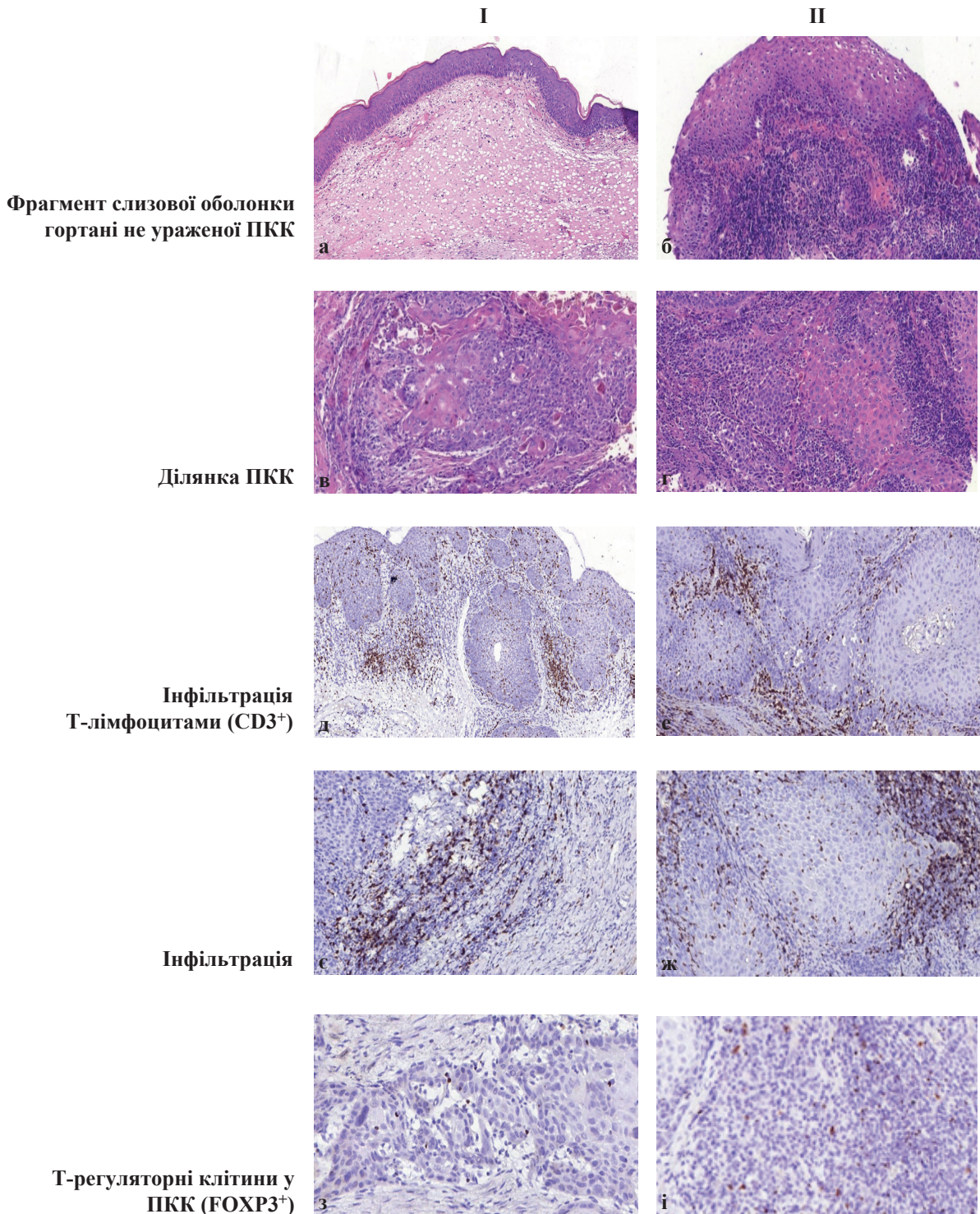


Рис. 1. Лімфогістіоцитарна інфільтрація та різні типи лімфоцитів у пацієнтів з раком гортані без рефлюксу (I); з раком гортані на фоні рефлюксу (II). Більша чисельність Тreg-клітин на фоні схожої кількості CD3<sup>+</sup>- і CD8<sup>+</sup>-лімфоцитів. На а–г – забарвлення гематоксилином та еозином, д–і – імуногістохімічне дослідження. Збільшення у 200 разів. ПКК – плоскоклітинна карцинома

кість Т-лімфоцитів була меншою, ніж у пухлинній стромі в обох групах. Число CD3<sup>+</sup>-клітин в інтактній сполучній тканині у хворих з супутнім ЛФР було вищим (P = 0,03) за показник в 1-й групі. Проте щільність CD8<sup>+</sup>-клітин у неуразених ПКК зонах слизової оболонки гортані у пацієнтів 2-ї групи виявилася статистично істотно

меншою порівняно зі значеннями у 1-й групі (P < 0,001). Це може бути пов'язано з участю інших субпопуляцій Т-лімфоцитів у формуванні запальної інфільтрації ПКК гортані на тлі ЛФР. Незважаючи на ознаки хронічного запалення, число CD3<sup>+</sup>- і CD8<sup>+</sup>-клітин у слизовій оболонці пацієнтів 3-ї групи було меншим, ніж у 1-й та 2-й. Ці розбіжності

**Порівняльна характеристика кількості лімфоцитів у складі пухлини та в межах інтактної слизової оболонки у пацієнтів різних груп**

Показник	Хворі на рак гортані		Пацієнти з ларингофарингеальним рефлюксом	Вірогідність розбіжностей
	без ларингофарингеального рефлюксу	на фоні ларингофарингеального рефлюксу		
<b>Кількість CD3<sup>+</sup> клітин (Т-лімфоцитів)</b>				
у межах пухлинних кластерів	375,0 ± 17,2 (340,02 – 410,0)	318,3 ± 21,6 (274,2 – 362,4)	–	P = 0,328
у пухлинній стромі	740,3 ± 41,0 (656,6 – 824,0)	625 ± 34,63 (554,4 – 695,5)	–	P = 0,617
у інтактному епітелії	217,8 ± 26,8 (161,7 – 273,9)	275,3 ± 16,5 (240,9 – 309,6)	115,1 ± 6,98 103,7 – 132,7	P <sub>1-2</sub> = 0,08 P <sub>3</sub> < 0,001
у інтактній сполучній тканині	250,3 ± 25,2 (197,5 – 303,0)	360,4 ± 27,5 (303,4 – 417,5)	168,7 ± 22,2 121,7 – 201,7	P = 0,03 P <sub>3</sub> < 0,001
<b>Кількість CD8<sup>+</sup> клітин (Т-цитотоксичних лімфоцитів)</b>				
у межах пухлинних кластерів	271,6 ± 17,4 (235,8 – 307,2)	229,1 ± 13,6 (201,3 – 257,0)	–	P = 0,483
у пухлинній стромі	365,7 ± 31,8 (300,5 – 430,7)	286,5 ± 24,5 (236,5 – 336,4)	–	P = 0,115
у інтактному епітелії	164,8 ± 13,9 (135,8 – 193,9)	72,6 ± 7,03 (57,8 – 87,5)	51,7 ± 6,05 38,5 – 64,9	P < 0,001
у інтактній сполучній тканині	194,9 ± 18,8 (155,4 – 234,5)	117,5 ± 14,9 (85,8 – 149,3)	93,1 ± 7,34 77,1 – 109,1	P < 0,001
<b>Кількість FOXP3<sup>+</sup>-клітин (Т-регуляторних клітин)</b>				
у межах пухлинних кластерів	28,9 ± 7,41 (13,4 – 44,3)	99 ± 15,8 (64,1 – 133,9)	–	P < 0,001
у пухлинній стромі	110,8 ± 11,0 (87,0 – 134,6)	296,3 ± 47,0 (193,9 – 398,8)	–	P < 0,001
у інтактному епітелії	11,6 ± 0,80 (9,9 – 13,4)	35,5 ± 2,51 (29,9 – 41,0)	10,8 ± 1,83 (6,81 – 14,8)	P < 0,001
у інтактній сполучній тканині	25,8 ± 1,56 (22,5 – 29,2)	237,9 ± 29,9 (171,9 – 303,9)	55,1 ± 8,19 37,7 – 72,5	P < 0,001

Примітка: результати в таблиці представлені у форматі M ± s.e.m. (95%-й довірчий інтервал).

можуть бути зумовлені наявністю в межах інфільтратів клітин вродженого імунітету або реакцією адаптивної ланки імунної системи слизової оболонки гортані пацієнтів цих груп на розвиток пухлинного процесу.

Специфічні зміни були виявлені щодо кількості Трег-клітин, яка була вищою за наявності ЛФР як у неуразеній карциномою слизовій оболонці гортані, так і в ПКК. У хворих 1-ї групи FOXP3<sup>+</sup>-клітини були нечисленними у пухлинних кластерах, проте у перитуморозній стромі їх кількість виявлялася майже втричі більшою. Слід відмітити переважання Трег-клітин у 2-й групі як у межах пухлинних кластерів ( $P = 0,02$ ), так і в пухлинній стромі ( $P < 0,001$ ) порівняно з пацієнтами без ЛФР. У сполучній тканині інтактною слизової оболонки їх щільність була значно меншою за таку в пухлинній стромі в 1-й групі, проте не відрізнялася статистично значуще у стромі ПКК гортані хворих 2-ї групи. При цьому в межах досліджуваної вибірки не встановлено вірогідних зав'язків між кількістю CD3<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>-, FOXP3<sup>+</sup>-клітин та віком, стадією, а також ступенем диференціювання пухлин. Цікаво, що в слизовій оболонці гортані пацієнтів 3-ї групи кількість Трег-лімфоцитів була меншою, ніж у 2-й групі ( $P < 0,001$ ), але значно перевищувала число FOXP3<sup>+</sup>-клітин в інтактній сполучній тканині пацієнтів 1-ї групи ( $P < 0,001$ ). Більше того, сумарна відносна частка FOXP3<sup>+</sup>-клітин щодо загального пулу Т-лімфоцитів (1:3) у хворих з ЛФР була суттєво вищою за таку у пацієнтів з ПКК без ЛФР (1:10). Такі зміни, з одного боку, можуть бути спричинені зниженням рН за умов рефлюксу та зміною імунного ландшафту слизової оболонки гортані спрямовані на обмеження запалення. З іншого боку, зростання кількості Трег-клітин на фоні хронічного запального процесу ймовірно сприяє пухлинній трансформації та малігнізації, впливаючи на розвиток і прогресування ПКК гортані.

Нині прогнозування перебігу РГ ґрун-

тується на аналізі клінічних даних та результатів патогістологічного дослідження, наявності таких факторів ризику, як куріння, інфікування ВПЛ, сполучення з ЛФР тощо [3, 5, 6]. При цьому до важливих з прогностичної точки зору патогістологічних параметрів відносяться: розмір пухлини, атипова клітинна морфологія, гістологічний тип карциноми, грейд, ознаки лімфоваскулярної інвазії, стадія пухлинного процесу. Система стадіювання (TNM-класифікація AJCC/UICC) враховує поширеність пухлини, та наявність метастазів у регіональних лімфатичних вузлах чи відділених органах і дає змогу прийняти оптимальне рішення щодо менеджменту пацієнтів на етапі діагностики [15]. Проте ця класифікація має певні обмеження щодо оцінки післяопераційного результату – дійсно, клінічний результат значно відрізняється у пацієнтів з однаковими параметрами пухлини (гістологічний тип, стадія тощо) [3, 16]. Попередні дослідження продемонстрували залежність прогнозу від наявності лімфоцитарної інфільтрації на тлі аутоімунного процесу [17]. Дані патогістологічних досліджень переконливо свідчать про те, що різні варіанти карцином гортані мають ознаки запальної інфільтрації, більшість ПКК тією чи іншою мірою інфільтровані лімфоцитами, макрофагами та іншими клітинами, включаючи пухлино-асоційовані фібробласти, нейтрофіли, Трег-клітини, мієлоїдні супресорні клітини, натуральні кілери, тромбоцити, тучні клітини тощо [11, 16, 18]. Ці субпопуляції клітин взаємодіють між собою, а також з пухлинними клітинами через складні комунікаційні мережі, що включають широкий спектр цитокінів, хемокінів, факторів росту і компонентів позаклітинного матриксу [8, 14]. Інфільтрація пухлини різними популяціями лімфоцитів є одним з найбільш інформативних прогностичних параметрів [2]. Оцінка числа CD3<sup>+</sup>- і CD8<sup>+</sup>-лімфоцитів лежить в основі дослідження імунного статусу пухлини при колоректальних карциномах, раку

шлунка, карциномах щитоподібної залози [9, 19]. Крім того, деякі автори показали інформативність дослідження CD45<sup>+</sup>-клітин, міелоїдних супресорних клітин та Treg-лімфоцитів [3, 4]. При цьому вибір маркерів для вивчення різних субпопуляцій імунних клітин насамперед ґрунтується на їх ролі в здійсненні протипухлинного імунітету та механізмів толерантності. Саме з огляду на це у межах нашого дослідження зроблено акцент на визначенні кількості та розподілі CD8<sup>+</sup>- та FOXP3<sup>+</sup>-клітин. Перші є ефекторними клітинами протипухлинного імунітету, другі – залучені у механізми імуносупресії [9]. Показано, що зростання щільності інфільтрації пухлини CD3<sup>+</sup>- і CD8<sup>+</sup>-лімфоцитами було асоційоване з покращенням прогнозу перебігу пухлинного процесу у пацієнтів з карциномами голови та шиї [14]. Також відомо, що попереднє запалення та лімфоїдна інфільтрація можуть впливати на прогноз

та ефективність лікування хворих з іншою онкологічною патологією [4, 10, 14].

Виявлені в роботі морфологічні зміни при ЛФР є досить закономірними з огляду на рівень рН та дію ферментів. Раніше було показано, що за умов рефлюксу в слизовій оболонці гортані зростає експресія та ензиматична активність матриксної металопротеїнази-7 [20] при порушенні експресії E-кадгерину, H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФази та карбоангідрази III [21]. Це обмежує бар'єрні властивості покривного епітелію та сприяє розвитку ушкодження та хронічного запалення. З іншого боку, доведено, що куріння та рефлюкс мають потужний імуномодуючий вплив на слизову оболонку гортані, призводячи до зменшення загальної популяції Т-клітин при зростанні числа Treg [7]. Останній висновок підтверджено в проведеному нами дослідженні, яке продемонструвало вищу кількість FOXP3<sup>+</sup>-клітин за умов ЛФР як у

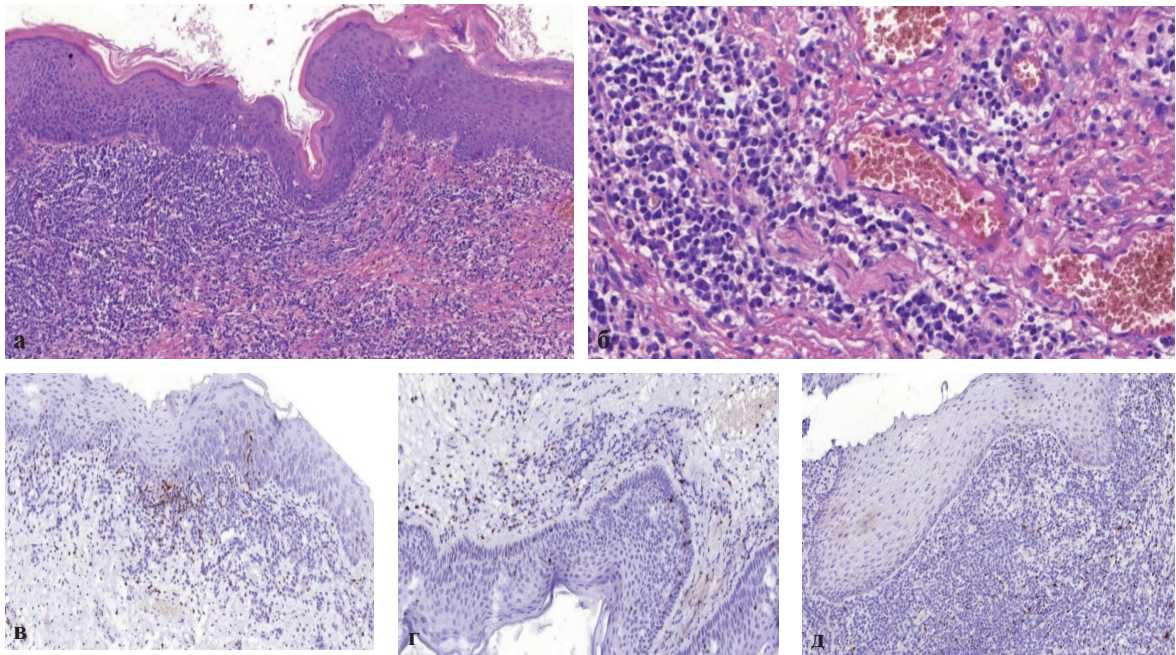


Рис. 2. Запальна інфільтрація та кількість різних Т-лімфоцитів у слизовій оболонці гортані за умов ларингофарингеального рефлюксу. На а і б – гіперплазія багат шарового плоского епітелію гортані з ознаками гіперкератозу, виражена лімфогістіоплазмочитарна інфільтрація власної пластинки слизової оболонки з домішкою нейтрофілів та еозинофілів. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення на а – у 100 разів, на б – у 200 разів. На в–д – помірна кількість та просторовий розподіл Т-лімфоцитів (CD3<sup>+</sup>; в) включаючи Т-цитотоксичні (г) та Т-регуляторні клітини (д). Імуногістохімічне дослідження з використанням антитіл до CD3, CD8 і FOXP3. Збільшення у 200 разів

ПКК, так і в межах неураженої пухлиною слизової оболонки. Такі зміни визначають також порушення балансу між ефекторною ланкою протипухлинного імунітету ( $CD8^+$ -клітини) та механізмами імуносупресії (Treg) при ПКК на фоні ЛФР. Як відомо, Treg-клітини секретують численні протизапальні цитокіни і фактори росту. Крім того, вони залучені у регуляцію інших імунних клітин, включаючи  $CD4^+$ - і  $CD8^+$ -Т-лімфоцити, В-клітини, НК-клітини, макрофаги і дендритні клітини. Доведено інгібуючий вплив Treg-клітин на функціонування дендритних клітин, обмеження проліферації та активності  $CD8^+$ -лімфоцитів внаслідок пригнічення продукції інтерлейкіну 2 та порушення механізмів гранзим- і перфоринзалежного кілінгу клітин-мішеней [12, 16].

Таким чином, за результатами проведеного дослідження, ЛФР асоційований з розвитком хронічного запалення і зростанням кількості Treg-клітин у слизовій оболонці гортані. Розвиток ПКК на фоні ЛФР також супроводжується зростанням їх кількості, що може визначати посилення толерантності до пухлини і впливати на ефективність протипухлинного імунітету, створюючи передумови для прогресування РГ.

*The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.*

**Д.И. Заболотный, В.В. Кизим, Д.Д. Заболотная, Я.В. Кизим, О.Н. Сулаева**

### **ВЛИЯНИЕ ЛАРИНГОФАРИНГЕАЛЬНОГО РЕФЛЮКСА НА ИММУННОЕ МИКРООКРУЖЕНИЕ КАРЦИНОМ ГОРТАНИ**

Цель данного исследования заключалась в оценке влияния ларингофарингеального рефлюкса (ЛФР) на количество Т-лимфоцитов в опухоли при раке гортани (РГ). По результатам рН-мониторирования 87 пациентов с опухолями

гортани, были сформированы группы, включавшие: РГ без ЛФР (1-я группа), РГ на фоне ЛФР (2-я группа), пациенты с доброкачественными новообразованиями гортани на фоне ЛФР (3-я группа). Оценку иммунного микроокружения опухолей проводили иммуногистохимически с подсчетом количества Т-лимфоцитов ( $CD3^+$ ), Т-цитотоксических клеток ( $CD8^+$ ) и Т-регуляторных клеток (Treg; FOXP3<sup>+</sup>) в пределах опухоли, в перитуморозной строме, и в интактных зонах гортани. ЛФР был ассоциирован с развитием хронического воспаления и влиял на иммунное микроокружение карциномы гортани. РГ на фоне ЛФР характеризовался выраженной воспалительной инфильтрацией опухоли и интактной слизистой оболочки. При этом не выявлено статистически значимых различий между количеством  $CD3^+$ - и  $CD8^+$ -клеток в опухолях пациентов 1-й и 2-й групп. Однако при ЛФР значительное увеличивалась плотность Treg-клеток как в опухоли, так и в интактной слизистой оболочке, что может влиять на иммунную толерантность и эффективность противоопухолевого иммунитета, предрасполагая к развитию и прогрессированию РГ.

Ключевые слова: рак гортани; ларингофарингеальный рефлюкс; иммунное микроокружения опухоли; Т-лимфоциты; Т-регуляторные клетки.

**D.I. Zabolotnyi<sup>1</sup>, V.V. Kizim<sup>1</sup>, D.D. Zabolotna<sup>1</sup>, Y.V. Kizim<sup>1</sup>, O.N. Sulaieva<sup>2</sup>**

### **LARINGOPHARYNGEAL REFLUX IMPACTS IMMUNE MICROENVIRONMENT OF LARYNGEAL CARCINOMA**

*<sup>1</sup>State Institution «Institute of Otolaryngology named after prof. A.S. Kolomyichenko NAMS of Ukraine», Kyiv; <sup>2</sup>Medical Laboratory CSD, Kyiv; e-mail: o.sulaieva@csd.com.ua*

The purpose of this study was to evaluate the effect of the laryngopharyngeal reflux (LPR) on the number of tumour-infiltrating T-lymphocytes in laryngeal cancer (LC). According to the results of pH monitoring, 87 patients with laryngeal tumours were subdivided into three groups: 1<sup>st</sup> group included patients with LC without LPR; 2<sup>nd</sup> group comprised LC patients with coexisting LPR, patients with benign neoplasms of the larynx with LPR were enrolled into 3<sup>d</sup> group. TIME was assessed immunohistochemically by counting T-lymphocytes ( $CD3^+$ ), T-cytotoxic cells ( $CD8^+$ ) and T-regulatory cells (Treg; FOXP3<sup>+</sup>) number within the tumour, in the peritumour stroma, and in the intact areas of the larynx. It was shown that LPR leads to chronic inflammation and affects TIME of laryngeal carcinomas. LC with coexisting LPR demonstrated a higher inflammatory infiltration of tumour area and intact mucosa. However, no statistically significant differences were found between a number of  $CD3^+$ - and  $CD8^+$ -cells in LC of the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> groups. In contrast, LPR was associated with higher number of immunosuppressive Treg-cells within tumour and in intact mucosa that could affect immune tolerance and efficacy of anti-tumour immunity facilitating LC progression.

Key words: laryngeal cancer; laryngopharyngeal reflux; tumour immune microenvironment; T-lymphocytes; T-regulatory cells.

## REFERENCES

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018; 68(6): 394-424.
2. Noordhuis MG, Kop EA, van B, der Vejt, Langendijk JA, van BFAM, der Laan, Schuurin E, de Bock GH. Biological tumor markers associated with local control after primary radiotherapy in laryngeal cancer: a systematic review. *Clin Otolaryngol.* 2020.
3. Ciolofan MS, Vlăescu AN, Mogoantă CA. Clinical, Histological and Immunohistochemical Evaluation of Larynx Cancer. *Curr Health Sci J.* 2017;43(4):367-75.
4. Wang H, Wei J, Wang B, Meng L, Xin Y, Dong L, Jiang X. Role of human papillomavirus in laryngeal squamous cell carcinoma: A meta-analysis of cohort study. *Cancer Med.* 2020;9(1):204-14.
5. Nocini R, Molteni G, Mattiuzzi C, Lippi G. Updates on larynx cancer epidemiology. *Chin J Cancer Res.* 2020;32(1):18-25.
6. Tae K, Jin BJ, Ji YB et al. The Role of Laryngopharyngeal Reflux as a Risk Factor in Laryngeal Cancer: A Preliminary Report *Clin Exp Otorhinolaryngol.* 2011; 4(2): 101-4.
7. Gill GA, Johnston N, Buda A, Pignatelli M, Pearson J, Dettmar PW, Koufman J. Laryngeal epithelial defenses against laryngopharyngeal reflux: investigations of E-cadherin, carbonic anhydrase isoenzyme III, and pepsin. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2005;114(12):913-21.
8. Powell J, Cocks HC. Mucosal changes in laryngopharyngeal reflux--prevalence, sensitivity, specificity and assessment. *Laryngoscope.* 2013;123(4):985-91.
9. Giraldo NA, Peske JD, Sautès-Fridman C. Integrating histopathology, immune biomarkers, and molecular subgroups in solid cancer: the next step in precision oncology. *Virchows Arch.* 2019;474:463-74.
10. Sulaieva O, Seleznirov O, Shapochka D et al. Hashimoto's thyroiditis attenuates progression of papillary thyroid carcinoma: deciphering immunological links. *Heliyon.* 2020;6 (1):e03077.
11. Hoesli R, Birkeland AC, Rosko AJ, Issa M, Chow KL, Michmerhuizen NL et al. Proportion of CD4 and CD8 tumor infiltrating lymphocytes predicts survival in persistent/recurrent laryngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2018;77:83-9.
12. Canning M, Guo G, Yu M, Myint C, Groves MW, Byrd JK, Cui Y. Heterogeneity of the Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Immune Landscape and Its Impact on Immunotherapy. *Front Cell Dev Biol.* 2019;7:52.
13. Seminerio I, Descamps G, Dupont S, de Marrez L, Laigle JA, Lechien JR, Kindt N, Journe F, Saussez S. Infiltration of FoxP3+ Regulatory T Cells is a Strong and Independent Prognostic Factor in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancers (Basel).* 2019;11(2). pii: E227.
14. Sulaieva O, Chernenko O, Selesnov O, Nechay O, Maievskiy O, Falalyeyeva T, Kobylak N, Tsyryuk O, Penchuk Y, Shapochka D. Mechanisms of the Impact of Hashimoto Thyroiditis on Papillary Thyroid Carcinoma Progression: Relationship with the Tumor Immune Microenvironment. *Endocrinology and Metabolism* 2020;35(2):443-55.
15. AJCC Cancer Staging Manual, 8th Edition. Editors: Amin MB, Gress DM, Vega LPRM, Edge SB, Greene FL., Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, Compton CC. Springer, 2017
16. de Ruiter EJ, Ooft ML, Devriese LA, Willems SM. The prognostic role of tumor infiltrating T-lymphocytes in squamous cell carcinoma of the head and neck: A systematic review and meta-analysis. *Oncoimmunology.* 2017;6(11):e1356148.
17. Chernenko O., Sulaieva O. Papillary thyroid cancer and thyroid stimulating hormone: does sex matter? *Fiziol. Zh.* 2019; 65(6): 81-7.
18. Sun W, Wei FQ, Li WJ, Wei JW, Zhong H, Wen YH et al. A positive-feedback loop between tumour infiltrating activated Treg cells and type 2-skewed macrophages is essential for progression of laryngeal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2017;117(11):1631-43.
19. Jetté ME, Seroogy CM, Thibeault SL. Laryngeal T regulatory cells in the setting of smoking and reflux. *Laryngoscope.* 2017;127(4):882-7.
20. Im NR, Lee DY, Kim B, Kim J, Jung KY, Kim TH, Baek SK. Role of Matrix Metalloproteinases 7 in the Pathogenesis of Laryngopharyngeal Reflux: Decreased E-cadherin in Acid exposed Primary Human Pharyngeal Epithelial Cells. *Int J Mol Sci.* 2019;20(21).
21. McCormick CA, Samuels TL, Battle MA, Frolkis T, Blumin JH, Bock JM, Wells C, Yan K, Altman KW, Johnston N. H+/K+ATPase Expression in the Larynx of Laryngopharyngeal Reflux and Laryngeal Cancer Patients. *Laryngoscope.* 2020.

*Матеріал надійшов до редакції 10.06.2020*