

# Izražajnost i povezanost matriks metaloproteinaze-9 i e-cadherina u pločastom karcinomu grkljana

---

Čolović, Zaviša

Doctoral thesis / Disertacija

2013

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:434850>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-25**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



Sveučilište u Splitu

Medicinski fakultet

ZAVIŠA ČOLOVIĆ

IZRAŽAJNOST I POVEZANOST MATRIKS  
METALOPROTEINAZE-9 I E-CADHERINA  
U PLOČASTOM KARCINOMU  
GRKLJANA

Doktorska disertacija

Split, ožujak 2013.

Sveučilište u Splitu

Medicinski fakultet

ZAVIŠA ČOLOVIĆ

IZRAŽAJNOST I POVEZANOST MATRIKS  
METALOPROTEINAZE-9 I E-CADHERINA  
U PLOČASTOM KARCINOMU  
GRKLJANA

Doktorska disertacija

Split, ožujak 2013.

Rad je izrađen u Klinici za bolesti uha, grla i nosa i kirurgiju glave i vrata, te Kliničkom zavodu za patologiju sudsku medicinu i citologiju Kliničkog bolničkog centra Split.

Mentor: prof.dr.sc. Valdi Pešutić-Pisac, dr.med.

Zahvaljujem:

- prof.dr. Valdi Pešutić-Pisac, mojoj mentorici, na iznimnoj i svesrdnoj pomoći u nastanku, izradi i dovršetku ovog istraživanja.
- doc.dr. Goranu Kardumu, na iznimnom i stručnom učešću u nastanku, provođenju i dovršetku ovog istraživanja, a iznad svega na prijateljskoj podršci.
- prof.dr. Snježani Tomić, na korisnim savjetima, te pomoći i podršci tijekom izrade ovog istraživanja.
- kolegama i osoblju Klinike za bolesti uha, grla i nosa i kirurgiju glave i vrata na čelu sa predstojnikom na podršci tijekom izrade ovog istraživanja.

## **SADRŽAJ**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. UVOD</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1. Grkljan  | 1         |
| 1.1.1. Embriologija grkljana  | 1         |
| 1.1.2. Anatomija i histologija grkljana   | 2         |
| 1.2. Epidemiologija i etiologija karcinoma grkljana                                       | 4         |
| 1.3. Dijagnostika i terapija karcinoma grkljana   | 5         |
| 1.4. Pločasti karcinom grkljana   | 6         |
| 1.5. Prognostički čimbenici karcinoma grkljana  | 7         |
| 1.5.1. „Klasični“ prognostički čimbenici  | 8         |
| 1.5.1.1. TNM klasifikacija karcinoma grkljana   | 8         |
| 1.5.1.2. Izborni deskriptori klasifikacije karcinoma grkljana                             | 12        |
| 1.5.1.3. Tipovi stanične diferencijacije (patohistološki gradus) karcinoma grkljana       | 14        |
| 1.5.1.4. Značaj „klasičnih“ prognostičkih čimbenika karcinoma grkljana                    | 15        |
| 1.5.2. „Suvremeni“ prognostički čimbenici karcinoma grkljana                              | 17        |
| 1.6. E-cadherin   | 18        |
| 1.7. Matriks metaloproteinaza-9 (MMP-9)   | 22        |
| <b>2. CILJEVI I HIPOTEZE</b>  | <b>26</b> |
| 2.1. Ciljevi  | 26        |
| 2.2. Hipoteze   | 26        |
| <b>3. METODE I ISPITANICI</b>   | <b>27</b> |
| 3.1. Ispitanici   | 27        |
| 3.2. Metode   | 29        |
| 3.2.1. Imunohistokemijski postupci  | 31        |
| 3.2.2. Statistička analiza podataka   | 34        |
| <b>4. REZULTATI</b>   | <b>35</b> |
| 4.1. Raspodjela bolesnika s obzirom na kliničke i patohistološke osobine                  | 35        |
| 4.2. Prikaz odnosa kliničkih i patohistoloških osobina                                    | 41        |
| 4.3. Prikaz odnosa izražajnosti E-cadherina i MMP-9 i kliničkih i patohistoloških osobina | 45        |
| 4.3.1. Prikaz odnosa izražajnosti E-cadherina i kliničkih i patohistoloških osobina       | 45        |
| 4.3.2. Prikaz odnosa izražajnosti MMP-9 i kliničkih i patohistoloških osobina             | 50        |
| 4.3.3. Prikaz odnosa izražajnosti E-cadherina i MMP-9                                     | 55        |
| 4.4. Značajnost izražajnosti E-cadherina i MMP-9 na prognozu i preživljenje ispitanika    | 56        |

|                            |    |
|----------------------------|----|
| <b>5. RASPRAVA</b>         | 64 |
| <b>6. ZAKLJUČCI</b>        | 70 |
| <b>7. SAŽETAK</b>          | 71 |
| <b>8. SUMMARY</b>          | 72 |
| <b>9. POPIS LITERATURE</b> | 73 |
| <b>10. ŽIVOTOPIS</b>       | 83 |

## **Popis oznaka i kratica**

AJCC – Američko društvo za rak (eng. American Joint Committee on cancer)

bcl-2/bax – regulatorna bjelančevina apoptoze

c-erbB-2 – gen prigušivač tumora

C-faktor – eng. *certainty factor* (faktor sigurnosti)

CT – kompjutorizirana tomografija

DAB - diamino–benzidin

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

E-cadherin – epitelni cadherin

EGFR – receptor za epidermalni čimbenik rasta

HE – hemalaun eozin

Ki-67 – proliferacijski marker

MMP – matriks metaloproteinaza

MMP-9 – matriks metaloproteinaza 9

MRI – magnetska rezonancija

nm23 – tumor supresor gen

PBS – phosphate buffered saline

PCNA – antigen jezgara proliferirajućih stanica

p53 – gen prigušivač tumora

R – rezidualni tumor

S100A2 – onkosupresor

TIMP – tkivni inhibitor matriks metaloproteinaze

TNM – klasifikacija proširenosti tumora (Tumor, lymph Node metastasis, distant Metastasis)

UZV – ultrazvuk

VEGF – vaskularno endotelni čimbenik rasta

## **1. UVOD**

### **1.1. GRKLJAN**

Grkljan je hrskavično-membranozni organ smješten u prednjem dijelu vrata u visini od trećeg do šestog vratnog kralješka (1). Zatvoren je brojnim mišićima koji kontrakcijom reguliraju odnose unutar hrskavično-membranoznog okvira omogućujući njegove složene funkcije: respiraciju, fonaciju i gutanje (2,3).

Respiratorna i degluticijska uloga su primarne i vitalne funkcije grkljana (1). Pokretima laringealne muskulature regulira se prostor glotisa, a kontrakcijom vanjskih mišića grkljana on se tijekom udisaja spušta i tako povećava negativan tlak u prsištu, pospješujući disanje (1).

Degluticijska tj. protektivna funkcija grkljana počiva na mehanizmu sfinktera razvijenih tijekom evolucije poradi zaštite donjih dišnih putova od aspiracije (1).

Promatrajući od proksimalno prema distalno, postoje tri sfinktera: prvi čine epiglotis, ariepiglotski nabori i aritenoidi koji djeluju tijekom gutanja sprječavajući ulazak hrane i tekućine u donje dišne putove (4). Drugi sfinkter čine ventrikularni nabori koji dodatno pojačavaju djelovanje prvog sfinktera te povećavaju intratorakalni tlak (4). Treći sfinkter su glasiljke, koje također mehanički pojačavaju djelovanje proksimalnih sfinktera (4).

Fonacija predstavlja sekundarnu funkciju grkljana, a razvila se iz refleksogenog zatvaranja grkljana razvojem središnjeg živčanog sustava i diferencijacijom perifernih organa (5).

#### **1.1.1. Embriologija grkljana**

Osnova grkljana nastaje u četvrtom jednu embrionalnog razvoja na ventralnoj strani kaudalnog odsječka škržnog crijeva, dušnika i pluća, u obliku divertikuloidnog izbočenja (6). Izduženjem tog izbočenja u kaudalnom smjeru nastaje laringotrahealna cijev (6). Od kranijalnog dijela laringotrahealne cijevi razvijaju se grkljan i dušnik, a kaudalni dio se podijeli u dvije grane od kojih nastaju bronhi i pluća (6).



### 1.1.2. Anatomija i histologija grkljana

Grkljan se sastoji od devet hrskavica: tri pojedinačne i tri parne (7). Sve laringelane hrskavice su hijaline, osim epiglotisa koji je elastična hrskavica (8). Osifikacija hrskavica nastupa u trećoj i četvrtoj dekadi života (8). Područja grkljana na kojima nedostaje perihondrij (prednja komisura, Broyleov ligament, veza prednje i tri stražnje četvrtine tiroidne lamine, veza krikotiroidne i krikotrahealne membrane te krikoaritenoidni zglobovi) su jako podložna invaziji karcinomom (8). Kombinacija nedostatka perihondrija i progresivne osifikacije hijalinih hrskavica može biti predilekcijski faktor širenja i invazije karcinoma (8).

U grkljanu razlikujemo tri dijela: supraglotički, glotički, subglotički, te u okviru kirurške anatomije i transglotički (7). Supraglotički dio grkljana uključuje supra i infrahioidni epiglotis, aritenoide, laringealnu površinu ariepiglotskih nabora, ventrikularne nabore i Morgagnijev ventikul (3,7). Supraglotis embriološki nastaje kao derivat trećeg branhijskog luka u komparaciji s glotisom i subglotisom koji nastaju kao derivati četvrtog i petog branhijskog luka (3,7). Preepiglotski prostor nalazi se ispred epiglotisa, omeđen je hioepiglotskim ligamentom superiorno, infrahioidnim epiglotisom inferiorno, prednje omeđenje su hioid, tiroidna membrana i tiroidna hrskavica (3). Paraglotički prostor je omeđen lateralno tiroidnom hrskavicom, krikotiroidnom membranom i krikoidnom hrskavicom, medijalno je omeđen quadrangularnom membranom, ventrikulom i konusom elastikusom (3).

Invazija paraglotičkog prostora povećava stadij tumora i zahtijeva radikalniji kirurški pristup (3).

Glottis čine glasiljke (vokalni nabori), prednja i stražnja komisura, s donjom granicom koja označava horizontalnu ravninu 1 cm ispod apeksa Morgagnijeva ventrikula (3). Subglottis je regija koja se prostire od donje granice glotisa do donjeg ruba krikoidne hrskavice (3). Višeslojni pločasti epitel pokriva glasiljke i gornji dio vestibuluma grkljana, a višeredni cilindrični epitel s trepetiljkama prekriva ostalu šupljinu grkljana (3). Planocelularni karcinom nastaje od površinskog višeslojnog pločastog epitela glasiljki ili epiglotisa, ali i od respiratornog epitela nakon njegove pločaste metaplazije (3). Inervacija grkljana odvija se putem *n. laryngeusa recurrensa* koji opskrbljuje sve unutarnje mišiće grkljana (3). *N. laryngeus superior* se dijeli na dvije grane: vanjska grana je motorička i inervira krikotiroidni mišić, dok je unutarnja

grana senzorička i opskrbljuje sluznicu grkljana iznad glotisa (3). Oba laringealna živca su ogranci *n. vagusa* (3). Opskrba krvlju grkljana odvija se putem dva ogranka *a. thyreoideae superior* (*a. laryngea superior et media*), te ogrankom *a. thyreoideae inferior* (*a. laryngica inferior*) (3). Limfna mreža grkljana podijeljena je područjem glasiljki na dva dijela (3). Supraglotični dio ima bogatu submukoznu limfatičku mrežu koja prelazi medijalnu liniju i nalazi se iznad glasiljki, a limfne žile se dreniraju u preepigloteičke i gornje duboke limfne čvorove vrata obostrano s incidencijom metastaziranja 50% – 60% (3). Glotički dio ima vrlo slabu mrežu limfne drenaže, što implicira sporije metastaziranje (3). Subglotis se drenira bilateralno u prelaringealne i pretrahealne, duboke cervikalne limfne čvorove, te u gornji medijastinum (3).

## 1.2. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA KARCINOMA GRKLJANA

Karcinom grkljana je, poslije karcinoma pluća, najčešći maligni tumor dišnog sustava (9). Hrvatski nacionalni registar za rak ukazuje na incidenciju malignih tumora glave i vrata na razini 7,4% od svih novootkrivenih malignih tumora godišnje (9). Slične epidemiološke podatke pokazuje i registar Sjedinjenih Američkih Država gdje se incidencija malignih tumora glave i vrata kreće između 5% i 8% (7). U pojedinim dijelovima Azije i Indije incidencija tumora glave i vrata dostiže i do 30% svih tumora (7).

Maligni tumori grkljana u našoj zemlji čine 1,7% svih tumora i s izrazitom predominacijom muškaraca (16:1); u svijetu se omjer između muškaraca i žena kreće od 5:1 do 20:1 u korist muškaraca (9). U skupini malignih tumora glave i vrata u Hrvatskoj karcinom grkljana čini 23% (9). Od svih tumora glave i vrata u muškaraca u Hrvatskoj 42% čini karcinom grkljana, pa time postaje najučestaliji tumor glave i vrata u Hrvatskoj (9). Najveća incidencija karcinoma grkljana je u Sao Paulu (Brazil), Bombayu (Indija) i na Tajlandu (7).

Prosječno 12 000 novih bolesnika s karcinomom grkljana godišnje nalazimo u Sjedinjenim Američkim Državama (7). U industrijskim sredinama incidencija je veća nego u ruralnim sredinama, a omjer je 3 : 1 (7). Prilikom detekcije bolesnika 65% ih ima lokaliziranu bolest, 30% ih ima metastazu na vratu, a 5% ih ima udaljenu metastazu (7). U našoj zemlji još uvijek se glavnina bolesnika detektira u stadiju III i IV bolesti (9). Najčešća dob bolesnika je između 60 i 75 godina (9).

Etiologija karcinoma grkljana je vezana uz pušenje, konzumiranje alkoholnih pića, mehaničko i termičko oštećenje sluznice raznim toksinima, kronične upale, ionizacijsko zračenje, udisanje kancerogenih tvari (pesticidi, herbicidi...), te profesionalni rizik u slučaju izloženosti cementnim parama, azbestu, niklu ili nafti i naftnim derivatima (7). Kombinacija pušenja i zlouporabe alkohola ima sinergistički efekt i značajno povećava rizik od nastanka karcinoma grkljana (7).

Uvođenjem cigareta u masovnu proizvodnju početkom 20-tog stoljeća raste incidencija karcinoma grkljana koji je do tada bio sporadična bolest (7). Epidemiološke studije ukazuju da je 88% - 98% oboljelih bilo ili su još uvijek pušači (7). U ljudskom grkljanu glotički dio je osjetljiviji na inhalacijske kancerogene, a supraglotis na nutritivne agense (7). S obzirom na smještaj karcinoma grkljana 64% čine glotički tumori, 35% supraglotički tumori, a 1% subglotički tumori (9).

Drugi primarni tumor se može pronaći u 10% bolesnika s karcinomom grkljana, pogotovo u karcinomu grkljana supraglotičkog sijela. Najčešće je drugo sijelo u području glave i vrata, potom bronha, pluća i jednjaka (7).

### **1.3. DIJAGNOSTIKA I TERAPIJA KARCINOMA GRKLJANA**

U kliničkoj slici najznačajniji i često najraniji simptom su promuklost ili poteškoće s gutanjem, ovisno o sijelu karcinoma (7). Uznapredovali karcinomi prezentiraju se respiracijskom insuficijencijom, dispnejom, stridoroznim disanjem, poteškoćama s gutanjem (7). Dijagnostika karcinoma grkljana obuhvaća: anamnezu, kompletan otorinolaringološki pregled, indirektnu laringoskopiju, rigidnu endovideo laringoskopiju, fiberendoskopiju grkljana, indirektnu laringomikro-stroboskopiju, digitalnu endovideo-stroboskopiju, akustičku i kompjutorsku analizu glasa, UZV vrata (s ili bez citološke punkcije), CT grkljana i vrata, MRI grkljana i vrata, laringomikroskopiju i probatornu biopsiju uz patohistološku analizu (7).

Liječenje karcinoma grkljana je kompleksno i često multimodalitetno, a obuhvaća kirurško i onkološko liječenje (kemoradioterapiju) koje se, ovisno o stadiju bolesti, primjenjuju zasebno ili u kombinaciji (7). Terapija ranih karcinoma grkljana uključuje LASER endoskopsku kirurgiju, otvorenu parcijalnu (konzervativnu, prezervacijsku) kirurgiju, radioterapiju (7).

Terapija uznapredovalih karcinoma grkljana uključuje LASER endoskopsku kirurgiju, otvorene parcijalne (prezervacijske) laringektomije (vertikalne, horizontalne, kombinacije), otvorene parcijalne laringofaringektomije, totalne laringektomije, totalne faringolaringektomije, radioterapiju, kemoterapiju, kemoradioterapiju te kombinacije liječenja uz multidisciplinarni pristup (7).

#### 1.4. PLOČASTI KARCINOM GRKLJANA

Preko 90% karcinoma grkljana čini pločasti (planocelularni) karcinom, uključujući karcinom *in situ* i verukozni karcinom (7). Ostalih 10% čine nediferencirani karcinomi, adenokarcinomi, mukoepidermoidni karcinomi i druge neoplazme (7). Višeslojni pločasti epitel prekriva glasiljke i gornji dio vestibuluma grkljana, a višeredni cilindrični epitel s trepetiljkama prekriva ostalu šupljinu grkljana (3,7). Planocelularni karcinom nastaje od površinskog višeslojnog pločastog epitela glasiljki ili epiglotisa, ali i od respiratornog epitela nakon njegove pločaste metaplazije (3,7).

Karakteristike planocelularnog karcinoma su pločasta diferencijacija tumorskih stanica i invazivni rast (10,11). Pločasta diferencijacija često je karakterizirana formiranjem keratinskih perli, a invazivni rast se očituje probojem bazalne membrane i infiltracijom podležućeg tkiva, te krvnih žila i živaca (10,11).

Pločasti karcinom grkljana makroskopski se može pojaviti kao plosnati plak s dobro definiranim uzdignutim rubom ili se prezentira kao polipoidno-egzofitična izraslina (10,11). Površina tumora je katkada ulcerirana (10,11).

## 1.5. PROGNOŠTIČKI ČIMBENICI KARCINOMA GRKLJANA

Prognoštičke čimbenike klasično dijelimo u tri međusobno povezane skupine: prognoštičke čimbenike vezane uz bolesnika (dob, rasa, spol, genetsko naslijeđe, imunološki status, lokalne ili sistemske komplikacije tumora), prognoštičke čimbenike vezane uz tumor (patohistološke značajke tumora - klasifikacija primarnog tumora, histološki tip, histološki stupanj, pojava, lokalizacija i širenje metastaza, ekspresija raznih hormonskih, biokemijskih i onkoloških biljega), te prognoštičke čimbenike vezane uz primijenjeno liječenje (operaciju, radio ili kemoterapiju ili kombinacije istih) (12).

U novije vrijeme prognoštički čimbenici se dijele na „klasične“ i „suvremene“.

U „klasične“ ubrajamo TNM (veličina tumora, zahvaćenost limfnih čvorova, prisutnost udaljenih metastaza), stadij bolesti, lokalizacija tumora, patohistološki stupanj diferencijacije (4,11,13,14).

U „suvremene“ ubrajamo proliferacijske markere (npr. PCNA, Ki-67), regulatorne bjelančevine apoptoze (npr. bcl-2/bax), onkogene (npr. p53), regulatore angiogeneze (npr. VEGF), regulatorne bjelančevine staničnog ciklusa (npr. cikline, p16), biološke markere (npr. E-cadherin i MMP-9) (15,16).

## 1.5.1. „Klasični“ prognostički čimbenici karcinoma grkljana

### 1.5.1.1. TNM klasifikacija karcinoma grkljana

TNM klasifikacija predstavlja kriterij za procjenu uznapređovalosti većine karcinoma (11,17). Služi za iskazivanje lokalne proširenosti tumora, prisustvo ili odsutstvo regionalnih i udaljenih metastaza (11,17). Karcinom grkljana podijeljen je s obzirom na veličinu primarnog tumora (T), prisutne ili odsutne metastaze u regionalne limfne čvorove (N) i udaljene metastaze (M) (11,17).

#### Primarni Tumor (T)

**TX** Primarni tumor se ne može odrediti.

**T0** Nema znakova primarnog tumor.

**Tis** Carcinoma *in situ*.

#### *Supraglotis*

**T1** Tumor ograničen na jedno područje supraglotisa uz urednu pokretljivost glasiljki.

**T2** Tumor zahvaća više od jednog područja supraglotisa ili glotis, ili regiju izvan supraglotisa (sluznicu korijena jezika, vokalnih predložaka, medijalnog zida piriformnog sinusa) uz urednu pokretljivost glasiljki.

**T3** Tumor ograničen na područje grkljana s fiksacijom glasiljke i/ili širenjem na postkrikoidno područje, preepiglotski prostor, paraglotski prostor, i/ili početna erozija tiroidne hrskavice grkljana (unutarnjeg korteksa).

**T4a** Tumor se širi kroz tiroidnu hrskavicu i/ili na druga tkiva izvan grkljana (pr. dušnik, meka tkiva vrata uključujući duboku ekstrinzičku muskulaturu jezika, infrahioidne mišiće, štitnjaču ili jednjak).

**T4b** Tumor se širi na prevertebralni prostor, zahvaća karotidnu arteriju ili zahvaća medijastinalne strukture.

## *Glottis*

**T1** Tumor ograničen na glasiljku(e) – može uključivati prednju i stražnju komisuru s urednom pokretljivošću glasiljke (i).

**T1a** Tumor ograničen na jednu glasiljku.

**T1b** Tumor zahvaća obje glasiljke.

**T2** Tumor se širi na supraglotis i/ili subglotis, ili s oslabljenom pokretljivošću glasiljke (i).

**T3** Tumor ograničen na grkljan s fiksacijom glasiljke(i), i/ili zahvaća paraglotski prostor, i/ili minimalno erodira tiroidnu hrskavicu grkljana (unutarnji korteks).

**T4a** Tumor se širi kroz tiroidnu hrskavicu i/ili zahvaća tkiva izvan grkljana (pr. dušnik, meka tkiva vrata uključujući duboku ekstrinzičku muskulaturu jezika, infrahioidne mišiće, štitnjaču ili jednjak).

**T4b** Tumor se širi na prevertebralni prostor, zahvaća karotidnu arteriju ili zahvaća medijastinalne strukture.

## *Subglottis*

**T1** Tumor ograničen na subglotis.

**T2** Tumor se širi na jednu ili obje glasiljke s normalnom ili poremećenom pokretljivošću.

**T3** Tumor ograničen na grkljan s fiksacijom glasiljke(i).

**T4a** Tumor zahvaća krikoidnu ili tiroidnu hrskavicu i/ili na druga tkiva izvan grkljana (pr. dušnik, meka tkiva vrata uključujući duboku ekstrinzičku muskulaturu jezika, infrahioidne mišiće, štitnjaču ili jednjak).

**T4b** Tumor se širi na prevertebralni prostor, zahvaća karotidnu arteriju ili zahvaća medijastinalne strukture.



## **Regionalni Limfni Čvorovi (N)**

**NX** Regionalni limfni čvorovi se ne mogu odrediti.

**N0** Nema znakova zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova.

**N1** Metastaza u jednom ipsilateralalnom limfnom čvoru, 3 cm ili manje u najvećem promjeru.

**N2** Metastaza u jednom ipsilateralnom limfnom čvoru, većem od 3 cm, ali ne većem od 6 cm u najvećem promjeru, ili u multiplim ipsilateralnim limfnim čvorovima, ne većima od 6 cm u najvećem promjeru, ili u bilateralnom ili kontralateralnom limfnom čvoru, ne većem od 6 cm u najvećem promjeru.

**N2a** Metastaza u jednom ipsilateralnom limfnom čvoru, većem od 3 cm, ali ne većem od 6 cm u najvećem promjeru.

**N2b** Metastaze u multiplim ipsilateralnim limfnim čvorovima, ne većima od 6 cm u najvećem promjeru.

**N2c** Metastaze u bilateralne ili kontralateralne limfne čvorove, ne veće od 6 cm u najvećem promjeru.

**N3** Metastaze u limfne čvorove, veće od 6 cm u najvećem promjeru.

## **Udaljene Metastaze (M)**

**MX** Udaljene metastaze se ne mogu odrediti.

**M0** Nema udaljenih metastaza.

**M1** Udaljene metastaze prisutne.

## Stadiji bolesti

| <b>Stadij</b> | <b>T</b> | <b>N</b> | <b>M</b> |
|---------------|----------|----------|----------|
| 0             | Tis      | N0       | M0       |
| I             | T1       | N0       | M0       |
| II            | T2       | N0       | M0       |
| III           | T3       | N0       | M0       |
|               | T1       | N1       | M0       |
|               | T2       | N1       | M0       |
|               | T3       | N1       | M0       |
| IVA           | T4a      | N0       | M0       |
|               | T4a      | N1       | M0       |
|               | T1       | N2       | M0       |
|               | T2       | N2       | M0       |
|               | T3       | N2       | M0       |
|               | T4a      | N2       | M0       |
| IVB           | T4b      | Any N    | M0       |
|               | Any T    | N3       | M0       |
| IVC           | Any T    | Any N    | M1       |

### **1.5.1.2. IZBORNI DESKRIPTORI KLASIFIKACIJE KARCINOMA GRKLJANA**

Izborni deskriptori dodatno prikazuju osobine karcinoma grkljana (18).

#### **L - Limfna invazija**

LX Limfna invazija se ne može procijeniti.

L0 Nema limfne invazije.

L1 Limfna invazija.

#### **V - Venska invazija**

VX Venska invazija se ne može procijeniti.

V0 Nema venske invazije.

V1 Mikroskopska venska invazija.

V2 Makroskopska venska invazija.

Napomena: Makroskopsko uključivanje stijenke vene (bez tumora unutar vene) je klasificirano kao V2 (18).

#### **R - Rezidualni tumor**

Odsutnost ili prisutnost ostatnog tumora nakon tretmana je opisao simbol R (18).

TNM je opisao anatomsku širinu tumora u cjelini bez uzimanja u obzir tretmana (18).

On se može dopuniti R klasifikacijom, koja se bavi tumorskim statusom nakon tretmana (18). To odražava učinke terapije, utječe na daljnje terapijske postupke i snažan je prediktor prognoze (18).

**RX** Prisutnost ostatnog tumora se ne može procijeniti.

**R0** Nema ostatnog tumora.

**R1** Mikroskopski ostatni tumor.

**R2** Makroskopski ostatni tumor.

## C-FAKTOR

C-faktor (eng. *certainty*) ili faktor sigurnosti odražava valjanosti klasifikacije u skladu s dijagnostičkim metodama (18). Njegova uporaba nije obavezna (18).

C-faktor definicije su:

- C1 Dokazi iz standardnih dijagnostičkih sredstava (npr. inspekcija, palpacija, standardna radiografija, ILS pregled, EVS pregled, endoskopija).
- C2 Dokazi pribavljeni posebnim dijagnostičkim sredstvima (npr. rendgenska snimanja u posebnim projekcijama, angiografija, scintigrafija, ultrazvuk (UZ), kompjutorizirana tomografija [CT], magnetska rezonancija [MR], laringomikroskopija).
- C3 Dokazi iz istraživanja, uključujući i kirurške i citološke biopsije.
- C4 Dokaz o stupnju bolesti nakon konačne operacije i patološkog pregleda reseiranog uzorka.
- C5 Dokazi iz autopsije.

TNM klinička podjela je dakle ekvivalent C1, C2, C3 i na različitim stupnjevima sigurnosti, dok pTNM patološke klasifikacije općenito je jednak C4 (18).

### **1.5.1.3. Tipovi stanične diferencijacije (patohistološki gradus) karcinoma grkljana**

Postoje tri glavna tipa pločastog karcinoma grkljana koji su određeni stupnjem stanične diferenciranosti (11,19).

#### **Gradus I (dobro diferencirani pločasti karcinom)**

Karakteriziran je poligonalnim stanicama, dobro razvijenim intercelularnim mostićima i obilnim brojem keratiniziranih perli. Jezgre su hiperkromatske, nejednake veličine i oblika, sa smanjenom količinom citoplazme. Stroma tumora je oskudna.

#### **Gradus II (umjereno diferencirani pločasti karcinom)**

Karakteriziran je oskudnim keratiniziranim perlama ili njihovim odsustvom. Uočava se polimorfija jezgara, brojne (često atipične) mitoze, a mogu biti prisutne i multinuklearne stanice. Rjeđi su intercelularni mostići.

#### **Gradus III (slabo diferencirani pločasti karcinom)**

Karakteriziran je malobrojnim epitelnim perlama, gotovo da nema keratinizacije i intercelularnih mostića. Predominiraju nezrele stanice s brojnim atipičnim mitozama, uz izrazitu polimorfiju stanica i jezgara.

Iako je keratinizacija najčešće prisutna u dobro i umjereno diferenciranim pločastim karcinomima, to se ne bi trebalo smatrati važnim histološkim kriterijem u stupnjevanju stanične diferenciranosti pločastog karcinoma grkljana (20).

#### 1.5.1.4. Značaj „klasičnih“ prognostičkih čimbenika karcinoma grkljana

Dosadašnja istraživanja utvrdila su značaj slijedećih „klasičnih“ prognostičkih čimbenika:

1. Klinički stadij i lokalizacija su međusobno povezani čimbenici, a promatramo ih u odnosu na petogodišnje preživljenje: za glotičke karcinome 80% (Stadij I 90%, II 85%, III 60%, IV < 5%), za supraglotičke karcinome 65% (Stadij I 85%, II 75%, III 45%, IV < 5%), za subglotičke 40%, te za transglotičke 50% (4). Stadij bolesti u trenutku postavljanja dijagnoze pločastog karcinoma glave i vrata, dakle i grkljana, je najvažniji prognostički čimbenik (13).
2. Veličina tumora je također važan prognostički čimbenik. Što je tumor veći, veća je sklonost recidiviranju (21).
3. Patohistološki stupanj diferencijacije tumorskih stanica je neovisan prognostički čimbenik (11). Razlikuju se: gradus I - dobro diferencirani karcinom, koji ujedno ima najbolju prognozu, gradus II - srednje diferencirani karcinom i gradus III - slabo diferencirani karcinom (11). Patohistološki stupanj diferenciranosti (gradus) ima ograničenu vrijednost u predviđanju tijeka bolesti (22). Dobro diferencirani tumori imaju bolju prognozu od slabo diferenciranih (11).
4. Zahvaćenost limfnih čvorova u trenutku dijagnoze također ima prognostičko značenje (13,14). Prognoza ovisi o broju zahvaćenih čvorova, njihovoj veličini i eventualnom prisustvu ektranodalnog širenja procesa (14). Zahvaćenost limfnih čvorova vrata je najvažniji pojedinačni prognostički čimbenik planocelularnog karcinoma glave i vrata, tako i grkljana (13,23,24). Bolesnici sa zahvaćenim limfnim čvorovima imaju 50% slabije 5-godišnje preživljenje u usporedbi s bolesnicima čiji je tumor ograničen na primarnu lokaciju, bez obzira na primijenjeno liječenje (13,25).

5. DNA ploidiya ima također prognostički značaj; pokazalo se naime da aneuploidni tumori imaju lošiju prognozu u odnosu na diploidne tumore (26).

Unatoč dokazanoj prognostičkoj vrijednosti navedenih „klasičnih“ prognostičkih čimbenika za planocelularni karcinom grkljana, i dalje postoje nastojanja za otkrivanjem novih prognostičkih čimbenika za predviđanje ponašanja tumora i njegovog odgovora na terapiju.

Dosadašnja saznanja upućuju da u nastanku planocelularnog karcinoma grkljana sudjeluju različiti mehanizmi, premda različite studije naglašavaju ili relativiziraju značaj dobivenih rezultata.

Opće je rašireno mišljenje da je nastanak karcinom grkljana dugotrajan proces koji podrazumijeva brojne genetske i fenotipske alteracije. Stoga je malo vjerovatno da će jedan marker razdijeliti prognostički različite skupine, ali svako istraživanje istih, a pogotovo kombinacije istih, korak su dalje u rasvjetljavanju osobina ove smrtonosne bolesti.

### 1.5.2. „Suvremeni“ prognostički čimbenici karcinoma grkljana

„Suvremeni“ prognostički čimbenici pružaju nam informacije o tumoru koje se ne mogu dobiti rutinskim pregledom histološkog materijala. Uključuju, između ostalog, proliferacijsku aktivnost i amplifikaciju onkogeno (15,16).

Proliferacijska aktivnost odražava biološki potencijal i mogući odgovor tumora na terapiju (15,16). Može se mjeriti mitotskim indeksom, *flow* citometrijom, image analizom, imunohistokemijski dokazom proliferacijskih markera (PCNA, Ki67) (15,16). Proto-onkogeni su geni koji normalno potiču stanični rast (15,16). Promjene u njihovoj strukturi pretvaraju ih u onkogene koji kodiraju proteine promijenjene strukture ili količine (15,16).

Najčešće ispitivane promjene u karcinogenezi karcinoma grkljana obuhvaćaju istraživanje onkogeno (npr. p53, ciklin D1, nm23), proliferacijskih markera (npr. PCNA, Ki-67, EGFR) (15,16). Prekomjerna izražajnost p53 proteina, koji ima biološku ulogu u apoptozi, smatra se neovisnim prediktivnim faktorom za pojavu recidiva, ali i odgovora na radioterapiju (15,16). Izražajnost ciklina D1 često se nađe rano u tijeku bolesti, a označen je kao marker agresivnosti s utjecajem na preživljenje (15,16).

Za sada se izražajnost EGFR smatra najpouzdanijim prognostičkim molekularnim markerom za procjenu preživljenja bez recidiva bolesti i metastaza (27-32).

U tumorskim stanicama mogu se detektirati metaloproteinaze, hijaluronidaze i katepsin D kao molekule odgovorne za degradaciju ekstracelularnog matriksa, a time i u svezi s invazijom i metastaziranjem. Postoje istraživanja utjecaja E-cadherina kao supresora invazivnosti, te S100A2 onkosupresora i njihovog utjecaja na agresivnost tumora (33).

Do sada su različiti noviji prognostički čimbenici pokazali određenu prognostičku vrijednost (34-37).



## 1.6. E-cadherin

Cadherini su skupina transmembranskih proteina koji imaju važnu ulogu u adheziji stanica osiguravajući njihovu povezanost, zaštićeni su kalcijским ionima od proteolize, a u odustnosti kalcijских iona bivaju brzo razgrađeni (38-43). Sadrže lance aminokiselina te ekstracelularno područje (N terminal) koje je važno za homofiličko vezivanje i citoplazmatski dio (C terminal) koji, u interakciji sa citoskeletnim proteinima, preko intracelularnih proteina, tj. catenina formiraju cadherin-catenin kompleks (38-43).

Cadherini se dijele u dvije evolucijski različite porodice: cadherini tipa 1 (klasični cadherini) i cadherini tipa 2 (38-43). Cadherini tipa 1 (klasični cadherini) ostvaruju međustaničnu interakciju homofilnim tipom vezanja, tj. isti dio molekule na jednoj stanici veže s istim dijelom molekule na drugoj stanici (38-43). Dok cadherini tipa 2 (desmosomalni cadherin), koji su smješteni u desmosomima, gdje su povezani s intermedijarnim filamentima, pokazuju vrlo malo homologije s onima klasičnog tipa te posjeduju neke zajedničke karakteristike koje nisu nađene u cadherina tipa 1 (38-43).

Klasične cadherine čine E, N, P, R, B cadherini, a ostali članovi porodice cadherina su desmogleini i desmokolini (38-43).

Adhezione molekule su uključene u procese morfogeneze, normalnog rasta, ekstravazacije leukocita, upalne procese, koagulaciju krvi i cijeljenje (41). Interakcija među stanicama ili između stanica i ekstracelularnog matriksa koja održava na okupu grupu stanica uvjetovana je raznim adhezijskim molekulama, te njihova deregulacija ima važnu ulogu u nastanku procesa karcinogeneze kao i u invazivnosti i metastaziranju (41).

Adhezione molekule su uključene u procese regulacije rasta tumora tako da reguliraju balans između staničnog rasta i odumiranja, ili kontroliraju angiogenezu koja je odgovorna za rast tumora i metastaziranje (41). Adhezijske molekule čini 5 velikih porodica: integrini, cadherini, imunoglobulin gen superfamilija (IgSF), selektini i CD44 (41).

Različiti tipovi cadherina se mogu naći na različitim lokacijama (38,39). To su E-cadherin (epitelni cadherin ili uvomorulin), P cadherin (placentalni cadherin), N cadherin (neuralni cadherin), L-CAM (adhezijska molekula stanica jetre) (38,39). Cadherini su vežu samo unutar iste skupine (dakle E-cadherin za molekule E-

cadherina), pa zbog toga stanice s istim tipom molekule cadherina imaju tendenciju povezivanja tijekom razvoja, dok stanice sa različitim tipovima molekule cadherina imaju sklonost razdvajanju (38,39).

E-cadherin (epitelni cadherin) je 120 k peptid čiji je gen lokaliziran na 16q22 kromosomu, regiji inače važnoj po kromosomskoj translokaciji u genezi tumora glave i vrata (43). Sastoji se od jedne velike izvanstanične domene, transmembranskog segmenta i kratke citoplazmatske domene (43). Funkcija E-cadherina je regulirana preko –COOH terminalnog unutarstaničnog područja, preko alfa, beta i gama catenina koji se povezuju s elementima citoskeleta stanice i međusobno surađuju (43,44). Ovisna je također i o kalcijevim ionima (43,44). E-cadherin je vezan na citoplazmatsku stranu catenina koji reagiraju sa aktinom u citoskeletu i sa jezgrom stanice (43, 44).

E-cadherin sadrži 5 ponavljajućih cadherina (EC1 ~ EC5) u ekstracelularnom prostoru, jedan transmembranski prostor i intracelularni prostor koji veže p120-catenin i beta catenin (43,44). E-cadherin je izražen u epitelu gdje se konstantno regenerira unutar 5 sati poluživota na površini stanice (44).

Mutacija gena za E-cadherin te proteine alfa i beta catenina koji vezuju E-cadherin za aktinske filamente, važna je za poremećenu izražajnost E-cadherina (40). Kada je E-cadherin aktivan, epitelne stanice, uključujući stanice tumora, ne mogu razoriti njihove međusobne veze (40). Smanjena izražajnost E-cadherina može biti povezana sa genskom mutacijom uslijed delecije kromosoma, gubitka heterozigotnosti ili gubitkom alela (41). Mutacija gena za E-cadherin može uzrokovati citoplazmatsku akumulaciju defektnog E-cadherina koji se ne može transportirati u membranu stanice (41). Transkripcijska inaktivacija E-cadherina nalazi se često u tumorskoj progresiji i uključuje genetske i epigenetske događaje (40).

Izražajnost E-cadherina u tumorskim stanicama regulirana je cpG metilacijom (40). Cadherini djeluju direktno s produktima onkogeneze, c-erb B-2 proteinima i EGFR, a preko beta catenina s tumor supresor genima i APC proteinima, što može biti važan signal prijenosnog puta (40). Takav suprimirani E-cadherin može biti pokretač “oslobađanja“ stanica karcinoma, tj. pucanja veza među stanicama tumora (40). Smanjuje se adhezivnost među stanicama unutar tkiva, što rezultira povećanom staničnom pokretljivošću i omogućuje tumorskoj stanici da prijeđe bazalnu membranu i invadira okolno tkivo (40). Radi se o tranziciji karcinoma *in situ* u invazivni karcinom, a povezuje se i s metastaziranjem (42,45,46).

Liu sa suradnicima je ispitivao 38 slučajeva pločastih karcinoma glasiljki te utvrdio da je ekspresija E-cadherina povećana u karcinomima *in situ* i mikroinvazivnim karcinomima, te dobro diferenciranim pločastim karcinomima (47,48). Za razliku od toga, u invazivnim i slabije diferenciranim pločastim karcinomima ekspresija E-cadherina bila je znatno manja (47,48).

Smanjena ekspresija E-cadherina sprječava terminalnu diferencijaciju stanica te omogućuje njihovu stalnu proliferaciju (45,46). Tako su Frixen i suradnici u svojoj studiji pokazali da E-cadherin djeluje kao marker diferencijacije brojnih karcinoma u ljudi, te da gubitak izražajnosti E-cadherina može potaknuti dediferencijaciju i invazivnost karcinoma (33). Time se sugerira da E-cadherin djeluje i kao supresor invazivnosti (33).

Brojni su autori potvrdili E-cadherin kao marker diferencijacije te ustanovili da se njegova izražajnost gubi kako se pločasti karcinom dediferencira (45,46,49-51). S obzirom na povezanost E-cadherina s diferenciranošću stanica i invazivnošću karcinoma, ne čude rezultati studija koji nedvojbeno povezuju izražajnost E-cadherina s kliničkim parametrima kao što su uznapredovali stadiji bolesti, slabiji odgovor na terapiju, veća stopa recidiva te lošija prognoza karcinoma glave i vrata (47,48,52,53).

Rodrigo i suradnici ukazuju da odsutnost, tj. smanjenu izražajnost E-cadherina nalazimo pri većem patohistološkom gradusu, u višem stadiju bolesti, pri prisutnim metastazama, te u onih sklonih recidivu bolesti (49). I različiti su drugi autori također utvrdili da je smanjena izražajnost E-cadherina u korelaciji s nepovoljnijim patohistološkim karakteristikama tumora kao što su viši patološki stadij tumora, veći gradus tumora, zahvaćenost limfnih čvorova i prisutstvo udaljenih metastaza (54-56). Također je utvrđena povezanost s ranijim recidivima bolesti i kraćim preživljenjem bolesnika (54-56).

Ispitujući tumore glave i vrata utvrđeno je da smanjenje ekspresije E-cadherina može biti neovisan prediktor metastaziranja u limfne čvorove i biljeg u identificiranju klinički negativnog statusa limfnih čvorova vrata koji su rizični za okultne metastaze (47-51,57). Temeljem ovog zaključka mogu se definirati bolesnici koji bi imali koristi od elektivne disekcije vrata (47-51,57).

Provedena su istraživanja i na karcinomima drugih sijela (npr. jednjaka, debelog crijeva) koja također ukazuju na povezanost smanjene izražajnosti E-cadherina s povećanom agresivnošću karcinoma, njegovom slabijom diferenciranošću, sklonosti metastaziranju i agresivnijem ponašanju (58,59).

Sato i suradnici su tako u studiji na 134 bolesnika s karcinomom jednjaka utvrdili da smanjena izražajnost E-cadherina korelira sa povećanom sklonošću metastaziranja istoga (58).

U svojoj studiji na 130 bolesnika de Lima i suradnici su ispitali utjecaj izražajnosti E-cadherina u kolorektalnom karcinomu (59). Provedenim istraživanjem su prikazali da je izražajnost E-cadherina povezana s većim rizikom razvoja metastaza i s ranijim razvojem uznapredovale metastatske bolesti kolorektalnog karcinoma (59).

Kurtz i suradnici su utvrdili da je slabija izražajnost E-cadherina povezana s lošijom prognozom tumora grkljana i usne šupljine, iako nisu dokazali povezanost izražajnosti i metastaziranja u limfne čvorove (53).

Paksoy i suradnici su, pak, dokazali da je smanjena izražajnost E-cadherina povezana sa učestalijim metastaziranjem karcinoma grkljana (34).

Važan je i rezultat istraživanja Eriksena i suradnika koji ukazuju da gubitak E-cadherina predstavlja važan korak u povećavanju sposobnosti stanica da luče MMP-9 u svrhu degradacije proteina matriksa, omogućujući tako invaziju i metastaziranje (45,46).

Ovu povezanost do sada su u svojoj studiji o pločastom karcinomu jednjaka istraživali jedino Sato i suradnici, ukazujući da povećana ekspresija MMP-9 i redukcija E-cadherina korelira s metastazama u limfne čvorove (58).

## 1.7. Matriks metaloproteinaza-9 (MMP-9)

Matriks metaloproteinaze (MMP) čine obitelj proteolitičkih cink ovisnih enzima koji imaju bitnu ulogu u lokalnoj invaziji, te regionalnom i distalnom metastaziranju malignih tumora slamaajući komponente bazalne membrane i ekstracelularnog matriksa (24,60-64). MMP također utječe na rast tumora i na tumorsku neoangiogenezu (24,60-64).

Aktivnost MMP-a je regulirana na najmanje tri razine: transkripciji, proteolitičkoj aktivaciji zimogena i inhibiciji aktivnog enzima (24,65). MMP-i se aktiviraju plazminskom kaskadom (24,65). Većina MMP-a se sintetizira de novo, dok su MMP 8 i 9 pohranjeni u sekretornim granulama neutrofila i eozinofila. MMP se producira kao inaktivni, latentni zimogeni (24,65). Zimogeni imaju N-terminalne propeptide od približno 80 – 90 aminokiselina koji blokiraju aktivna mjesta MMP-a unutar katalitičke faze (domene) (24,65).

Uklanjanje propeptida proteolitičkim ili neproteolitičkim mehanizmima rezultira zimogenom aktivacijom i stjecanjem katalitičke sposobnosti (24,65). Većina MMP se otpušta u latentnom prekursorskom stadiju (zimogena forma), a aktivira se u izvanstaničnom matriksu (24,65). Jednom aktivni MMP je specifično inhibirani endogenim proteaza inhibitorima, tkivnim inhibitorima MMP-a (TIMP-s), od kojih su četiri identificirana (TIMP 1 - 4) (24).

Tkivni inhibitori MMP-a (TIMP-s) su mali proteini, 21 – 28 kDa (24,65). Produciraju ih keratinociti, fibroblasti, osteoblasti i endotelijalne stanice (24,65). TIMP 3 inhibira proteolitičku aktivnost MMP-9 (24,65).

Naglasiti je da u tumoru postoji neravnoteža između aktivnih MMP-a i TIMP-sa, što može voditi pojačanoj aktivnosti enzima MMP-a i sklonosti metastaziranju (24). Prisustvo aktivnih MMP ovisi o količini aktivacije zimogena i razini endogenog TIMP-sa (24). Kritički moment tumorske invazije i inicijacija metastatske kaskade je, po dosadašnjim spoznajama, interakcija tumorske stanice s bazalnom membranom (66).

Bazalna membrana se sastoji od kolagena tip IV, laminina, antactina, proteoglikana i glikoaminoglikana, ali između svih komponenti kolagen tip IV predominira i prepoznat je kao barijera penetraciji tumorskih stanica u matriks (61,67).

Benigne lezije su karakterizirane kontinuiranom bazalnom membranom koja odvaja potencijalno tumorogeni epitel od strome (66,67). Invazivne lezije, dakle karcinomi, posjeduju diskontinuiranu bazalnu membranu sa zonama gubitka matriksa u području invazivnog tumorskog rasta (66,67). Degradacija bazalne membrane i ekstracelularnog matriksa je ključna za invaziju i metastaziranje malignih stanica, tumorski rast i angiogenezu (66,67).

Postoje barem tri koraka u ovome slijedu: prvi je vezivanje za ekstracelularni matriks, drugi je stvaranje proteolitičkog defekta u ekstracelularnom matriksu, a treći je korak migracija kroz proteolitički modificirani matriks (66).

MMP se dijeli u četiri podgrupe: Kolagenaze (MMP 1, 8 i 13), Stromelizini (MMP 3, 7, 10, 11 i 19), Gelatinaze (MMP-2 – gelatinaza A, MMP-9 – gelatinaza B), *Membrane-type* MT-MMP (MMP 14, 15, 16, 17, 24). Pojedini MMP-i se ne mogu svrstati u ove četiri grupe; to su: MMP-12, MMP-18, MMP-19, MMP-20 (61,68).

Matriks metaloproteinaza-9 (MMP-9) se nalazi u poskupini gelatinaza, a naziva se i gelatinaza B, 20q12-13 (61,68). Gelatinaze degradiraju denaturirani kolagen, pogotovo kolagen IV. bazalne membrane (61,65,69,70). Također, imaju afinitet i za ostale komponente bazalne membrane (fibronektin, laminin) (61,65,69,70).

Utvrđeno je da je izražajnost MMP-a tipično niska ili odsutna u normalnim stanicama odraslog organizma (65). MMP se nakon inicijacije tumora pojavljuje i na epitelnim i na stromalnim stanicama uzrokujući promjene u ekstracelularnom matriksu, što rezultira otpuštanjem ekstracelularnog faktora rasta stimulirajući proliferaciju, stromalni odgovor i regrutiranje upalnih stanica (67,71). Usporedo s time, tumorska je neoangiogeneza olakšana djelovanjem MMP-a, jer potiče otpuštanje angiogenih faktora i remodeliranje adhezivnosti tkiva (67,71). MMP-9 može potaknuti generiranje angiostatina iz plazminogena i tako sudjeluje u neovaskularizaciji (67,71,72). Također je uočeno da MMP igra važnu ulogu u udaljenoj kolonizaciji metastaza tumora (67,71,72).

Čitav niz autora je ispitivao utjecaj MMP-9 u odnosu na stupanj diferencijacije i tumorsku progresiju u karcinomima usne šupljine, jednjaka, pluća, mokraćnog mjehura, jajnika, papilarnom karcinomu štitnjače te kralježnice (73-80).

Tako su Ikebe i suradnici u svojoj studiji ustanovili da visoko invazivni oralni karcinomi pokazuju povećanu aktivnost MMP-9 (73).

Kodate i suradnici, ispitujući izražajnost MMP-9 u oboljelih od karcinoma pluća ustanovili su veću izražajnost MMP-9 u slabije diferenciranim karcinomima, te da je prognoza preživljenja u takvih bolesnika bila lošija (74).

Papathoma i suradnici, u svom istraživanju na bolesnicima sa tumorom mokraćnog mjehura, pokazali su da izražajnost MMP-9 raste s gradusom i invazivnošću tumora (75).

Ispitujući u svojoj studiji bolesnike oboljele od tumora jajnika, Schmalfeldt i suradnici su pokazali da izražajnost MMP-9 raste s rastom malignog potencijala tumora jajnika (76).

Maeta i suradnici su u svom istraživanju pokazali da je povećana izražajnost MMP-9 povezana s većom invazivnošću i većom sklonosti metastaziranja papilarnog karcinoma štitnjače (77).

Kurahara i suradnici, u studiji na oboljelima od pločastog karcinoma usne šupljine, pokazuju da invazivniji pločasti oralni karcinomi i oni skloniji metastaziranju pokazuju veću izražajnost MMP-9 (78).

Ohashi i suradnici, pak, u istraživanju na 148 bolesnika s karcinomom jednjaka, dokazali su usku povezanost povećanog stupnja izražajnosti MMP-9 s dubinom invazije i venskom invazijom pločastog karcinoma jednjaka (79).

Gokaslan i suradnici su istraživali izražajnost MMP-9 u bolesnika s metastatskim i primarnim tumorima kralježnice i zaključili da metastaze tumora pluća i melanoma u kralježnicu pokazuju veći stupanj izražajnosti MMP-9 u usporedbi sa metastazama karcinoma dojke, štitnjače i bubrega u kralježnicu, kao i u usporedbi sa samim primarnim tumorom kralježnice (80). Poznato je da metastaze tumora pluća i melanoma u kralježnicu imaju vrlo agresivan tijek bolesti pa oboljeli imaju znatno kraće preživljenje, a ovom studijom je prikazano da takvi bolesnici imaju i veći stupanj izražajnosti MMP-9 (80). Isto tako, autori općenito zaključuju, na osnovi rezultata ove studije, da povećana izražajnost MMP-9 pridonosi povećanoj sklonosti metastaziranja u kralježnicu svih tumora ispitivanih u ovoj studiji, te da veći stupanj izražajnosti MMP-9 korelira s većom invazivnošću i metastatskih i primarnog tumora kralježnice (80).

Povećana ekspresija MMP-9 dokazana je u karcinomu debelog crijeva i korelira s Dukes stadijima i prisustvom udaljenih metastaza (81,82). Grupa autora je ispitala maligne tumore gušterače i mokraćnog mjehura te je također utvrđeno da se MMP-9 može koristiti kao biljeg za predviđanje recidiva (83,84).

Mali se broj autora do danas bavio analizom utjecaja MMP-9 u pločastom karcinomu grkljana, ili su studije koje su izrađene bile dizajnirane na manjem broju bolesnika. Ispitujući odnos displazije, kao preneoplastične promjene, u odnosu na invazivni planocelularni karcinom glave i vrata, Loyo i suradnici su ustanovili statistički značajnu razliku u ekspresiji MMP-9, u smislu pojačane ekspresije u invazivnom planocelularnom karcinomu (85).

Da je MMP uključen u invaziju i metastaziranje planocelularnog karcinoma glave i vrata uočio je i O-Charoenrat sa suradnicima, te utvrdio da se njegova izražajnost može odrediti imunohistokemijskim metodama (68).

Vihinen i suradnici su u svojoj studiji dokazali postojanje povezanosti gradusa i izražaja MMP-9, pa je, prema njihovim rezultatima, MMP-9 izraženiji u *high-grade* nego u *low-grade* tumorima (72).

Bogusiewicz i suradnici, ispitujući tumore III. i IV. stadija pločastog karcinoma grkljana na ukupno 23 pacijenta, utvrdili su da je stupanj izražajnosti i aktivnosti MMP-9 proporcionalan s invazivnošću i metastatskim potencijalom tumora (86). Isti autori također otkrivaju da se MMP-aze stvaraju u neoplastičnim stanicama, stromalnim fibroblastima, endotelijalnim stanicama i leukocitima, što govori u prilog međustaničnoj interakciji na razini maligne progresije, stromalnog odgovora, angiogeneze i upalnog odgovora (86).

Gou i suradnici su u svojoj studiji ukazali na pozitivnu korelaciju između pojačane izražajnosti MMP-9 i stadija bolesti, te sklonosti metastaziranju (87). Isti autori su u studiji pokazali da je pojačana izražajnost MMP-9 povezana s kraćim vremenom preživljenja bolesnika (87).

Wittekindt i suradnici su dokazali značajnu korelaciju pojačane izražajnosti MMP-9 i patohistološkog gradusa (stupnja diferencijacije), ali nisu našli korelaciju izražajnosti MMP-9 sa stadijem bolesti, sklonosti metastaziranju i sklonosti recidivu tumora (88).

Značajnu korelaciju u izražajnosti MMP-9 i ukupnog preživljenja u studiji na 217 bolesnika s karcinomima glave i vrata dokazuju Smilek i suradnici (89).

Za razliku od navedenih, postoji studija Liua i suradnika koji nisu pronašli značajnu korelaciju između izražajnosti MMP-9 i kliničko-patohistoloških karakteristika planocelularnog karcinoma (histološkog gradusa, TNM kliničkog stadija bolesti, primarnog sijela) (90).



## **2. CILJEVI I HIPOTEZE**

### **2.1. CILJEVI**

Ispitati ulogu matriks metaloproteinaze-9 (MMP-9) i E-cadherina u bolesnika s pločastim karcinomom grkljana.

Kako bismo ostvarili zadani opći cilj, postavljamo dva podcilja:

1. Ispitati povezanost izražajnosti matriks metaloproteinaze-9 (MMP-9) i E-cadherina s histopatološkim i kliničkim osobinama pločastog karcinoma grkljana.
2. Ispitati značajnost izražajnosti matriks metaloproteinaze-9 (MMP-9) i E-cadherina na prognozu i preživljenje bolesnika.

### **2.2. HIPOTEZE**

1. Pretpostavljamo da će bolesnicima s pločastim karcinomom grkljana nepovoljnijih histopatoloških i kliničkih osobina izražajnost matriks metaloproteinaze-9 (MMP-9) biti povećana, a E-cadherina smanjena.
2. Ako se u navedenom pločastom karcinomu grkljana nađe smanjena izražajnost E-cadherina i pojačana izražajnost MMP-9, očekivano preživljenje ove skupine bolesnika bit će kraće, što može utjecati na agresivniji pristup liječenju ove skupine bolesnika jer predstavlja mogući nepovoljan prognostički čimbenik.

### 3. METODE I ISPITANICI

#### 3.1. ISPITANICI

U istraživanje smo uključili 196 ispitanika s pločastim karcinomom grkljana operiranih u Klinici za bolesti uha, grla i nosa i kirurgiju glave i vrata Kliničkog bolničkog centra Split u periodu od 1. siječnja 2000. do 31. prosinca 2009. godine.

Klinički podatci prikupljeni su iz povijesti bolesti pacijenata pohranjenih u arhivu Klinike za bolesti uha, grla i nosa i kirurgiju glave i vrata KBC Split, te histoloških nalaza pohranjenih u bazi podataka Kliničkog zavoda za patologiju, citologiju i sudsku medicinu KBC Split.

Iz povijesti bolesti i patohistoloških izvješća dobili smo podatke o dobi i spolu bolesnika, pušenju i konzumaciji alkohola, smještaju tumora, stupnju diferencijacije tumora, veličini primarnog tumora, prisutnosti metastaza u regionalnim limfnim čvorovima, stadiju bolesti, udaljenim metastazama, recidivu bolesti, primijenjenom liječenju

Također, u matičnim uredima smo dobili podatke o preživljavanju i uzroku smrti, dakle statusu ispitanika, te smo bolesnike podijelili prema sljedećem modelu: 1 - bolesnik umro od osnovne bolesti; 2 - bolesnik umro od druge bolesti; 3 - živ.

Arhivirani histološki preparati su pregledani, a potom su se odabrani histološki rezovi imunohistokemijski obojali, te smo analizirali postojanje izražajnosti E-cadherina i matriks metaloproteinaze-9 (MMP-9).

Istraživanje smo proveli na deparafiniziranim rezovima operacijskog materijala pločastog karcinoma grkljana dijagnosticiranih i liječenih u KBC-u Split u razdoblju od 1. siječnja 2000. do 31. prosinca 2009. godine. Preparate su pregledala dvojica patologa uz usklađivanje kvantifikacije (*Fleiss'kappa index* podudarnosti očitavanja  $> 95\%$ ,  $\kappa=0,95$ ).

U sljedećoj tablici (Tablica 1) prikazana je raspodjela ispitanika prema spolu i dobi, gdje su ispitanici u dobnoj strukturi od 37 do 88 godina s prosječnom vrijednošću od 65 godina starosti.

Iz Tablice 1 je također vidljivo da je većina bolesnika bila muškog spola, tj. njih 189 (96,4 %), a žena je bilo samo 7 (3,6%).

Tablica 1. Raspodjela bolesnika po spolu i dobi

|        |           | N   | %     | Kumulativni % |
|--------|-----------|-----|-------|---------------|
| Spol   | Žene      | 7   | 3,6   |               |
|        | Muškarci  | 189 | 96,4  |               |
| Dob    | do 40     | 2   | 1,0   | 1,0           |
|        | 41 do 60  | 68  | 34,7  | 35,7          |
|        | 61 do 80  | 119 | 60,7  | 96,4          |
|        | 81 i više | 7   | 3,6   | 100,0         |
| Ukupno |           | 196 | 100,0 |               |

### 3.2. METODE

Imunohistokemijskom metodom odredili smo izražajnost E-cadherina i MMP-9 u tumorskim stanicama.

Analizom patohistološkog materijala u bolesnika s poznatim prognostičkim čimbenicima (stadij bolesti i gradus) i poznatim tijekom bolesti (podatak o recidivu bolesti, diseminaciji, preživljenju) pokazali smo izražajnost E-cadherina i matriks metaloproteinaze-9 (MMP-9).

Uključni kriteriji:

- Patohistološka dijagnoza planocelularnog karcinoma grkljana, R0, M0.
- Dostupan materijal za analizu (parafinske kocke tumora iz baze podataka Kliničkog zavoda za patologiju, citologiju i sudsku medicinu KBC Split).
- Dostupan podatak o stadiju bolesti, patohistološkom gradusu u trenutku postavljanja dijagnoze (C4).
- Poznat tijek bolesti (podatak o recidivu, diseminaciji).
- Podatak o datumu i uzroku smrti (matični uredi, povijest bolesti, Registar za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo).

Isključni kriteriji:

- Patohistološka dijagnoza koja nije planocelularni karcinom grkljana, uključivo verukozni karcinom grkljana, R (X, 1, 2), M 1.
- Nedostupan, neadekvatan materijal za analizu (parafinske kocke tumora iz baze podataka Kliničkog zavoda za patologiju, citologiju i sudsku medicinu KBC Split).
- Nedostupan podatak o stadiju bolesti, patohistološkom gradusu (C4).
- Nepoznat tijek bolesti (nedostupan podatak o recidivu, diseminaciji).
- Nepoznat podatak o datumu i uzroku smrti (matični uredi, povijesti bolesti, Registar za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo).

Stupnjevanje izražajnosti E-cadherina i MMP-9 izrazili smo kao postotak obojenih tumorskih stanica u cjelokupnom materijalu, a granična vrijednost pozitiviteta je 10% za oba navedena biljega. Korištena je standardna metoda imunohistokemijskog bojanja E-cadherina i MMP-9, koja se izražavala sustavom mjerenja razine izražajnosti od 0 do 2, i to: 0 - odsutnost bojanja, 1 - blago bojanje u > 10%, 2 - intenzivno bojanje u > 10% za oba biološka markera. Zbog potreba analize koekspresije E-cadherina i MMP-9, pozitivan E-cadherin i MMP-9 su smatrani 1 i 2 (91,92).

Metoda detekcije izražajnosti E-cadherina i MMP-9 je semikvantitativna, uz usklađivanje kvantifikacije od strane dva patologa (*Fleiss'kappa index* podudarnosti očitavanja > 95%,  $\kappa=0,95$ ).

### 3.2.1. Imunohistokemijski postupci

Tkivo za histološku analizu uzeli smo iz operativnog materijala, fiksirali u 4% puferiranom formalinu 24 sata, ukapali u parafin te rezali u rezove debljine 3-5 mikrona, a potom obojili standardnom metodom hemalaun eozin (HE).

Odabrali smo histološke preparate; njihove smo parafinske kocke ponovo rezali te imunohistokemijski pripravili.

Za oba monoklonalna antitijela odabrali smo istog proizvođača: E-cadherin NCH-38 (*monoclonal mouse, antihuman*; DAKO Denmark, Glostrup) u razrjeđenju 1:200; MMP-9 A0150 (*polyclonal rabbit, antihuman*; DAKO Denmark, Glostrup) u razrjeđenju 1:75.

Oba su imunohistokemijska bojanja učinjena u zatvorenom sustavu s Autostainer (DAKO, Danska) koristeći standardnu imunoperoksidaza avidin-biotin metodu.

Stupnjevanje izražajnosti E-cadherina odnosi se na membransku obojenost tumorske stanice (91):

0 - odsutnost bojanja,

1 - blago bojanje u > 10%,

2 - intenzivno bojanje u > 10% .

Pozitivna kontrola je tkivo dojke (preporuka proizvođača).

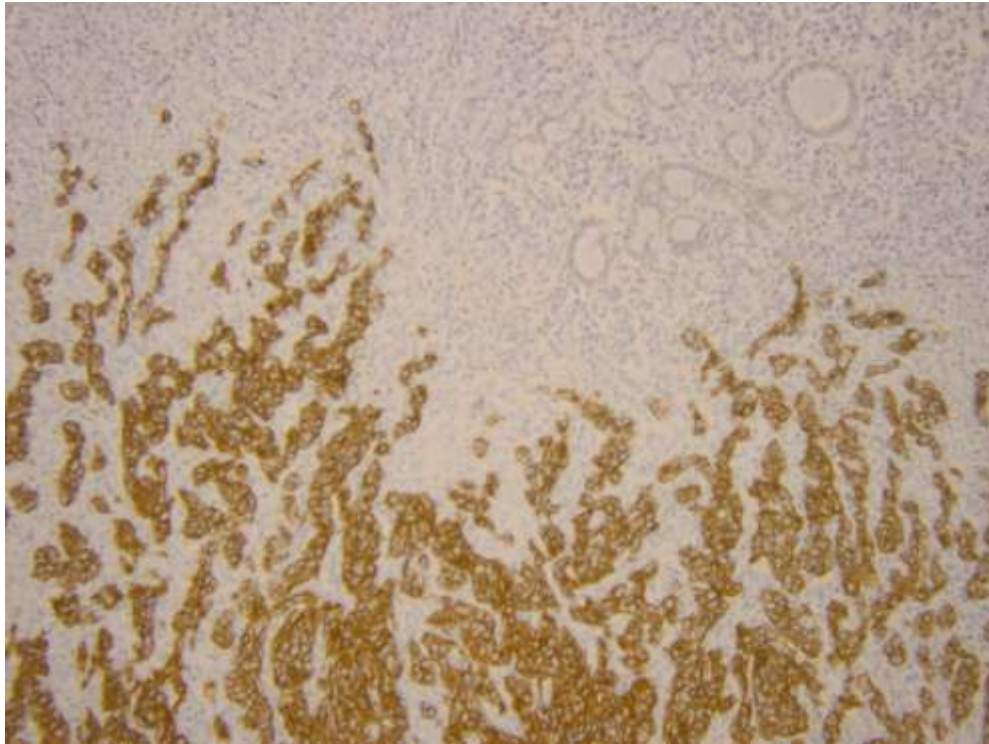
Stupnjevanje izražajnosti MMP-9 odnosi se na citoplazmatsku obojenost tumorske stanice (92):

0 - odsutnost bojanja,

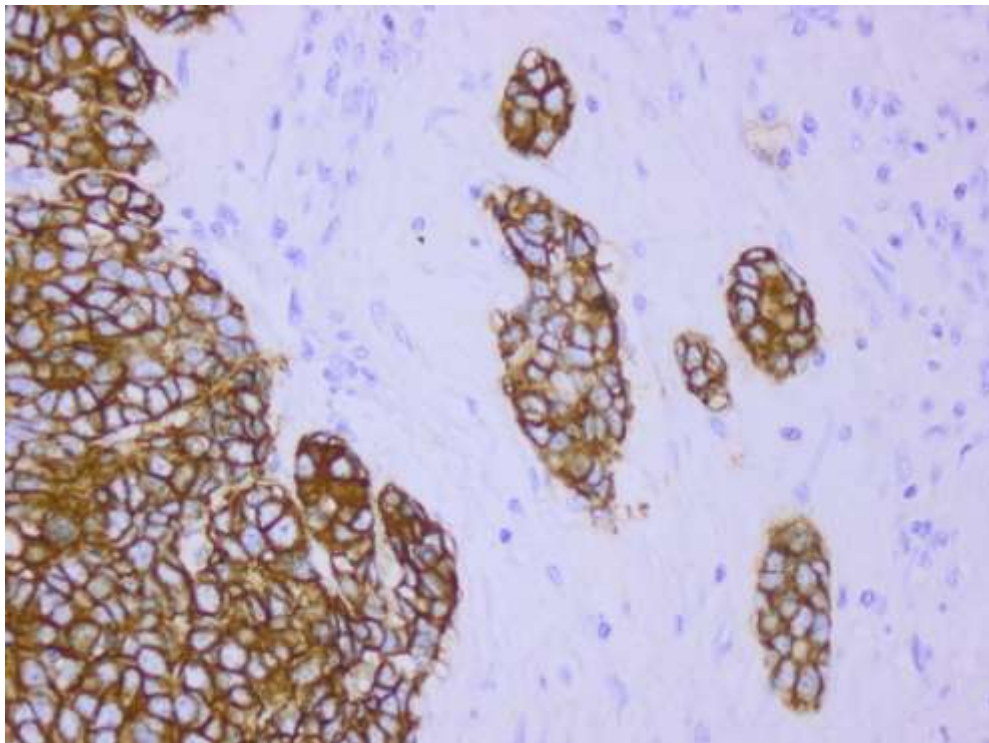
1 - blago bojanje u > 10%,

2 - intenzivno bojanje u > 10% .

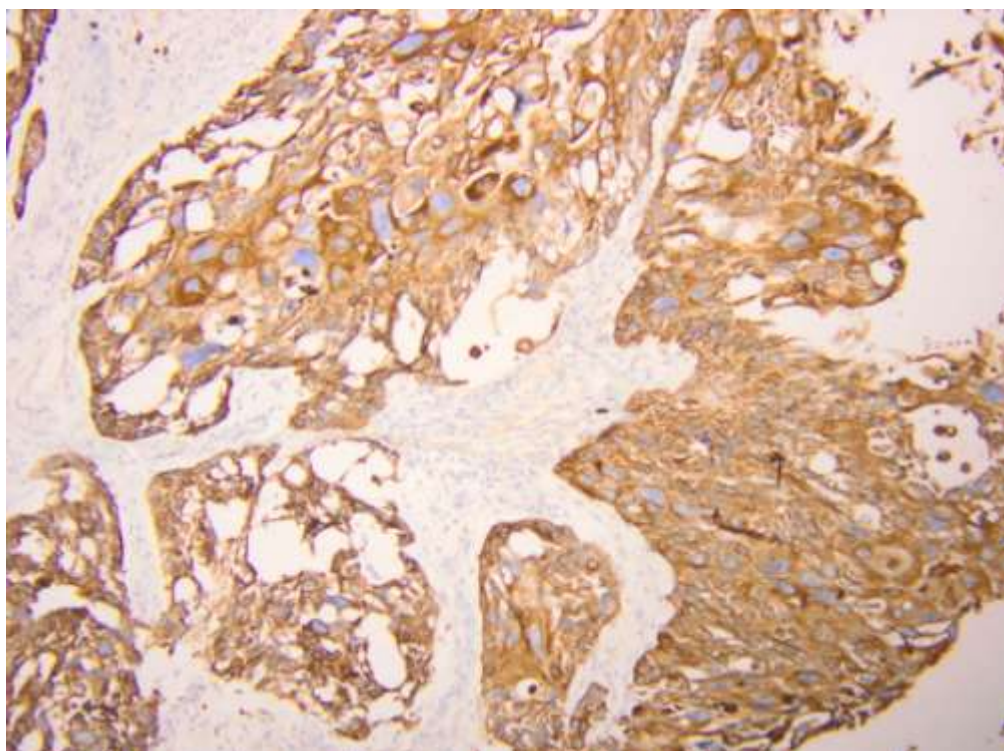
Pozitivna kontrola je zdravo plućno tkivo (preporuka proizvođača).



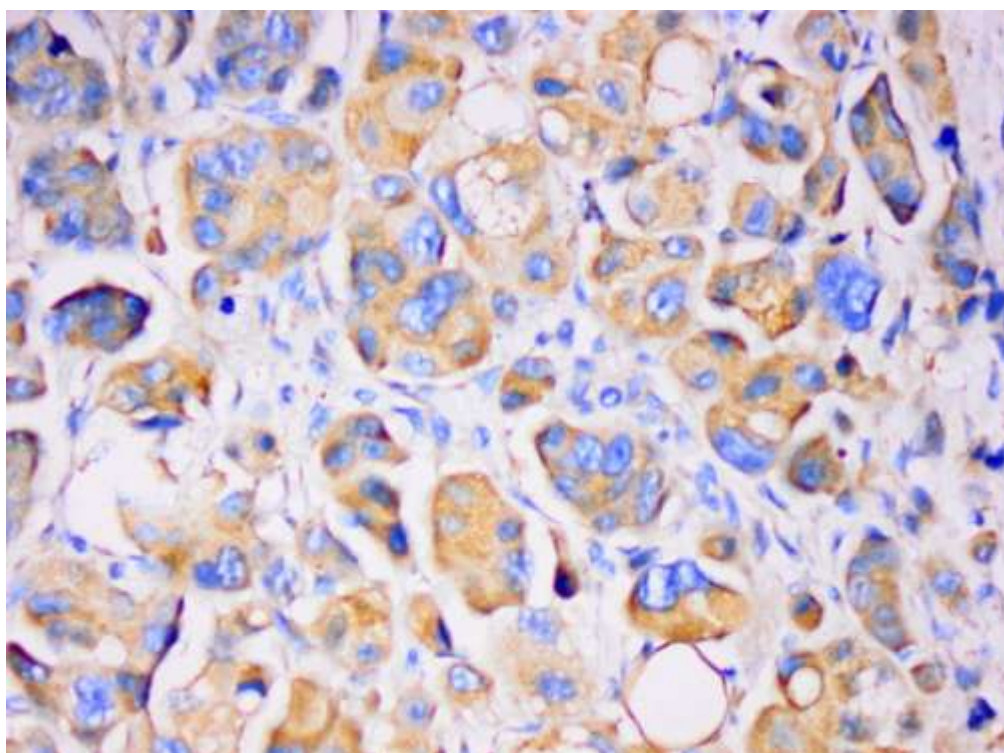
Slika 1. E-cadherin (intenzivno bojanje u > 10%, x 40)



Slika 2. E-cadherin (intenzivno bojanje u > 10%, x 100)



Slika 3. MMP-9 (intenzivno bojanje u > 10%, x 100)



Slika 4. MMP-9 (intenzivno bojanje u > 10%, x 400)



### 3.2.2. Statistička obrada podataka

Rezultate smo prikazali tablično i grafički s pripadajućim pokazateljima opisne statistike (učestalosti i udjeli za kategorijske varijable, te rasponi i mjere centralne tendencije za kvantitativne varijable). U analizi i obradi podataka koristili smo Excel 2010 (MS Office 2010, Microsoft, USA) i Statistica 10.0 (StatSoft Inc., Tulsa, USA). Povezanost pretpostavljenih prediktora/varijabli (varijable kliničkih osobina, patohistološke osobitosti s izražajnošću matriks metaloproteinaze-9 (MMP-9) i E-cadherina) istražili smo hi-kvadrat ( $\chi^2$ ) testom, tj. *Fisher exact* testom prema potrebi. Također, i sve druge usporedbe ili analize u kojima imamo kvalitativne/kategorijske varijable s učestalostima analizirali smo istovjetnim testovima (hi-kvadrat).

Prediktivnu vrijednost ispitivanih potencijalnih prediktora na ishod i preživljavanje procijenjenili smo Coxovom regresijskom analizom i analizom preživljenja (Kaplan-Meierova krivulja) uz pripadajuće Log rank analize (Mantel-Cox) izražene hi-kvadrat i p vrijednostima. Značajnosti pojedinih testova procijenjenili smo na razini od 95% ( $p < 0.05$ ).

## 4. REZULTATI

U istraživanju je, kako je i navedeno u poglavlju Metode i ispitanici, ukupno sudjelovalo 196 ispitanika koji su liječeni u Klinici za bolesti uha, grla i nosa i kirurgiju glave i vrata KBC Split. Uzorak je dominantno bio sačinjen od gotovo 100% muškaraca (n=189, 96,4%).

Važno je istaknuti da je od ukupnog broja ispitanika (n=196) njih čak 192 (98%) bilo pušača, a nešto više od 60% (n=118) onih koji učestalo konzumiraju alkohol.

Za potrebe ovog istraživanja, a sukladno postavljenim ciljevima i hipotezama, rezultati su podijeljeni u četiri odjeljka, i to:

- 1) Raspodjela ispitanika s obzirom na kliničke i patohistološke osobine.
- 2) Prikaz odnosa kliničkih i patohistoloških osobina.
- 3) Prikaz odnosa izražajnosti E-cadherina i MMP-9 i kliničkih i patohistoloških osobina.
- 4) Značajnost izražajnosti E-cadherina i MMP-9 na prognozu i preživljenje ispitanika.

### 4.1. Raspodjela ispitanika s obzirom na kliničke i patohistološke osobine

Iz Tablice 2 vidljivo je da u 78 (39,8%) ispitanika nalazimo tumor u predjelu glotisa, a u njih 60 (30,6%) u području supraglotisa. Subglotično smješten tumor nalazimo u 3 (1,5%), a transglotički u 55 (28,1%) bolesnika.

Tablica 2. Raspodjela bolesnika s obzirom na sijelo tumora u grkljanu

|   | Glotis | Supraglotis | Subglotis | Transglotis | Ukupno |
|---|--------|-------------|-----------|-------------|--------|
| N | 78     | 60          | 3         | 55          | 196    |
| % | 39,8%  | 30,6%       | 1,5%      | 28,1%       | 100,0% |

U Tablici 3 je prikazano da je 65 (33,2%) bolesnika imalo T1 tumor, T2 tumor njih 33 (16,8%), T3 tumor imalo je 75 (38,3%) bolesnika, a T4 tumor njih 23 (11,7%).

Tablica 3. Raspodjela bolesnika s obzirom na veličinu primarnog tumora (T)

| T      | N   | %     | Kumulativni % |
|--------|-----|-------|---------------|
| 1      | 65  | 33,2  | 33,2          |
| 2      | 33  | 16,8  | 50,0          |
| 3      | 75  | 38,3  | 88,3          |
| 4      | 23  | 11,7  | 100,0         |
| Ukupno | 196 | 100,0 |               |

Sljedeća tablica (Tablica 4) prikazuje da je 77 (39,3%) bolesnika imalo tumor patohistološkog gradusa I, 93 bolesnika (47,4%) gradusa II, a 26 (13,3%) bolesnika gradusa III.

Tablica 4. Raspodjela bolesnika s obzirom na patohistološki gradus

|   | Gradus |       |       | Ukupno |
|---|--------|-------|-------|--------|
|   | I      | II    | III   |        |
| N | 77     | 93    | 26    | 196    |
| % | 39,3%  | 47,4% | 13,3% | 100,0% |

Od ukupnog broja ispitanika 137 (69,9%) bolesnika nije imalo metastaza, 48 (24,5%) bolesnika je imalo unilateralne metastaze, a 11 (5,6%) bilateralne regionalne metastaze. (Tablica 5)

Tablica 5. Raspodjela bolesnika s obzirom na sklonost regionalnom metastaziranju

|   | Regionalno metastaziranje |                             |                            | Ukupno |
|---|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|--------|
|   | Bez dokazanih metastaza   | Unilateralno metastaziranje | Bilateralno metastaziranje |        |
| N | 137                       | 48                          | 11                         | 196    |
| % | 69,9%                     | 24,5%                       | 5,6%                       | 100,0% |

Tablica 6 prikazuje da je 58 (29,6%) bolesnika imalo stadij I bolesti, 19 bolesnika (9,7%) stadij II, 83 bolesnika (42,3%) stadij III, a 36 (18,4%) bolesnika imalo je stadij IV bolesti.

Tablica 6. Raspodjela bolesnika s obzirom na stadij bolesti

|   | I     | II   | III   | IV    | Ukupno |
|---|-------|------|-------|-------|--------|
| N | 58    | 19   | 83    | 36    | 196    |
| % | 29,6% | 9,7% | 42,3% | 18,4% | 100,0% |

Iz Tablice 7 razvidno je da su 144 (73,5%) bolesnika liječena kombinacijom operacije i radioterapije, 23 bolesnika (11,7%) liječena su samo operativno, a 29 (14,8%) bolesnika primarnom radio i/ili kemoradioterapijom.

Tablica 7. Raspodjela bolesnika s obzirom na primijenjenu terapiju

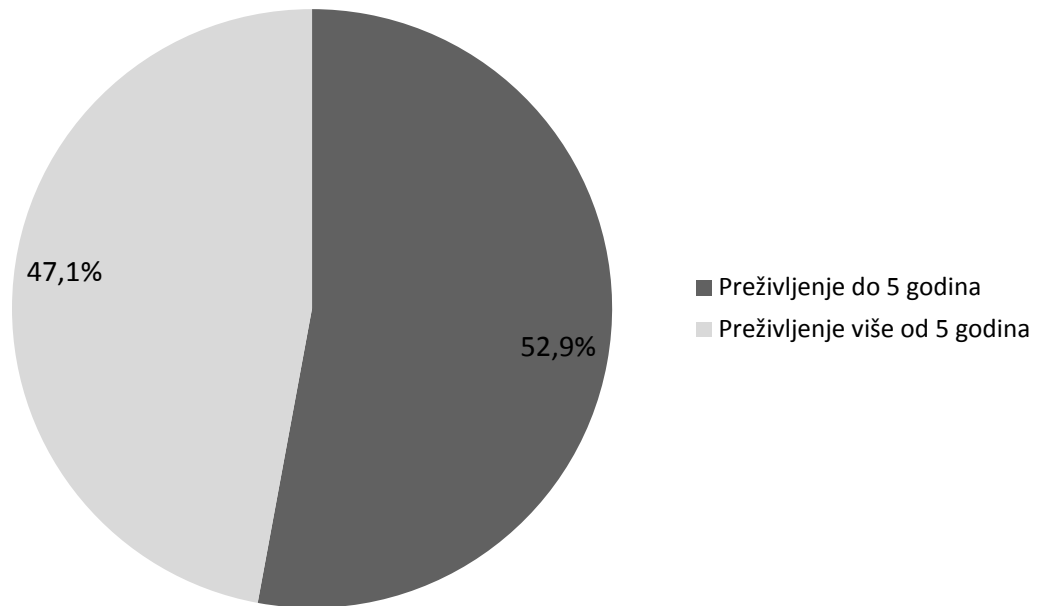
|   | Primijenjena terapija |                           |  | Ukupno |
|---|-----------------------|---------------------------|--|--------|
|   | Operacija             | Operacija + radioterapija | primarna radio i/ili kemoradioterapija |        |
| N | 23                    | 144                       | 29                                     | 196    |
| % | 11,7%                 | 73,5%                     | 14,8%                                  | 100,0% |

Iz Tablice 8 vidljivo je da 127 (64, %) bolesnika nije imalo recidiv bolesti, a 69 (35,2%) ih je imalo recidiv bolesti.

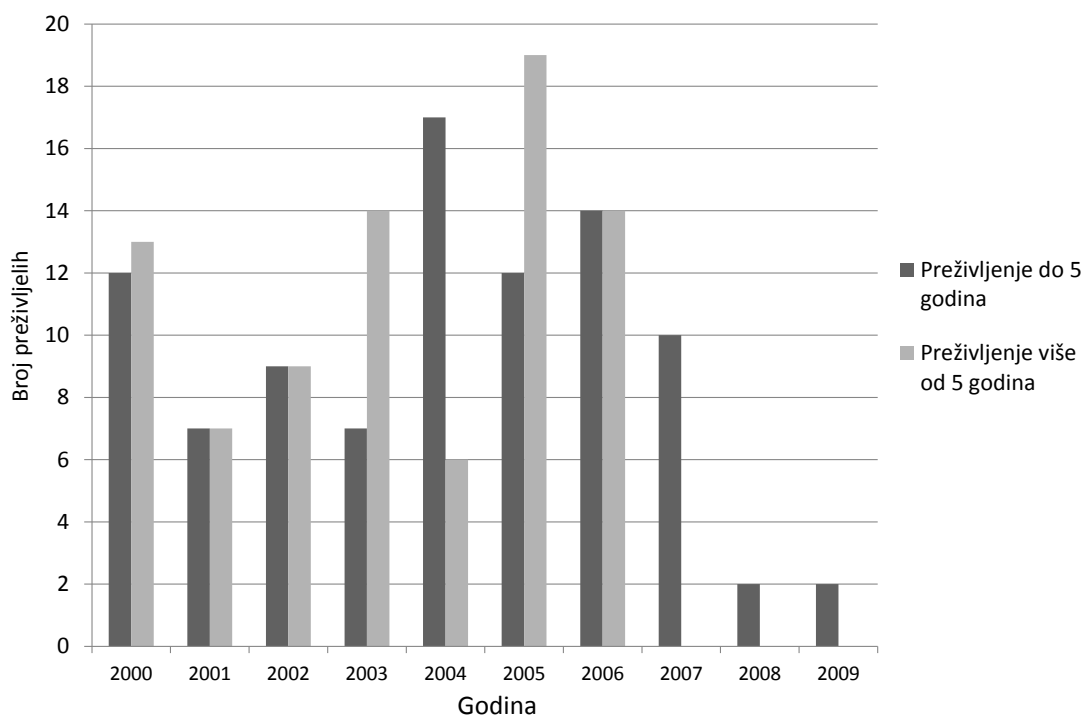
Tablica 8. Raspodjela bolesnika s obzirom na sklonost recidiviranju bolesti

|   | Recidiv bolesti |         | Ukupno |
|---|-----------------|---------|--------|
|   | Bez recidiva    | Recidiv |        |
| N | 127             | 69      | 196    |
| % | 64,8%           | 35,2%   | 100,0% |

U sljedećim slikama (Slika 5 i 6) je prikazana raspodjela bolesnika s obzirom na petogodišnje preživljenje. Ukupni broj ispitanika je 174 (od 196), jer za 2007., 2008., 2009. godinu ne možemo predvidjeti preživljenje preko pet godina. Preživjelih do pet godina je 92 bolesnika (52,9%), a preživjelih preko pet godina je 82 (47,1%) bolesnika.



Slika 5. Raspodjela bolesnika s obzirom na preživljenje



Slika 6. Raspodjela ispitanika s obzirom na preživljenje u desetogodišnjem razdoblju

Iz sljedeće tablice (Tablica 9) razvidno je da bolesnika umrlih od osnovne bolesti (1) imamo 67 (34,2%) , 40 (20,4%) bolesnika je umrlo od druge bolesti (2), dok je živih (3) 89 (45,4%).

Tablica 9. Raspodjela bolesnika s obzirom na status ispitanika

|   | Status ispitanika            |                            |          | Ukupno |
|---|------------------------------|----------------------------|----------|--------|
|   | (1) Umrli od osnovne bolesti | (2) Umrli od druge bolesti | (3) Živi |        |
| N | 67                           | 40                         | 89       | 196    |
| % | 34,2%                        | 20,4%                      | 45,4%    | 100,0% |

Iz Tablice 10 uočavamo da je E-cadherin bio negativan (0) u 57 (29,1%) bolesnika, blagog bojanja (izražajnosti) u > 10% (1) u 64 bolesnika (32,7%), dok je E-cadherin intenzivnog bojanja (izražajnosti) u >10% (2) imalo 75 (38,3%) bolesnika.

Tablica 10. Raspodjela bolesnika s obzirom na izražajnost E-cadherina

|   | E-cadherin            |                           |                                | Ukupno |
|---|-----------------------|---------------------------|--------------------------------|--------|
|   | (0) Odsutnost bojanja | (1) Blago bojanje u > 10% | (2) Intenzivno bojanje u > 10% |        |
| N | 57                    | 64                        | 75                             | 196    |
| % | 29,1%                 | 32,7%                     | 38,3%                          | 100,0% |

U sljedećoj tablici (Tablica 11) razvidno je da smo u skupini MMP-9 negativan (0) imali 101 (51,5%) bolesnika, u skupini blagog bojanja (izražajnosti) u > 10% (1) imali smo 33 (16,8%) bolesnika, dok smo pri MMP-9 intenzivnog bojanja (izražajnosti) u > 10% (2) imali 62 (31,6%) bolesnika.

Tablica 11. Raspodjela bolesnika s obzirom na izražajnost MMP-9

|   | MMP-9                 |                           |                                | Ukupno |
|---|-----------------------|---------------------------|--------------------------------|--------|
|   | (0) Odsutnost bojanja | (1) Blago bojanje u > 10% | (2) Intenzivno bojanje u > 10% |        |
| N | 101                   | 33                        | 62                             | 196    |
| % | 51,5%                 | 16,8%                     | 31,6%                          | 100,0% |

#### 4.2. Prikaz odnosa kliničkih i patohistoloških osobina

U sljedećoj tablici (Tablica 12) prikazan je odnos stadija bolesti i patohistološkog gradusa, iz koje je vidljivo kako smo u stadiju I imali 56,9% bolesnika s patohistološkim gradusom I. No u stadiju IV glavnina bolesnika, njih 77,7%, je imalo patohistološki gradus II i III. Povezanost između stadija bolesti i patohistološkog gradusa je statistički značajna ( $\chi^2=19,7$ ,  $df=6$ ,  $p=0,003$ ).

Tablica 12. Odnos stadija bolesti i patohistološkog gradusa

|                   |     |   | Gradus |       |       |        |
|-------------------|-----|---|--------|-------|-------|--------|
|                   |     |   | I      | II    | III   | Ukupno |
| Stadij<br>bolesti | I   | N | 33     | 23    | 2     | 58     |
|                   |     | % | 56,9%  | 39,7% | 3,4%  | 100%   |
|                   | II  | N | 10     | 8     | 1     | 19     |
|                   |     | % | 52,6%  | 42,1% | 5,3%  | 100%   |
|                   | III | N | 26     | 41    | 16    | 83     |
|                   |     | % | 31,3%  | 49,4% | 19,3% | 100%   |
|                   | IV  | N | 8      | 21    | 7     | 36     |
|                   |     | % | 22,2%  | 58,3% | 19,4% | 100%   |
| Ukupno            |     | N | 77     | 93    | 26    | 196    |
|                   |     | % | 39,3%  | 47,4% | 13,3% | 100%   |

Iz sljedeće tablice (Tablica 13) je razvidno da je sklonost recidiviranju veća što su patohistološki gradusi viši. Dakle, 85,5% bolesnika je imalo recidiv pri patohistološkom gradusu tumora II i III (umjereno i slabo diferenciran karcinom). Kod 52,8% bolesnika s patohistološkim gradusom I (dobro diferenciran karcinom) nismo našli recidiva bolesti. Ovaj odnos povezanosti je, kao i prethodni, statistički značajan, tj. gradus i recidiv su povezani na razini značajnosti od 95% ( $\chi^2=49,5$ ,  $df=2$ ,  $p<0,001$ ).



Tablica 13. Odnos sklonosti recidiviranju i patohistološkog gradusa

|         |    | Gradus |       |       |        |      |
|---------|----|--------|-------|-------|--------|------|
|         |    | I      | II    | III   | Ukupno |      |
| Recidiv | Ne | N      | 67    | 57    | 3      | 127  |
|         |    | %      | 52,8% | 44,9% | 2,4%   | 100% |
|         | Da | N      | 10    | 36    | 23     | 69   |
|         |    | %      | 14,5% | 52,2% | 33,3%  | 100% |
| Ukupno  |    | N      | 77    | 93    | 26     | 196  |
|         |    | %      | 39,3% | 47,4% | 13,3%  | 100% |

Više od 2/3 bolesnika, dakle njih 76,1%, umrlih unutar pet godina izražavalo je viši patohistološki gradus, dakle radilo se o umjereno i slabo diferenciranim tumorima. (Tablica 14) Analiza odnosa preživljenja bolesnika i patohistološkog gradusa pokazuje statistički značajnu povezanost ( $\chi^2=19,1$ ,  $df=2$ ,  $p<0,001$ ).

Tablica 14. Odnos preživljenja bolesnika i patohistološkog gradusa

|              |                | Gradus      |       |       |        |        |
|--------------|----------------|-------------|-------|-------|--------|--------|
|              |                | I           | II    | III   | Ukupno |        |
| Preživljenje | Do 5 godina    | N           | 22    | 48    | 22     | 92     |
|              |                | %           | 23,9% | 52,2% | 23,9%  | 100,0% |
|              |                | % od ukupno | 12,6% | 27,6% | 12,6%  | 52,9%  |
|              | Preko 5 godina | N           | 41    | 37    | 4      | 82     |
|              |                | %           | 50,0% | 45,1% | 4,9%   | 100,0% |
|              |                | % od ukupno | 23,6% | 21,3% | 2,3%   | 47,1%  |
| Ukupno       |                | N           | 63    | 85    | 26     | 174    |
|              |                | %           | 36,2% | 48,9% | 14,9%  | 100,0% |

Iz Tablice 15 je vidljivo da je 56,6% bolesnika umrlih unutar pet godina u trenutku postavljanja dijagnoze imalo uni ili bilateralne regionalne metastaze. Kod 95,1% bolesnika preživjelih preko pet godina nismo našli regionalno metastaziranje, pa je razumljivo da je povezanost statistički značajna ( $\chi^2=58,2$ ,  $df=2$ ,  $p<0,001$ ).

Tablica 15. Odnos preživljenja i sklonost regionalnom metastaziranju

|              |                |             | Regionalno metastaziranje |              |             | Ukupno |
|--------------|----------------|-------------|---------------------------|--------------|-------------|--------|
|              |                |             | Nema                      | Unilateralno | Bilateralno |        |
| Preživljenje | Do 5 godina    | N           | 40                        | 42           | 10          | 92     |
|              |                | %           | 43,5%                     | 45,7%        | 10,9%       | 100%   |
|              |                | % od ukupno | 23,0%                     | 24,1%        | 5,7%        | 52,9%  |
|              | Preko 5 godina | N           | 78                        | 4            | 0           | 82     |
|              |                | %           | 95,1%                     | 4,9%         | 0,0%        | 100%   |
|              |                | % od ukupno | 44,8%                     | 2,3%         | 0,0%        | 47,1%  |
| Ukupno       |                | N           | 118                       | 46           | 10          | 174    |
|              |                | %           | 67,8%                     | 26,4%        | 5,7%        | 100%   |

Iz sljedeće tablice (Tablica 16) je razvidno da je 83,7% bolesnika u III. i IV. stadiju bolesti umrlo unutar pet godina te je evidentno da je povezanost između preživljenja i stadija statistički značajna ( $\chi^2=53,4$ ,  $df=3$ ,  $p<0,001$ ).

Tablica 16. Odnos preživljenja bolesnika i stadija bolesti

|              |                |             | Stadij bolesti |       |       |       | Ukupno |
|--------------|----------------|-------------|----------------|-------|-------|-------|--------|
|              |                |             | I              | II    | III   | IV    |        |
| Preživljenje | Do 5 godina    | N           | 5              | 10    | 47    | 30    | 92     |
|              |                | %           | 5,4%           | 10,9% | 51,1% | 32,6% | 100%   |
|              |                | % od ukupno | 2,9%           | 5,7%  | 27,0% | 17,2% | 52,9%  |
|              | Preko 5 godina | N           | 42             | 7     | 29    | 4     | 82     |
|              |                | %           | 51,2%          | 8,5%  | 35,4% | 4,9%  | 100%   |
|              |                | % od ukupno | 24,1%          | 4,0%  | 16,7% | 2,3%  | 47,1%  |
| Ukupno       |                | N           | 47             | 17    | 76    | 34    | 174    |
|              |                | %           | 27,0%          | 9,8%  | 43,7% | 19,5% | 100%   |

U 70,7% bolesnika umrlih unutar pet godina imali smo recidiv bolesti, a 95,1% preživjelih preko pet godina nije imalo recidiv bolesti. (Tablica 17)

Povezanost između recidiva i preživljenja je statistički značajna ( $\chi^2=78,4$ ,  $df=3$ ,  $p<0,001$ ).

Tablica 17. Odnos preživljenja bolesnika i sklonost recidiviranju

|              |                |             | Recidiv |       | Ukupno |
|--------------|----------------|-------------|---------|-------|--------|
|              |                |             | Ne      | Da    |        |
| Preživljenje | Do 5 godina    | N           | 27      | 65    | 92     |
|              |                | %           | 29,3%   | 70,7% | 100%   |
|              |                | % od ukupno | 15,5%   | 37,4% | 52,9%  |
|              | Preko 5 godina | N           | 78      | 4     | 82     |
|              |                | %           | 95,1%   | 4,9%  | 100%   |
|              |                | % od ukupno | 44,8%   | 2,3%  | 47,1%  |
| Ukupno       |                | N           | 105     | 69    | 174    |
|              |                | %           | 60,3%   | 39,7% | 100%   |

### 4.3. Prikaz odnosa izražajnosti E-cadherina i MMP-9 i kliničkih i patohistoloških osobina

#### 4.3.1. Prikaz odnosa izražajnosti E-cadherina i kliničkih i patohistoloških osobina

Iz Tablice 18 je vidljivo da se pri izražajnosti E-cadherina stupnja 0 većina bolesnika, njih 94,7%, nalazi u T3 i T4, dok se pri istom stupnju izražajnosti E-cadherina njih 5,3% nalazi u T1 i T2. Odnos izražajnosti E-cadherina i veličine primarnog tumora (T) je statistički značajno povezan ( $\chi^2=100,3$ ,  $df=6$ ,  $p<0,001$ ).

Tablica 18. Odnos izražajnosti E-cadherina i veličine primarnog tumora (T)

|                            |   | Veličina primarnog tumora (T) |       |       |       | Ukupno |      |
|----------------------------|---|-------------------------------|-------|-------|-------|--------|------|
|                            |   | 1                             | 2     | 3     | 4     |        |      |
| Izražajnost<br>E-cadherina | 0 | N                             | 1     | 2     | 34    | 20     | 57   |
|                            |   | %                             | 1,8%  | 3,5%  | 59,6% | 35,1%  | 100% |
|                            | 1 | N                             | 18    | 14    | 30    | 2      | 64   |
|                            |   | %                             | 28,1% | 21,9% | 46,9% | 3,1%   | 100% |
|                            | 2 | N                             | 46    | 17    | 11    | 1      | 75   |
|                            |   | %                             | 61,3% | 22,7% | 14,7% | 1,3%   | 100% |
| Ukupno                     | N | 65                            | 33    | 75    | 23    | 196    |      |
|                            | % | 33,2%                         | 16,8% | 38,3% | 11,7% | 100%   |      |

Iz podataka u Tablici 19 uočavamo da je najveći broj bolesnika, njih 65,3% patohistološkog gradusa I pri vrijednosti E-cadherina stupnja 2, dočim ih je pri istoj vrijednosti E-cadherina u patohistološkom gradusu III, 0%. Pri izražajnosti E-cadherina 0-og stupnja, većina bolesnika (82,4%) je patohistološkog gradusa II (45,6%) i III (36,8%).

Razvidno je da će pri većoj izražajnosti E-cadherina pacijenti imati niži, a ujedno i prognostički povoljniji patohistološki gradus. I obrnuto, što je izražajnost E-cadherina manja ili je odsutan, pacijenti će imati viši, nepovoljniji patohistološki gradus ( $\chi^2=63,5$ ,  $df=4$ ,  $p<0,001$ ).

Tablica 19. Odnos izražajnosti E-cadherina i patohistološkog gradusa

|                            |   | Gradus      |       |       | Ukupno |       |
|----------------------------|---|-------------|-------|-------|--------|-------|
|                            |   | I           | II    | III   |        |       |
| Izražajnost<br>E-cadherina | 0 | N           | 10    | 26    | 21     | 57    |
|                            |   | %           | 17,5% | 45,6% | 36,8%  | 100%  |
|                            |   | % od ukupno | 5,1%  | 13,3% | 10,7%  | 29,1% |
|                            | 1 | N           | 18    | 41    | 5      | 64    |
|                            |   | %           | 28,1% | 64,1% | 7,8%   | 100%  |
|                            |   | % od ukupno | 9,2%  | 20,9% | 2,6%   | 32,7% |
|                            | 2 | N           | 49    | 26    | 0      | 75    |
|                            |   | %           | 65,3% | 34,7% | 0,0%   | 100%  |
|                            |   | % od ukupno | 25,0% | 13,3% | 0,0%   | 38,3% |
| Ukupno                     |   | N           | 77    | 93    | 26     | 196   |
|                            |   | %           | 39,3% | 47,4% | 13,3%  | 100%  |

Iz Tablice 20 je razvidno da je sklonost regionalnom metastaziranju (uni ili bilateralnom) veća što je izražajnost E-cadherina manja; dakle, pri E-cadherinu stupnja 0 sklonost regionalnom metastaziranju unilateralnom iznosi 64,9%, a bilateralnom 14%, ukupno 78,9%. Pri izražajnosti E-cadherina stupnja 2 sklonost regionalnom metastaziranju iznosi samo 2,7% i uključuje samo unilateralne metastaze. Odnos izražajnosti E-cadherina i sklonost regionalnom metastaziranju je statistički značajno povezan ( $\chi^2=95,7$ ,  $df=4$ ,  $p<0,001$ ).

Tablica 20. Odnos izražajnosti E-cadherina i sklonost regionalnom metastaziranju

|                            |   | Regionalno metastaziranje |              |             | Ukupno |       |
|----------------------------|---|---------------------------|--------------|-------------|--------|-------|
|                            |   | Nema                      | Unilateralno | Bilateralno |        |       |
| Izražajnost<br>E-cadherina | 0 | N                         | 12           | 37          | 8      | 57    |
|                            |   | %                         | 21,1%        | 64,9%       | 14,0%  | 100%  |
|                            |   | % od ukupno               | 6,1%         | 18,9%       | 4,1%   | 29,1% |
|                            | 1 | N                         | 52           | 9           | 3      | 64    |
|                            |   | %                         | 81,3%        | 14,1%       | 4,7%   | 100%  |
|                            |   | % od ukupno               | 26,5%        | 4,6%        | 1,5%   | 32,7% |
|                            | 2 | N                         | 73           | 2           | 0      | 75    |
|                            |   | %                         | 97,3%        | 2,7%        | 0,0%   | 100%  |
|                            |   | % od ukupno               | 37,2%        | 1,0%        | 0,0%   | 38,3% |
| Ukupno                     |   | N                         | 137          | 48          | 11     | 196   |
|                            |   | %                         | 69,9%        | 24,5%       | 5,6%   | 100%  |

Iz Tablice 21 je razvidno da je pri izražajnosti E-cadherina stupnja 2 večina bolesnika (65,3%) u ranim stadijima bolesti (stadij I i II). Pri izražajnosti E-cadherina 0-og stupnja u uznapredovalim stadijima bolesti (stadij III i IV) nalazimo 96,5% bolesnika. Odnos izražajnosti E-cadherina i stadija bolesti je statistički značajan ( $\chi^2=70,3$ ,  $df=6$ ,  $p<0,001$ ).

Tablica 21. Odnos izražajnosti E-cadherina i stadija bolesti

|                            |   | Stadij bolesti |       |       |       |        |       |
|----------------------------|---|----------------|-------|-------|-------|--------|-------|
|                            |   | I              | II    | III   | IV    | Ukupno |       |
| Izražajnost<br>E-cadherina | 0 | N              | 1     | 1     | 29    | 26     | 57    |
|                            |   | %              | 1,8%  | 1,8%  | 50,9% | 45,6%  | 100%  |
|                            |   | % od ukupno    | 0,5%  | 0,5%  | 14,8% | 13,3%  | 29,1% |
|                            | 1 | N              | 18    | 8     | 31    | 7      | 64    |
|                            |   | %              | 28,1% | 12,5% | 48,4% | 10,9%  | 100%  |
|                            |   | % od ukupno    | 9,2%  | 4,1%  | 15,8% | 3,6%   | 32,7% |
|                            | 2 | N              | 39    | 10    | 23    | 3      | 75    |
|                            |   | %              | 52,0% | 13,3% | 30,7% | 4,0%   | 100%  |
|                            |   | % od ukupno    | 19,9% | 5,1%  | 11,7% | 1,5%   | 38,3% |
| Ukupno                     | N | 58             | 19    | 83    | 36    | 196    |       |
|                            | % | 29,6%          | 9,7%  | 42,3% | 18,4% | 100%   |       |

Iz Tablice 22 je razvidno da je sklonost recidiviranju tumora manja što je veća izražajnost E-cadherina. Dakle, pri izražajnosti E-cadherina stupnja 2 našli smo 2,7% recidiva, dok je 91,2% bolesnika imalo recidiv tumora pri izražajnosti E-cadherina stupnja 0. Odnos izražajnosti E-cadherina i sklonost recidiviranju je statistički značajno povezan ( $\chi^2=117,1$ ,  $df=6$ ,  $p<0,001$ ).

Tablica 22. Odnos izražajnosti E-cadherina i sklonost recidiviranju

|                            |   |             | Recidiv |       |        |
|----------------------------|---|-------------|---------|-------|--------|
|                            |   |             | Ne      | Da    | Ukupno |
| Izražajnost<br>E-cadherina | 0 | N           | 5       | 52    | 57     |
|                            |   | %           | 8,8%    | 91,2% | 100%   |
|                            |   | % od ukupno | 2,6%    | 26,5% | 29,1%  |
|                            | 1 | N           | 49      | 15    | 64     |
|                            |   | %           | 76,6%   | 23,4% | 100%   |
|                            |   | % od ukupno | 25,0%   | 7,7%  | 32,7%  |
|                            | 2 | N           | 73      | 2     | 75     |
|                            |   | %           | 97,3%   | 2,7%  | 100%   |
|                            |   | % od ukupno | 37,2%   | 1,0%  | 38,3%  |
| Ukupno                     | N | 127         | 69      | 196   |        |
|                            | % | 64,8%       | 35,2%   | 100%  |        |

Iz Tablice 23 je razvidno da raste broj preživjelih što je veća izražajnost E-cadherina: živih (3) je 74,7%, umrlih od osnovne bolesti (1) je samo 1,3%. U slučaju odsutnosti izražajnosti E-cadherina (stupanj 0), umrlih od osnovne bolesti (1) je 91,2%, dok je živih (3) pri istoj izražajnosti E-cadherina samo 7%. Odnos E-cadherina i statusa ispitanika je statistički značajan ( $\chi^2=128,4$ ,  $df=4$ ,  $p<0,001$ ).

Tablica 23. Odnos E-cadherina i statusa ispitanika

|                         |   | Status ispitanika           |                           |         | Ukupno |        |
|-------------------------|---|-----------------------------|---------------------------|---------|--------|--------|
|                         |   | (1) Umro od osnovne bolesti | (2) Umro od druge bolesti | (3) Živ |        |        |
| Izražajnost E-cadherina | 0 | N                           | 52                        | 1       | 4      | 57     |
|                         |   | %                           | 91,2%                     | 1,8%    | 7,0%   | 100,0% |
|                         |   | % od ukupno                 | 26,5%                     | 0,5%    | 2,0%   | 29,1%  |
|                         | 1 | N                           | 14                        | 21      | 29     | 64     |
|                         |   | %                           | 21,9%                     | 32,8%   | 45,3%  | 100,0% |
|                         |   | % od ukupno                 | 7,1%                      | 10,7%   | 14,8%  | 32,7%  |
|                         | 2 | N                           | 1                         | 18      | 56     | 75     |
|                         |   | %                           | 1,3%                      | 24,0%   | 74,7%  | 100,0% |
|                         |   | % od ukupno                 | 0,5%                      | 9,2%    | 28,6%  | 38,3%  |
| Ukupno                  |   | N                           | 67                        | 40      | 89     | 196    |
|                         |   | %                           | 34,2%                     | 20,4%   | 45,4%  | 100,0% |

Iz Tablice 24 je razvidno da je preživljenje preko pet godina veće što je izražajnost E-cadherina veća ( $\chi^2=47,6$ ,  $df=2$ ,  $p<0,001$ ). Pri izražajnosti E-cadherina stupnja 2, preživljenje preko pet godina postiže 75,8% bolesnika, dok pri vrijednosti E-cadherina 0-og stupnja preko pet godina preživi njih samo 12,5%, iz čega proizlazi da ih 87,5% umire unutar pet godina.

Tablica 24. Odnos izražajnosti E-cadherina i preživljenja bolesnika

|                            |   |             | Preživljenje bolesnika |                |        |
|----------------------------|---|-------------|------------------------|----------------|--------|
|                            |   |             | Do 5 godina            | Preko 5 godina | Ukupno |
| Izražajnost<br>E-cadherina | 0 | N           | 49                     | 7              | 56     |
|                            |   | %           | 87,5%                  | 12,5%          | 100%   |
|                            |   | % od ukupno | 28,2%                  | 4,0%           | 32,2%  |
|                            | 1 | N           | 28                     | 28             | 56     |
|                            |   | %           | 50,0%                  | 50,0%          | 100%   |
|                            |   | % od ukupno | 16,1%                  | 16,1%          | 32,2%  |
|                            | 2 | N           | 15                     | 47             | 62     |
|                            |   | %           | 24,2%                  | 75,8%          | 100%   |
|                            |   | % od ukupno | 8,6%                   | 27,0%          | 35,6%  |
| Ukupno                     | N | 92          | 82                     | 174            |        |
|                            | % | 52,9%       | 47,1%                  | 100%           |        |



#### 4.3.2. Prikaz odnosa izražajnosti MMP-9 i kliničkih i patohistoloških osobina

Iz Tablice 25 je razvidno da pri izražajnosti MMP-9 stupnja 0 glavninu bolesnika, njih 83,1%, nalazimo u T1 i T2, dok ih pri izražajnosti MMP-9 stupnja 2 96,8% nalazimo u T3 i T4. Međutim, iz prikaza učestalosti po pojedinim poljima u tablici jasno je vidljiva značajna ( $\chi^2=112,8$ ,  $df=6$ ,  $p<0,001$ ) povezanost MMP-9 izražajnosti i veličine primarnog tumora (T).

Tablica 25. Odnos izražajnosti MMP-9 i veličine primarnog tumora (T)

|                      |   | Veličina primarnog tumora (T) |       |       |       | Ukupno |      |
|----------------------|---|-------------------------------|-------|-------|-------|--------|------|
|                      |   | 1                             | 2     | 3     | 4     |        |      |
| Izražajnost<br>MMP-9 | 0 | N                             | 58    | 26    | 16    | 1      | 101  |
|                      |   | %                             | 57,4% | 25,7% | 15,8% | 1,0%   | 100% |
|                      | 1 | N                             | 6     | 6     | 19    | 2      | 33   |
|                      |   | %                             | 18,2% | 18,2% | 57,6% | 6,1%   | 100% |
|                      | 2 | N                             | 1     | 1     | 40    | 20     | 62   |
|                      |   | %                             | 1,6%  | 1,6%  | 64,5% | 32,3%  | 100% |
| Ukupno               | N | 65                            | 33    | 75    | 23    | 196    |      |
|                      | % | 33,2%                         | 16,8% | 38,3% | 11,7% | 100%   |      |

Iz Tablice 26 je razvidno da što je manja izražajnost MMP-9, dakle pri MMP-9 stupnja 0, veći broj pacijenata ima niži, dakle povoljniji patohistološki gradus, i taj odnos je statistički značajan ( $\chi^2=75,7$ ,  $df=4$ ,  $p<0,001$ ). Pri izražajnosti MMP-9 stupnja 0 u gradusu I nalazimo 63,4% bolesnika, a u gradusu III nalazimo samo 1% bolesnika.

Pri izražajnosti MMP-9 stupnja 2 nalazimo 14,5% bolesnika u gradusu I, a u patohistološkim gradusima II i III nalazimo 85,5% bolesnika.

Tablica 26. Odnos izražajnosti MMP-9 i patohistološkog gradusa

|                      |   | Gradus      |       |       | Ukupno |        |
|----------------------|---|-------------|-------|-------|--------|--------|
|                      |   | I           | II    | III   |        |        |
| Izražajnost<br>MMP-9 | 0 | N           | 64    | 36    | 1      | 101    |
|                      |   | %           | 63,4% | 35,6% | 1,0%   | 100,0% |
|                      |   | % od ukupno | 32,7% | 18,4% | 0,5%   | 51,5%  |
|                      | 1 | N           | 4     | 26    | 3      | 33     |
|                      |   | %           | 12,1% | 78,8% | 9,1%   | 100,0% |
|                      |   | % od ukupno | 2,0%  | 13,3% | 1,5%   | 16,8%  |
|                      | 2 | N           | 9     | 31    | 22     | 62     |
|                      |   | %           | 14,5% | 50,0% | 35,5%  | 100,0% |
|                      |   | % od ukupno | 4,6%  | 15,8% | 11,2%  | 31,6%  |
| Ukupno               |   | N           | 77    | 93    | 26     | 196    |
|                      |   | %           | 39,3% | 47,4% | 13,3%  | 100,0% |

Iz Tablice 27 je razvidno da pri porastu izražajnosti MMP-9 raste i sklonost regionalnom metastaziranju (uni ili bilateralno), i taj odnos je statistički značajan ( $\chi^2=135$ ,  $df=4$ ,  $p<0,001$ ). Dakle, pri MMP-9 stupnja 0 u 99% bolesnika nije zabilježeno regionalno metastaziranje, dok pri MMP-9 stupnja 2 regionalno unilateralno metastaziranje nalazimo u 71%, a bilateralno u 14,5% bolesnika, ukupno 85,5%.

Tablica 27. Odnos izražajnosti MMP-9 i sklonost regionalnom metastaziranju

|                      |   | Regionalno metastaziranje |              |             | Ukupno |        |
|----------------------|---|---------------------------|--------------|-------------|--------|--------|
|                      |   | Nema                      | Unilateralno | Bilateralno |        |        |
| Izražajnost<br>MMP-9 | 0 | N                         | 100          | 0           | 1      | 101    |
|                      |   | %                         | 99,0%        | 0,0%        | 1,0%   | 100,0% |
|                      |   | % od ukupno               | 51,0%        | 0,0%        | 0,5%   | 51,5%  |
|                      | 1 | N                         | 28           | 4           | 1      | 33     |
|                      |   | %                         | 84,8%        | 12,1%       | 3,0%   | 100,0% |
|                      |   | % od ukupno               | 14,3%        | 2,0%        | 0,5%   | 16,8%  |
|                      | 2 | N                         | 9            | 44          | 9      | 62     |
|                      |   | %                         | 14,5%        | 71,0%       | 14,5%  | 100,0% |
|                      |   | % od ukupno               | 4,6%         | 22,4%       | 4,6%   | 31,6%  |
| Ukupno               |   | N                         | 137          | 48          | 11     | 196    |
|                      |   | %                         | 69,9%        | 24,5%       | 5,6%   | 100,0% |

Iz Tablice 28 je razvidno da pri negativnoj izražajnosti MMP-9 (stupanj 0), niži stadij bolesti (I i II) nalazimo u 64,4% bolesnika. Pri izražajnosti MMP-9 stupnja 2 u višim stadijima bolesti (III i IV) nalazimo 96,8% bolesnika. Uočava se statistički značajna povezanost ( $\chi^2=93,7$ ,  $df=6$ ,  $p<0,001$ ) povećane izražajnosti MMP-9 s višim, odnosno smanjene izražajnosti ili odsutnosti MMP-9 s nižim stadijima bolesti.

Tablica 28. Odnos izražajnosti MMP-9 i stadija bolesti

|                      |   | Stadij bolesti |       |       |       | Ukupno |       |
|----------------------|---|----------------|-------|-------|-------|--------|-------|
|                      |   | I              | II    | III   | IV    |        |       |
| Izražajnost<br>MMP-9 | 0 | N              | 51    | 14    | 34    | 2      | 101   |
|                      |   | %              | 50,5% | 13,9% | 33,7% | 2,0%   | 100%  |
|                      |   | % od ukupno    | 26,0% | 7,1%  | 17,3% | 1,0%   | 51,5% |
|                      | 1 | N              | 6     | 4     | 20    | 3      | 33    |
|                      |   | %              | 18,2% | 12,1% | 60,6% | 9,1%   | 100%  |
|                      |   | % od ukupno    | 3,1%  | 2,0%  | 10,2% | 1,5%   | 16,8% |
|                      | 2 | N              | 1     | 1     | 29    | 31     | 62    |
|                      |   | %              | 1,6%  | 1,6%  | 46,8% | 50,0%  | 100%  |
|                      |   | % od ukupno    | 0,5%  | 0,5%  | 14,8% | 15,8%  | 31,6% |
| Ukupno               | N | 58             | 19    | 83    | 36    | 196    |       |
|                      | % | 29,6%          | 9,7%  | 42,3% | 18,4% | 100%   |       |

Iz Tablice 29 je vidljivo da se pri većoj izražajnosti MMP-9 povećava i sklonost recidiviranju ( $\chi^2=139,4$ ,  $df=6$ ,  $p<0,001$ ). Pri izražajnosti MMP-9 stupnja 2 u 91,9% bolesnika nalazimo recidiv, a pri MMP-9 stupnja 0 samo 1% bolesnika iskazuje recidiv.

Tablica 29. Odnos izražajnosti MMP-9 i sklonost recidiviranju

|                      |   | Recidiv     |       | Ukupno |       |
|----------------------|---|-------------|-------|--------|-------|
|                      |   | Ne          | Da    |        |       |
| Izražajnost<br>MMP-9 | 0 | N           | 100   | 1      | 101   |
|                      |   | %           | 99,0% | 1,0%   | 100%  |
|                      |   | % od ukupno | 51,0% | 0,5%   | 51,5% |
|                      | 1 | N           | 22    | 11     | 33    |
|                      |   | %           | 66,7% | 33,3%  | 100%  |
|                      |   | % od ukupno | 11,2% | 5,6%   | 16,8% |
|                      | 2 | N           | 5     | 57     | 62    |
|                      |   | %           | 8,1%  | 91,9%  | 100%  |
|                      |   | % od ukupno | 2,6%  | 29,1%  | 31,6% |
| Ukupno               | N | 127         | 69    | 196    |       |
|                      | % | 64,8%       | 35,2% | 100%   |       |

Sljedeća tablica (Tablica 30) prikazuje da je pri izražajnosti MMP-9 stupnja 2 čak 91,9% bolesnika umrlo od osnovne bolesti, dakle statusa ispitanika 1, dok pri izražajnosti MMP-9 stupnja 0 ne nalazimo ni jednog bolesnika umrlog od osnovne bolesti (0%). Temeljem ovih statistički značajnih rezultata ( $\chi^2=145,6$ ,  $df=4$ ,  $p<0,001$ ) zaključujemo da je pri većoj izražajnosti MMP-9 više bolesnika u skupini statusa ispitanika 1, dakle više ih je umrlo od osnovne bolesti.

Tablica 30. Odnos izražajnosti MMP-9 i statusa ispitanika

|                      |   | Status ispitanika           |                           |         |        |       |
|----------------------|---|-----------------------------|---------------------------|---------|--------|-------|
|                      |   | (1) Umro od osnovne bolesti | (2) Umro od druge bolesti | (3) Živ | Ukupno |       |
| Izražajnost<br>MMP-9 | 0 | N                           | 0                         | 31      | 70     | 101   |
|                      |   | %                           | 0,0%                      | 30,7%   | 69,3%  | 100%  |
|                      |   | % od ukupno                 | 0,0%                      | 15,8%   | 35,7%  | 51,5% |
|                      | 1 | N                           | 10                        | 9       | 14     | 33    |
|                      |   | %                           | 30,3%                     | 27,3%   | 42,4%  | 100%  |
|                      |   | % od ukupno                 | 5,1%                      | 4,6%    | 7,1%   | 16,8% |
|                      | 2 | N                           | 57                        | 0       | 5      | 62    |
|                      |   | %                           | 91,9%                     | 0,0%    | 8,1%   | 100%  |
|                      |   | % od ukupno                 | 29,1%                     | 0,0%    | 2,6%   | 31,6% |
| Ukupno               | N | 67                          | 40                        | 89      | 196    |       |
|                      | % | 34,2%                       | 20,4%                     | 45,4%   | 100%   |       |

Što je manja izražajnost MMP-9, preživljenje bolesnika preko pet godina je statistički značajno veće ( $\chi^2=56,5$ ,  $df=2$ ,  $p<0,001$ ). Pri MMP-9 stupnja 0 preko pet godina preživi 72,6% bolesnika, dok pri izražajnosti MMP-9 stupnja 2 većina bolesnika (91,4%) umire unutar pet godina. (Tablica 31)

Tablica 31. Odnos izražajnosti MMP-9 i preživljenja bolesnika

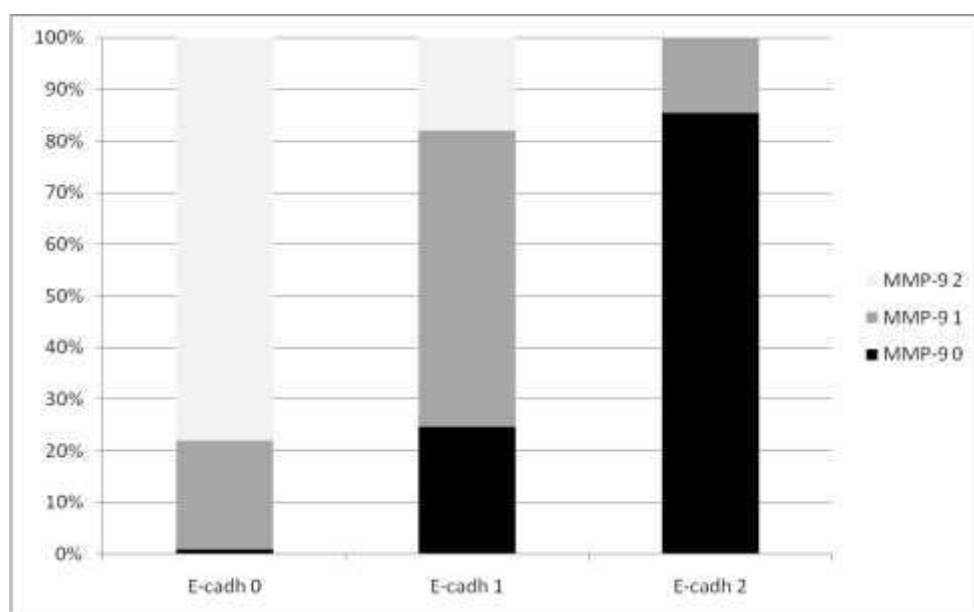
|                      |   | Preživljenje |                | Ukupno |        |
|----------------------|---|--------------|----------------|--------|--------|
|                      |   | Do 5 godina  | Preko 5 godina |        |        |
| Izražajnost<br>MMP-9 | 0 | N            | 23             | 61     | 84     |
|                      |   | %            | 27,4%          | 72,6%  | 100,0% |
|                      |   | % od ukupno  | 13,2%          | 35,1%  | 48,3%  |
|                      | 1 | N            | 16             | 16     | 32     |
|                      |   | %            | 50,0%          | 50,0%  | 100,0% |
|                      |   | % od ukupno  | 9,2%           | 9,2%   | 18,4%  |
|                      | 2 | N            | 53             | 5      | 58     |
|                      |   | %            | 91,4%          | 8,6%   | 100,0% |
|                      |   | % od ukupno  | 30,5%          | 2,9%   | 33,3%  |
| Ukupno               | N | 92           | 82             | 174    |        |
|                      | % | 52,9%        | 47,1%          | 100,0% |        |

### 4.3.3. Prikaz odnosa izražajnosti E-cadherina i MMP-9

Pri izražajnosti MMP-9 stupnja 0, 70,3% bolesnika ima izražajnost E-cadherina stupnja 2, a samo 1% ih ima izražajnost E-cadherina stupnja 0, dok pri izražajnosti MMP-9 stupnja 2, 79% bolesnika ima izražajnost E-cadherina 0-og stupnja, a nijedan bolesnik u tom slučaju nema izražajnost E-cadherina stupnja 2. (Tablica 32, Slika 7) Povezanost izražajnosti MMP-9 i E-cadherina je statistički značajna ( $\chi^2=152,8$ ,  $df=4$ ,  $p<0,001$ ).

Tablica 32. Odnos izražajnosti E-cadherina i MMP-9

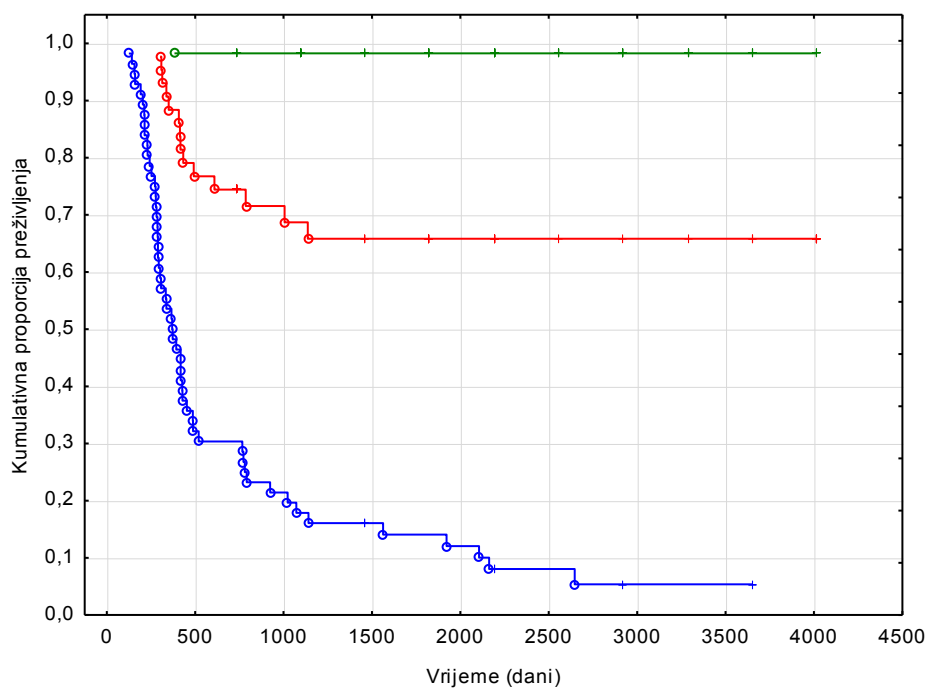
|                      |   | Izražajnost E-cadherina |       |       | Ukupno |        |
|----------------------|---|-------------------------|-------|-------|--------|--------|
|                      |   | 0                       | 1     | 2     |        |        |
| Izražajnost<br>MMP-9 | 0 | N                       | 1     | 29    | 71     | 101    |
|                      |   | %                       | 1,0%  | 28,7% | 70,3%  | 100,0% |
|                      | 1 | N                       | 7     | 22    | 4      | 33     |
|                      |   | %                       | 21,2% | 66,7% | 12,1%  | 100,0% |
|                      | 2 | N                       | 49    | 13    | 0      | 62     |
|                      |   | %                       | 79,0% | 21,0% | 0,0%   | 100,0% |
| Ukupno               |   | N                       | 57    | 64    | 75     | 196    |
|                      |   | %                       | 29,1% | 32,7% | 38,3%  | 100,0% |



Slika 7. Odnos izražajnosti E-cadherina i MMP-9

#### 4.4. Značajnost izražajnosti E-cadherina i MMP-9 na prognozu i preživljenje ispitanika

Na sljedećoj slici (Slika 8) prikazana je Kaplan-Meierova krivulja preživljenja koja pokazuje statistički značajnu razliku (Log rank test,  $\chi^2=104,8$ ,  $p<0.001$ ) u krivulji preživljenja između tri skupine bolesnika koji imaju različiti stupanj izražajnosti E-cadherina.



Slika 8. Krivulja preživljenja (broj dana) prema stupnju izražajnosti E-cadherina (0, plava boja - odsutnost bojanja, 1, crveno - blago bojanje u > 10%, 2, zeleno - intenzivno bojanje u > 10%)

U sljedećoj tablici (Tablica 33) prikazani su opisni pokazatelji krivulje preživljenja za tri skupine bolesnika ovisno o stupnju izražajnosti E-cadherina. Iz tablice je čitljiva razlika koja je vidljiva iz prethodnog slikovnog prikaza iz kojeg se vidi i razlika u prosječnoj duljini preživljenja.

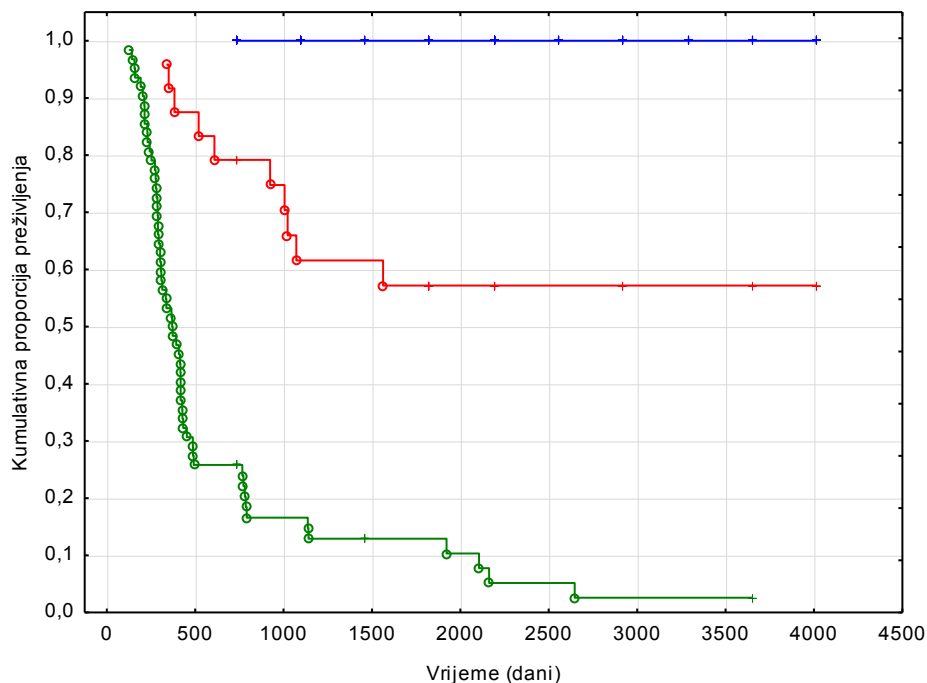
Tablica 33. Opisna statistika krivulje preživljenja za tri skupine pacijenata ovisno o stupnju izražajnosti E-cadherina

| Izražajnost<br>E-cadherina | Medijan | Aritmetička |        | N (%)   |         | Ukupno |
|----------------------------|---------|-------------|--------|---------|---------|--------|
|                            |         | sredina     | SD     | Umrli   | Živi    |        |
| 0                          | 371,5   | 711,9       | 780,4  | 52 (93) | 4 (7)   | 56     |
| 1                          | 1460,0  | 1740,4      | 1307,6 | 14 (33) | 29 (67) | 43     |
| 2                          | 2190,0  | 2215,9      | 916,7  | 1 (2)   | 56 (98) | 57     |
| Ukupno                     | 1139,0  | 1545,0      | 1187,4 | 67      | 89      | 156    |

Iz prethodne tablice (Tablica 33) je vidljivo da je na kraju promatranog vremenskog razdoblja manje od 2% umrlih kada je E cadherin stupnja 2, tj. izražen intenzivno u > 10%. No ako je odsutnost bojanja, umrlih je više od 93%, a kod stupnja 1, tj. blago bojanje u > 10%, umrlih je oko 33%.



Na sljedećoj slici (Slika 9) prikazana je Kaplan-Meierovova krivulja preživljenja koja pokazuje statistički značajnu razliku (Log rank test,  $\chi^2=152,6$ ,  $p<0.001$ ) u preživljenju između tri skupine bolesnika koji imaju različiti stupanj izražajnosti MMP-9.



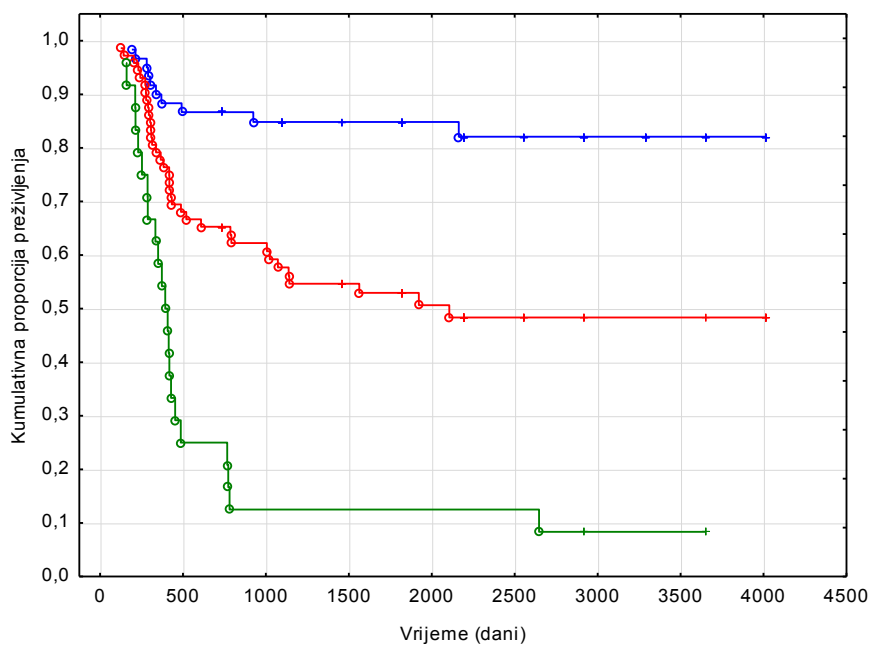
Slika 9. Krivulja preživljenja prema stupnju izražajnosti MMP-9 (0, plava boja - odsutnost bojanja, 1, crveno - blago bojanje u više od 10%, 2, zeleno - intenzivno bojanje u više od 10% )

Od onih koji imaju izražajnost MMP-9 stupnja 2 (N=62), na kraju promatranog vremenskog perioda samo je 5 živih (8%), a umrlih je 57 (92%). Od onih koji imaju izražajnost MMP-9 stupnja 1, prosječan broj dana preživljenja je 1 739, a na kraju promatranog vremenskog perioda je približno 42% umrlih. S druge strane, od onih kojima je izražajnost MMP-9 negativna (stupnja 0), na kraju promatranog vremenskog perioda su svi živi. (Tablica 34)

Tablica 34. Opisna statistika krivulje preživljenja za tri skupine bolesnika ovisno o stupnju izražajnosti MMP-9

| Izražajnost<br>MMP-9 | Aritmetička |         |        | N (%)<br>Živi | N (%)<br>Umrli | Ukupno |
|----------------------|-------------|---------|--------|---------------|----------------|--------|
|                      | Medijan     | sredina | SD     |               |                |        |
| 0                    | 2190,0      | 2309,9  | 982,0  | 70 (100)      | 0 (0)          | 70     |
| 1                    | 1825,0      | 1738,8  | 1125,9 | 14 (58.3)     | 10 (41.7)      | 24     |
| 2                    | 371,5       | 606,3   | 657,1  | 5 (8.1)       | 57 (91.9)      | 62     |
| Ukupno               | 1139,0      | 1545,0  | 1187,4 | 89 (57.1)     | 67 (42.9)      | 156    |

U sljedećem slikovnom prikazu (Slika 10) prikazana je krivulja preživljenja prema stupnju gradusa koja pokazuje statistički značajnu razliku (Log rank test,  $\chi^2=52,65$ ,  $p<0.001$ ) u krivulji preživljenja između tri skupine bolesnika koji imaju različiti stupanj gradusa.



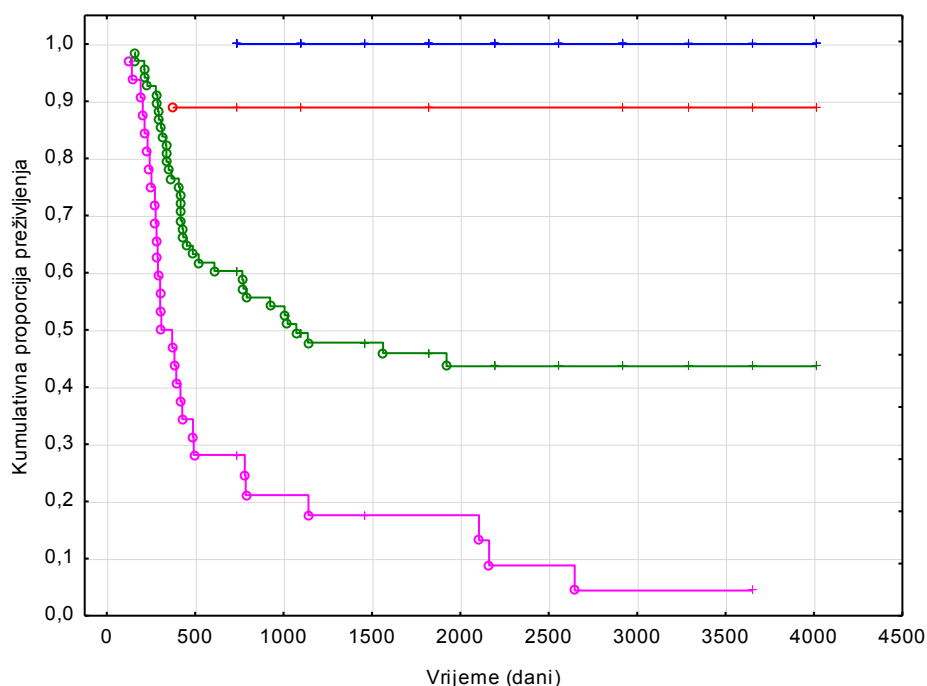
Slika 10. Krivulja preživljenja (broj dana) prema gradusu (GI - plava boja, GII - crvena boja, GIII - zelena boja)

U sljedećoj tablici (Tablica 35) prikazani su opisni pokazatelji krivulje preživljenja za tri skupine bolesnika koji imaju različiti stupanj gradusa. Iz tablice je jasna razlika koja je vidljiva iz prethodnog slikovnog prikaza (Slika 10), iz kojeg se vidi i razlika u prosječnoj duljini preživljenja.

Tablica 35. Opisna statistika krivulje preživljenja za tri skupine bolesnika ovisno o gradusu

| Gradus | Medijan | Aritmetička sredina | SD      | N (Živi) | % (Živi) |
|--------|---------|---------------------|---------|----------|----------|
| I      | 1825    | 1909,9              | 1175,77 | 50       | 83,3     |
| II     | 1137    | 1415,0              | 1053,10 | 37       | 51,4     |
| III    | 411     | 775,4               | 941,14  | 2        | 8,3      |
| Ukupno | 1117,5  | 1524,6              | 1146,63 | 89       |          |

U sljedećem slikovnom prikazu (Slika 11) prikazana je krivulja preživljenja prema stupnju stadija koja pokazuje statistički značajnu razliku (Log rank test,  $\chi^2=86,53$ ,  $p<0.001$ ) u krivulji preživljenja između četiri skupine pacijenata koji imaju različiti stupanj stadija bolesti.



Slika 11. Krivulja preživljenja (broj dana) prema stadiju (stadij I - plava boja, stadij II - crvena boja, stadij III - zelena boja, stadij IV - ljubičasta boja)

Sukladno prethodno provedenoj analizi, u sljedećoj tablici (Tablica 36) prikazani su opisni pokazatelji krivulje preživljenja za četiri skupine bolesnika. Iz tablice je jasna razlika koja je vidljiva iz prethodnog slikovnog prikaza (Slika 11), iz kojeg se vidi i razlika u prosječnoj duljini preživljenja.

Tablica 36. Opisna statistika krivulje preživljenja za četiri skupine pacijenata ovisno o stadiju bolesti

| Stadij | Medijan | Aritmetička sredina | SD      | N (Živi) | % (Živi) |
|--------|---------|---------------------|---------|----------|----------|
| I      | 2190    | 2237,2              | 1040,06 | 47       | 100      |
| II     | 1095    | 1650,8              | 1237,95 | 8        | 88,9     |
| III    | 1072    | 1350,8              | 1037,36 | 31       | 45,6     |
| IV     | 377     | 710,6               | 806,69  | 3        | 9,4      |
| Ukupno | 1117,5  | 1524,6              | 1146,63 | 89       |          |

Konačno, u sljedećih nekoliko prikaza bit će izloženi rezultati *Coxove* regresijske analize, i to u više koraka, na način da se vidi kakav je pojedinačni doprinos u različitim kombinacijama prediktora, tj. metodom ubacivanja i izbacivanja stadija i gradusa s istraživanim biljezima (E-cadherin i MMP-9). Naravno, dobiveni rezultati se nužno moraju interpretirati s prethodno iznesenim rezultatima bivarijatne statistike gdje se vidi pojedinačna uloga stadija, gradusa te biljega E-cadherina i MMP-9.

U Tablici 37 prikazani su rezultati regresijske analize kliničkih i patohistoloških prediktora preživljenja za promatrano vremensko razdoblje iz kojih su vidljivi regresijski koeficijenti. Iz rezultata je vidljivo kako u kombinaciji gradus i E-cadherin, biljeg E-cadherin je značajan ( $p < 0,01$ ) prediktor preživljenja.

Tablica 37. Regresijska analiza (*Cox regression*) kliničkih i patohistoloških prediktora (gradus i E-cadherin) preživljenja za promatrano vremensko razdoblje

|              | B      | SE    | Wald  | df | p     | Exp(B) | 95% CI        |                |
|--------------|--------|-------|-------|----|-------|--------|---------------|----------------|
|              |        |       |       |    |       |        | Donja granica | Gornja granica |
| E-cadherin 0 |        |       | 40,43 | 2  | 0,000 |        |               |                |
| E-cadherin 1 | -1,600 | 0,322 | 24,67 | 1  | 0,000 | 0,202  | 0,107         | 0,380          |
| E-cadherin 2 | -4,608 | 1,030 | 20,04 | 1  | 0,000 | 0,010  | 0,001         | 0,075          |
| Gradus I     |        |       | 1,09  | 2  | 0,580 |        |               |                |
| Gradus II    | 0,314  | 0,364 | 0,74  | 1  | 0,389 | 1,368  | 0,670         | 2,793          |
| Gradus III   | 0,413  | 0,401 | 1,06  | 1  | 0,304 | 1,511  | 0,688         | 3,316          |

No, zanimljivo je usporediti razliku u regresijskoj analizi izražajnosti E-cadherina i stadija, što je vidljivo u Tablici 38.

Tablica 38. Regresijska analiza (*Cox regression*) kliničkih i patohistoloških prediktora (stadij i E-cadherin) preživljenja za promatrano vremensko razdoblje

|              | B      | SE     | Wald  | df | p     | Exp(B)   | 95% CI        |                |
|--------------|--------|--------|-------|----|-------|----------|---------------|----------------|
|              |        |        |       |    |       |          | Donja granica | Gornja granica |
| E-cadherin 0 |        |        | 23,95 | 2  | 0,000 |          |               |                |
| E-cadherin 1 | -1,205 | 0,319  | 14,27 | 1  | 0,000 | 0,300    | 0,160         | 0,560          |
| E-cadherin 2 | -3,631 | 1,029  | 12,45 | 1  | 0,000 | 0,026    | 0,004         | 0,199          |
| Stadij I     |        |        | 2,16  | 3  | 0,540 |          |               |                |
| Stadij II    | 9,317  | 47,698 | 0,04  | 1  | 0,845 | 11128,19 | 0,000         | 4,43E44        |
| Stadij III   | 10,118 | 47,688 | 0,05  | 1  | 0,832 | 24781,20 | 0,000         | 9,68E45        |
| Stadij IV    | 10,426 | 47,688 | 0,05  | 1  | 0,827 | 33716,09 | 0,000         | 1,32E45        |

Iz prethodnih tablica (Tablica 37 i Tablica 38) je vidljivo kako je E-cadherin u kombinaciji sa stadijem i gradusom statistički značajan ( $p < 0,01$ ).

No, zanimljivo je vidjeti kako izgleda regresijska analiza kada se kao prediktor uvrsti biljeg MMP-9, što je prikazano u sljedeće dvije tablice. (Tablica 39 i Tablica 40)

Tablica 39. Regresijska analiza (*Cox regression*) kliničkih i patohistoloških prediktora (gradus i MMP-9) preživljenja za promatrano vremensko razdoblje

|            | B      | SE     | Wald   | df | p     | Exp(B) | 95% CI        |                |
|------------|--------|--------|--------|----|-------|--------|---------------|----------------|
|            |        |        |        |    |       |        | Donja granica | Gornja granica |
| MMP-9 0    |        |        | 20,350 | 2  | 0,000 |        |               |                |
| MMP-9 1    | 11,631 | 52,608 | 0,049  | 1  | 0,825 | 112476 | 0,000         | 6,7E+49        |
| MMP-9 2    | 13,247 | 52,607 | 0,063  | 1  | 0,801 | 566580 | 0,000         | 3,4E+50        |
| Gradus I   |        |        | 0,675  | 2  | 0,714 |        |               |                |
| Gradus II  | -0,273 | 0,361  | 0,572  | 1  | 0,449 | 0,761  | 0,375         | 1,544          |
| Gradus III | -0,124 | 0,389  | 0,102  | 1  | 0,749 | 0,883  | 0,412         | 1,892          |

Iz regresijske analize (Tablica 39) je vidljivo kako u kombinaciji s gradusom MMP-9 postaje značajan, i to ne na svim razinama ( $p < 0,05$ ). Očigledno je da u regresijskom modelu MMP-9 i gradus odnose međusobno jedan dio varijance koji je značajan u bivarijatnoj statistici, a što je prije prikazano i naglašeno u rezultatima. Istovjetan rezultat je vidljiv u Tablici 40, u kojoj je u analizu umjesto gradusa uvršten stadij bolesti.

Tablica 40. Regresijska analiza (*Cox regression*) kliničkih i patohistoloških prediktora (stadij i MMP-9) preživljenja za promatrano vremensko razdoblje

|            | B      | SE     | Wald   | df | p     | Exp(B)    | 95% CI        |                |
|------------|--------|--------|--------|----|-------|-----------|---------------|----------------|
|            |        |        |        |    |       |           | Donja granica | Gornja granica |
| MMP-9 0    |        |        | 16,050 | 2  | 0,000 |           |               |                |
| MMP-9 1    | 10,554 | 46,934 | 0,051  | 1  | 0,822 | 38323,191 | 0,000         | 3,4E+44        |
| MMP-9 2    | 12,069 | 46,933 | 0,066  | 1  | 0,797 | 174388    | 0,000         | 1,6E+45        |
| Stadij I   |        |        | 0,507  | 3  | 0,917 |           |               |                |
| Stadij II  | 8,458  | 38,368 | 0,049  | 1  | 0,826 | 4713,882  | 0,000         | 2,1E+36        |
| Stadij III | 8,755  | 38,355 | 0,052  | 1  | 0,819 | 6340,257  | 0,000         | 2,8E+36        |
| Stadij IV  | 8,584  | 38,356 | 0,050  | 1  | 0,823 | 5346,490  | 0,000         | 2,4E+36        |

Ovdje međutim treba istaknuti oprez prilikom tumačenja značajnosti pojedinih prediktora u Coxovoj regresiji jer, kako je i vidljivo, kod nekih kategorija i prediktora omjer rizika i navedene granice za 95% interval pouzdanosti značajno premašuju standardne vrijednosti i interpretacije, koje se kreću oko 1 ili jednoznačenastih brojeva. Razlog navedenih vrijednosti je vjerojatno u neproporcionalnim i malenim brojevima ispitanika po pojedinim kategorijama.

## 5. RASPRAVA

Preživljenje bolesnika s pločastim karcinomom grkljana ostalo je nepromijenjeno posljednjih tridesetak godina (93). Usprkos napretku kirurških tehnika i kemoradioterapije, uspješnost izlječenja, a sukladno tome i duljina preživljenja, poražavajući su, poglavito za uznapredovale karcinome. Stoga je prepoznavanje karakteristika biološkog ponašanja tumora ključno za definiranje jasnijih protokola koji će dovesti do kvalitetnijeg života i duljeg preživljenja.

U istraživanom uzorku su dominirali muškarci (96,4%), prosječne starosti 65 godina, što je u skladu s podacima iz literature (9,22). Važno je istaknuti kako je od ukupnog broja ispitanika (n=196) njih čak 192 (98%) bilo pušača, a nešto više od 60% (n=118) onih koji prekomjerno konzumiraju alkohol, što također odgovara podacima iz literature koji ukazuju da kombinacija pušenja i zlouporabe alkohola ima sinergistički efekt i značajno povećava rizik od nastanka karcinoma grkljana (7,22). Iz naše studije je vidljivo da smo veći broj bolesnika dijagnosticirali u uznapredovalim stadijima bolesti (III i IV), 60,7%, što odgovara podacima nacionalnog registra za rak (9). U promatranom vremenskom razdoblju 34,2% bolesnika je umrlo od osnovne bolesti, 20,4% ih je umrlo od druge bolesti, dok je živih 45,4%. U ispitivanom uzorku više od 76% bolesnika s višim patohistološkim gradusom (II i III) umrlo je unutar pet godina. Dakle, stupanj patohistološkog gradusa i preživljenje bolesnika pokazuju statistički značajnu povezanost ( $\chi^2=19,1$ ,  $df=2$ ,  $p<0,001$ ), dobro diferencirani tumori imaju bolju prognozu od slabo diferenciranih, a ti se rezultati podudaraju s onima iz literature (22). Isto tako postoji statistički značajna razlika (Log rank test,  $\chi^2=52,65$ ,  $p<0,001$ ) u krivulji preživljenja između tri skupine bolesnika koji imaju različiti stupanj patohistološkog gradusa, iako treba naglasiti da patohistološki gradus ima ograničenu vrijednost u predviđanju tijeka bolesti (22). U 95,1% bolesnika preživjelih preko pet godina nije bilo regionalnih metastaza, pa je razumljivo da je povezanost statistički značajna ( $\chi^2=58,2$ ,  $df=2$ ,  $p<0,001$ ), što potvrđuju i podatci iz literature koji ukazuju da je zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova značajan prognostički faktor za karcinome grkljana (13,23-25). Iz rezultata našeg istraživanja je razvidno da 83,7% bolesnika s uznapredovalim stadijima bolesti (III i IV) umire unutar pet godina, te da je povezanost između preživljenja i stadija statistički značajna ( $\chi^2=53,4$ ,  $df=3$ ,  $p<0,001$ ). Također postoji statistički značajna razlika (Log rank test,  $\chi^2=86,53$ ,

$p < 0.001$ ) u krivulji preživljenja između četiri skupine bolesnika koji imaju različiti stupanj stadija bolesti. Navedeni podatci se slažu s činjenicom da je stadij bolesti u trenutku postavljanja dijagnoze pločastog karcinoma glave i vrata, prema tome i grkljana, najvažniji prognostički čimbenik (13). Utvrdili smo da je povezanost između stadija bolesti i patohistološkog gradusa statistički značajna ( $\chi^2 = 19,7$ ,  $df = 6$ ,  $p = 0,003$ ); dakle, u višim stadijima bolesti u našoj smo studiji našli i više patohistološke graduse.

Prognostički čimbenici za karcinom grkljana dijele se na „klasične“ (TNM, stadij bolesti, patohistološki stupanj diferencijacije) i „suvremene“ (npr. proliferacijski markeri, regulatorne bjelačevine staničnog ciklusa, onkogene, regulatorne bjelačevine apoptoze, proteinaze, čimbenici koji reguliraju angiogenezu i druge) (4,11,13-16). Iako, za sada, TNM klasifikacija, tj. stadij bolesti i patohistološki stupanj diferencijacije tumora imaju najveću vrijednost, sve više se izrađuju studije suvremenih prognostičkih čimbenika, bioloških markera, kao dio dijagnostike malignih tumora (29,94-100). Na tragu tih istraživanja počela se proučavati i uloga E-cadherina i matriks metaloproteinaze -9 (MMP-9). Mali je broj studija o izražajnosti ovih biljega u karcinomima grkljana, a nema ni studije koja ih na toj lokalizaciji istražuje zajedno. Smatramo da analiza izražaja E-cadherina, odgovornog za adhezivnost, pokretljivost i diferencijaciju stanica, te MMP-9, odgovornog za modifikacije u ekstracelularnom matriksu, proliferaciju stanica i neoangiogenezu, može svojim rezultatima ukazati na biološki agresivnije karcinome grkljana. Na osnovi tih rezultata moći će se kvalitetnije planirati liječenje.

Ovom studijom evaluirali smo vrijednost izražajnosti upravo bioloških biljega E-cadherina i MMP-9 na većoj skupini bolesnika oboljelih od pločastog karcinoma grkljana. Imajući u vidu manjkavosti do sada poznatih prognostičkih faktora, ovaj rad ima za cilj ukazati na moguću ulogu E-cadherina i MMP-9 u pločastim karcinomima grkljana.

Izražajnost E-cadherina je dokazana u 139 (70,9%) od 196 bolesnika uključenih u studiju, a prikazali smo ju kroz tri stupnja. Izražajnost E-cadherina stupnja 0 utvrdili smo u 57 (29,1%) bolesnika, dok smo pozitivnu izražajnost E-cadherina utvrdili u 139 (70,9%) bolesnika, i to: izražajnost stupnja 1 u 64 (32,7%) bolesnika, a stupnja 2 u 75 (38,3%) bolesnika.

Dokazali smo statistički značajnu povezanost ( $p < 0,001$ ) između stupnja izražajnosti E-cadherina i patohistološkog gradusa, stadija bolesti, sklonosti metastaziranju, sklonosti recidiviranju i preživljenja. U našoj studiji dokazali smo, što



je slično rezultatima studije Rodriga i suradnika (49), odsutnost, tj. smanjenu izražajnost E-cadherina pri većem patohistološkom gradusu, u višem stadiju bolesti, pri prisutnim metastazama, te u onih sklonih recidivu bolesti. Zanimljiva je studija Kurtza i suradnika koji su utvrdili da je slabija izražajnost E-cadherina povezana s lošijom prognozom tumora grkljana i usne šupljine, iako nisu dokazali povezanost izražajnosti i metastaziranja u limfne čvorove (53). Za razliku od njih, a što je u skladu s rezultatima naše studije, Paksoy i suradnici su dokazali da je smanjena izražajnost E-cadherina povezana s učestalijim metastaziranjem karcinoma grkljana (34). Sukladno tome, smanjenje izražajnosti E-cadherina može biti neovisan prediktor metastaziranja u limfne čvorove i biljeg u identificiranju bolesnika rizičnih za okultne metastaze. Temeljem ovog zaključka mogli bi se razlučiti bolesnici koji bi trebali biti podvrgnuti elektivnoj disekciji vrata (34,47-51,57).

Kaplan-Meierova krivulja pokazuje statistički značajnu razliku (Log rank test,  $\chi^2=104,8$ ,  $p<0,001$ ) u preživljenju između tri skupine bolesnika koji imaju različiti stupanj izražajnosti E-cadherina. Iz rezultata je vidljivo da je na kraju promatranog vremenskog razdoblja manje od 2% umrlih kada je E-cadherin izražen intenzivno. Ako je bojanje na E-cadherin odsutno, umrlih je više od 93%, a kod stupnja 1 bojanja na E-cadherin, umrlih je oko 33%. Mattijssen i suradnici su u svojoj studiji, slično našim rezultatima, prikazali bolje preživljenje u bolesnika s izraženijim E-cadherinom, iako je studija bila izrađena općenito na karcinomima glave i vrata (101). U istoj studiji nije nađena značajna korelacija između izražajnosti E-cadherina i veličine primarnog tumora i sklonosti regionalnom metastaziranju (101). Gaspar i suradnici (54) te Berx i suradnici (55), kao i mi u našoj studiji, utvrdili su povezanost smanjene izražajnosti E-cadherina s ranijim recidivima bolesti i kraćim preživljenjem bolesnika.

Iz rezultata regresijske analize (*Cox regression*) kliničkih i patohistoloških prediktora preživljenja za promatrano vremensko razdoblje vidljivo je kako je E-cadherin u kombinaciji s gradusom statistički značajan ( $p<0,01$ ) prediktor preživljenja. Isto tako je vidljivo da je E-cadherin u kombinaciji sa stadijem statistički značajan ( $p<0,01$ ) prediktor preživljenja.

Treba međutim istaknuti oprez prilikom tumačenja značajnosti pojedinih prediktora u Coxovoj regresiji jer kod nekih kategorija i prediktora omjer rizika i navedene granice za 95% interval pouzdanosti značajno premašuju standardne vrijednosti i interpretacije koje se kreću oko 1 ili jednoznačenkastih brojeva. Razlog

navedenih vrijednosti je vjerojatno u neproporcionalnim i malenim brojevima ispitanika po pojedinim kategorijama.

Izražajnost MMP-9 u studiji je dokazana u 95 (48,4%) od 196 bolesnika uključenih u studiju, a slične rezultate izražajnosti MMP-9 u planocelularnom karcinomu grkljana pokazali su u svojim studijama Bogusiewicz i suradnici (86) te Uloza i suradnici (102). Izražajnost MMP-9 prikazali smo kroz tri stupnja. Izražajnost MMP-9 stupnja 0, dakle negativnu izražajnost MMP-9 utvrdili smo u 101 (51,5%) bolesnika, dok smo pozitivnu izražajnost MMP-9 utvrdili u 95 (48,4%) bolesnika, i to: izražajnost MMP-9 stupnja 1 u 33 (16,8%) bolesnika, stupnja 2 u 62 (31,6%) bolesnika. Utvrdili smo statistički značajnu povezanost ( $p < 0,001$ ) između stupnja izražajnosti MMP-9 i patohistološkog gradusa, stadija bolesti, sklonosti metastaziranju, sklonosti recidiviranju i preživljenja.

U našoj studiji dokazali smo pojačanu izražajnost MMP-9 pri većem patohistološkom gradusu, u višem stadiju bolesti, pri prisutnim metastazama, te u onih sklonih recidivu bolesti. Slično rezultatima naše studije, Gou i suradnici (87) ukazuju na pozitivnu korelaciju između pojačane izražajnosti MMP-9 i stadija bolesti te sklonosti metastaziranju. Isti autori su u studiji pokazali da je pojačana izražajnost MMP-9 povezana s kraćim vremenom preživljenja bolesnika (87). O-Charoenrat i suradnici pokazali su u svojoj studiji značajnu korelaciju između pojačane izražajnosti MMP-9 i uznapredovalih stadija bolesti, iako su oni promatrali korelaciju sa svim planocelularnim karcinomima glave i vrata, a ne isključivo karcinomima grkljana (68). Naši rezultati pokazuju značajnu korelaciju između pojačane izražajnosti MMP-9 i sklonosti metastaziranju u limfne čvorove, i u skladu su s rezultatima istraživanja Xiea i suradnika (60).

Wittekindt i suradnici nalaze značajnu korelaciju pojačane izražajnosti MMP-9 i patohistološkog gradusa, ali također u istoj studiji, suprotno našim rezultatima, ne nalaze korelaciju izražajnosti MMP-9 sa stadijem bolesti, sklonosti metastaziranju i sklonosti recidivu tumora (88). Suprotno rezultatima naše i većine drugih studija, Liu i suradnici (90) nisu pronašli značajnu korelaciju između izražajnosti MMP-9 i kliničko-patohistoloških karakteristika planocelularnog karcinoma (histološkog gradusa, TNM kliničkog stadija bolesti, primarnog sijela). Kaplan-Meierova krivulja pokazuje statistički značajnu razliku (Log rank test,  $\chi^2 = 152,6$ ,  $p < 0,001$ ) u preživljenju između tri skupine bolesnika koji imaju različiti stupanj izražajnosti MMP-9. Utvrdili smo da je samo 8% živih bolesnika s izražajnošću MMP-9 drugog stupnja, dok je

umrlih pri istom stupnju izražajnosti 92%. Suprotno tome, 100% je živih bolesnika pri izražajnosti MMP-9 nultog stupnja, dakle pri odsutnosti izražajnosti MMP-9 u promatranom vremenskom razdoblju.

Iz rezultata regresijske analize (*Cox regression*) kliničkih i patohistoloških prediktora preživljenja za promatrano vremensko razdoblje je vidljivo da u kombinaciji s gradusom MMP-9 postaje značajan, i to ne na svim razinama ( $p < 0,05$ ). Dakle, očigledno je da u regresijskom modelu MMP-9 i gradus odnose međusobno jedan dio varijance koji je značajan u bivarijatnoj statistici, što je prije izloženo u rezultatima. Istovjetan rezultat je vidljiv kada se umjesto gradusa analizira stadij bolesti i MMP-9.

Sličan rezultat je dobio i Gou sa suradnicima, koji ukazuju da je pojačana izražajnost MMP-9 povezana s kraćim vremenom preživljenja bolesnika (87).

Značajnu korelaciju u izražajnosti MMP-9 i preživljenja u studiji na 217 bolesnika s karcinomima glave i vrata pokazuju Smilek i suradnici (90). Načelno, što je MMP-9 izraženiji, prognoza i preživljenje bolesnika je lošije. Izražajnost MMP-9 biološkog markera u našoj studiji pokazala je potencijalnu prediktivnu vrijednost za planocelularne karcinome grkljana. Iz svega navedenog proizlazi da ovo istraživanje, po broju bolesnika uključenih u studiju i dobivenim rezultatima, predstavlja značajan doprinos u profiliranju MMP-9 kao prognostičkog biološkog markera za predikciju agresivnosti tumora, a sukladno tome i oblikovanje terapijskog pristupa.

Poznato je da je gubitak E-cadherina važan korak u malignoj progresiji putem smanjivanja adhezivnosti među stanicama kao i razdvajanju od bazalne membrane, a postoje također indicije da to utječe na lučenje MMP-9 (45,46,103). Za našu studiju osobito je važan rezultat istraživanja Eriksena i suradnika koji ukazuju da gubitak E-cadherina predstavlja, moguće, važan korak u povećavanju sposobnosti stanica da luče MMP-9 u svrhu degradacije matriksa, omogućujući tako invaziju i metastaziranje (45,46).

Ovu povezanost u jedinoj studiji koja je rađena u pločastom karcinomu jednjaka potvrđuju Sato i suradnici, ukazujući da povećana ekspresija MMP-9 i redukcija E-cadherina korelira s ranim metastazama u limfne čvorove (58). U našoj smo studiji ispitivali izražajnost, odnos i međusoban utjecaj E-cadherina i MMP-9 u karcinomu grkljana. Dokazali smo da je povezanost izražajnosti MMP-9 i E-cadherina statistički značajna ( $\chi^2=152,8$ ,  $df=4$ ,  $p < 0,001$ ). Dakle, pri izražajnosti MMP-9 stupnja 0, 70,3% bolesnika ima izražajnost E cadherina stupnja 2, a samo 1%

ih ima izražajnost E-cadherina stupnja 0, dok pri izražajnosti MMP-9 stupnja 2, 79% bolesnika ima izražajnost E-cadherina 0-og stupnja, a ni jedan bolesnik u tom slučaju nema izražajnost E-cadherina stupnja 2. Njihov je odnos obrnuto proporcionalan: što je izraženiji E-cadherin, slabije je izražen ili odsutan MMP-9. Do sada nitko nije istraživao njihov međusoban odnos u karcinomima grkljana.

Ovom smo studijom pokazali da će u bolesnika s pločastim karcinomom grkljana nepovoljnijih histopatoloških i kliničkih osobina izražajnost E-cadherina biti smanjena, a MMP-9 povećana, što će za posljedicu imati lošiju prognozu bolesti.

Temeljem tih rezultata, u daljnjem slijedu nalazimo da je kod takve skupine bolesnika očekivano preživljenje kraće. Kako vjerodostojnih biljega u karcinomima grkljana zasada nema, analiza biološkog ponašanja pločastog karcinoma grkljana kroz izražajnost E-cadherina i MMP-9 predstavlja mogući doprinos razrješavanju dileme o agresivnosti ovog karcinoma. Takav bi se doprinos neposredno očitovao u formiranju stavova, izboru terapije i prognozi tijekom bolesti, pridonoseći čvršćim i jasnijim protokolima liječenja. Ovakav bi pristup oboljelima od karcinoma grkljana omogućio u konačnici kvalitetniji život i dulje preživljavanje.

Cilj bi bio otkriti pločaste karcinome grkljana s negativnom ili smanjenom izražajnošću E-cadherina i povećanom izražajnošću MMP-9, koji bi se u kliničkoj praksi tretirali kao agresivniji tumori i na kojima bi se primijenili agresivniji protokoli liječenja, a sam pristup liječenju bio bi individualiziran. Za pretpostaviti je da bi ovakvo liječenje ranih stadija bolesti tumora agresivnijih karakteristika modificirali u multimodalitetno, umjesto uobičajenog jednodalitetnog. U uznapredovalom bi pak stadiju bolesti mogli odabrati između multimodalitetnog pristupa, koji uključuje kirurški zahvat i dodatno onkološko liječenje, te konzervativnog, dakle primarnog onkološkog liječenja (104). Kod manje agresivnih tumora, smanjenjem opsega liječenja izbjegle bi se mnoge nuspojave adjuvantnog liječenja, poboljšala kvaliteta života, a također i smanjila cijena liječenja.

## 6. ZAKLJUČCI

Temeljem dobivenih rezultata možemo zaključiti sljedeće:

1. Izražajnost E-cadherina je značajno povezana sa stupnjem patohistološkog gradusa, stadijem bolesti, sklonošću regionalnom metastaziranju, sklonošću recidiviranju bolesti i preživljenjem bolesnika.
2. Izražajnost MMP-9 je značajno povezana sa stupnjem patohistološkog gradusa, stadijem bolesti, sklonošću regionalnom metastaziranju, sklonošću recidiviranju bolesti i preživljenjem bolesnika.
3. Postoji značajna razlika u preživljenu triju skupina bolesnika s različitim stupnjem izražajnosti MMP-9.
4. Uočena je značajna razlika u preživljenu triju skupina bolesnika s različitim stupnjem izražajnosti E-cadherina.
5. Povezanost izražajnosti MMP-9 i E-cadherina je značajna ( $\chi^2=152,8$ ,  $df=4$ ,  $p<0,001$ ). Njihov međusoban odnos je obrnuto proporcionalan: što je izraženiji E-cadherin, MMP-9 je slabije izražen do odsutan.
6. Rezultati višestruke analize kliničkih i patohistoloških prediktora pokazuju kako je izražajnost E-cadherina kao prediktora značajno povezana s preživljenjem, i to u zasebnim, pojedinačnim odnosima s gradusom i stadijem bolesti.
7. Iz višestruke analize kliničkih i patohistoloških prediktora vidljivo je da je izražajnost MMP-9 kao prediktora značajno povezana s preživljenjem, i to u zasebnim, pojedinačnim odnosima s gradusom i stadijem bolesti, ali ne na svim razinama ( $p<0,05$ ).

## 7. SAŽETAK

Cilj ove studije bio je istražiti povezanost izražajnosti E-cadherina i matriks metaloproteinaze-9 (MMP-9) s histopatološkim i kliničkim osobinama pločastog karcinoma grkljana, te značajnost izražajnosti E-cadherina i MMP-9 na prognozu i preživljavanje bolesnika.

U studiju je bilo uključeno 196 bolesnika s pločastim karcinomom grkljana liječenih u Klinici za bolesti uha, grla i nosa i kirurgiju glave i vrata KBC Split u periodu od 1.siječnja 2000. do 31.prosinca 2009. godine.

Dokazali smo statistički značajnu povezanost ( $p < 0,001$ ) između stupnja izražajnosti E-cadherina i MMP-9 i patohistološkog gradusa, stadija bolesti, sklonosti metastaziranju, sklonosti recidiviranju i preživljenja. Također je statistički značajna povezanost ( $\chi^2=152,8$ ,  $df=4$ ,  $p < 0,001$ ) međusobne izražajnosti E-cadherina i MMP-9. Kaplan - Meierova krivulja pokazuje statistički značajnu razliku u preživljenju između triju skupina bolesnika koji imaju različiti stupanj izražajnosti E-cadherina (Log rank test,  $\chi^2=104,8$ ,  $p < 0,001$ ) i MMP 9 (Log rank test,  $\chi^2=152,6$ ,  $p < 0,001$ ). U krivulji preživljenja vidljivo je da su prediktori izražajnost E-cadherina ( $p < 0,001$ ) MMP-9 ( $p=0,001$ ) statistički značajno povezani s preživljenjem. Iz rezultata regresijske analize (*Cox regression*) vidljivo je da je prediktor izražajnost E-cadherina statistički značajno povezan s preživljenjem u analizi s gradusom i stadijom bolesti, dok MMP-9 u kombinaciji s gradusom postaje statistički značajan, i to ne na svim razinama ( $p < 0,05$ ). Istovjetan rezultat je vidljiv kada se umjesto gradusa analizira stadij bolesti.

Izražajnost E-cadherina i MMP-9 bioloških biljega u našoj studiji pokazala je potencijalnu prediktivnu vrijednost za pločaste karcinome grkljana.

## 8. SUMMARY

### **Expression and significance of Matrix Metalloproteinase-9 and E-cadherin in Squamous Cell Carcinoma of the Larynx**

Aim of this study was to investigate the correlation of E-cadherin and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression with histopathologic and clinical characteristics of laryngeal squamous cell carcinoma, and to assess the role of E-cadherin and MMP-9 expression in patient survival. Study included 196 patients with squamous cell carcinoma of the larynx treated at ENT Department, Split University Hospital, from January 1, 2000 till December 31, 2009. The level of E-cadherin and MMP-9 expression showed a statistically significant correlation ( $p < 0.001$ ) with the disease histopathologic grade, stage, metastatic potential, recurrence potential, survival and between themselves. Kaplan-Meier curve yielded a statistically significant survival difference among the three patient groups with different levels of E-cadherin ( $\chi^2 = 104,8$ ,  $p < 0.001$ ) and MMP-9 ( $\chi^2 = 152,6$ ,  $p < 0.001$ ) expression. The survival curve clearly showed the E-cadherin ( $p < 0,001$ ) and MMP-9 ( $p = 0,001$ ) expression as a predictor of survival to be significantly associated with survival.

Results of Cox regression analysis showed statistically significant survival correlation of E-cadherin expression ( $p < 0,01$ ) in combination with grade and stage and expression of MMP-9 in the same combination showed statistically significant survival relation, but not on every level ( $p < 0,05$ ).

In this study, E-cadherin and MMP-9 expression as a biological marker showed a potential predictive value in laryngeal squamous cell carcinoma.

## 9. POPIS LITERATURE

1. Padovan I. Otorinolaringologija. Zagreb: Školska knjiga; 1991. str. 280-315.
2. Padovan Štern R, Padovan I. Kirurška anatomija usne šupljine, ždrijela, grla i vrata. U: Padovan I, ur. Otorinolaringologija: Kirurgija usne šupljine, ždrijela, grla i vrata. Zagreb: Školska knjiga; 1987. str. 17-28.
3. Hanna E, Suen JY. Larynx. U: Garth Close L, Larson DL, Shah JP, ur. Essentials of Head and Neck Oncology. New York: Thieme; 1998. str. 223-39.
4. Bumber Ž, Katić V, Nikšić-Ivančić M, Pegan B, Petric V, Šprem N. Otorinolaringologija. Zagreb: Naklada Ljevak; 2004. str. 272-5.
5. Katić V, Prgomet D i sur. Otorinolaringologija. Zagreb: Naklada Ljevak; 2009. str. 293-9.
6. Duančić V. Osnove embriologije čovjeka. Beograd-Zagreb: Medicinska knjiga; 1985. str. 123-5.
7. Smith RV, Fried MP. Advanced Cancer of the Larynx. U: Bailey BJ, Johnson JT, Newlands SD, ur. Head & Neck Surgery – Otolaryngology. sv. 2. 4. izd. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins; 2006. str. 1757-77.
8. Fredrickson JM. Larynx/Hypopharynx, Trachea/Bronchus and Esophagus. U: Cummings CW, Fredrickson JM, Harker LA, Krause CJ, Richardson MA, Schuller DE, ur. Otolaryngology – Head & Neck Surgery. sv. 3. 3. izd. St. Louis: Mosby; 1998. str. 823-2241.
9. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Hrvatski nacionalni registar za rak. Incidencija raka u Hrvatskoj 2007; Bilten br. 32.
10. Gasco M, Crook T. The p53 network in head and neck cancer. Oral Oncol 2003;39:222-31.
11. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, ur. World Health Organization Classification of tumors. Pathology and genetics of Head and Neck Tumors. Lyon: IARC Press; 2005, str. 107-208.
12. Đanić D. Prognostička vrijednost profila staničnog ciklusa kod planocelularnog karcinoma grkljana. Doktorska disertacija. Zagreb: Medicinski fakultet; 1997.
13. Shah JP, Patel SG, ur. Head and Neck Surgery and Oncology. Edinburgh: Mosby; 2003. str. 173-394.



14. Damjanov I, Jukić S, Nola M. Patologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2008. str. 352-3.
15. Carey T. Field cancerization: are multiple primary cancers monoclonal or polyclonal? *Ann Med* 1996;28:183-8.
16. Chung KY, Mukhopadhyay T, Kim J, Casson A, Ro JY, Goepfert H, i sur. Discordant p53 gene mutations in primary head and neck cancers and corresponding second primary cancers of upper aerodigestive tract. *Cancer Res* 1993;53:1676-83.
17. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, i sur., ur. *AJCC Cancer Staging Manual*. 7. izd. New York: Springer; 2010. str. 57-67.
18. Greene FL, Page D, Morrow M, Balch C, Haller D, Fritz A, Fleming I, ur. *AJCC Cancer Staging Manual*. 6. izd. New York: Springer; 2002.
19. Beahrs OH, Myers MH. *Manual for staging of cancer*, American Joint Committee on Cancer. 2. izd. Philadelphia: JB Lippincot; 1983. str. 38-9.
20. Michaels L, Hellquist H. *Ear, Nose, Throat Histopathology*. 2. izd. Berlin: Springer Verlag; 2001.
21. Wittekind C, Green FL, Hutter RVP, i sur., ur. *TNM Atlas*. Berlin: Springer; 2004. str. 5-50.
22. Fletcher CDM, ur. *Diagnostic Histopathology of tumors*. London: Churchill Livingstone; 2000. Str. 150-238.
23. Hardisson D. Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2003;260:502-8.
24. Heseck D, Toth M, Meroueh SO, Brown S, Zhao H, Sakr W, i sur. Design and characterization of a metalloproteinase inhibitor-tethered resin for the detection of active MMPs in biological samples. *Chem Biol* 2006;13:379-86.
25. Christopoulos TA, Papageorgakopoulou N, Ravazoula P, Mastronikolis NS, Papadas TA, Theocharis DA, i sur. Expression of metalloproteinases and their tissue inhibitors in squamous cell laryngeal carcinoma. *Oncol Rep* 2007;18:855-60.
26. Goldsmith MM, Pillsbur HC. *Pathologic and cytometric indicators of biological behaviour in laryngeal cancer*. Laryngeal cancer. Silver C.E. izd. New York: Thieme Medical Publisher; 1991. str. 27-32.

27. Maurizi M, Scambia G, Benedetti Panici P, Ferrandina G, Almadori G, Palludetti G, i sur. EGF receptor expression in primary laryngeal cancer: corelation with clinicopathological features and prognostic significance. *Int J Cancer* 1992;52:862-6.
28. Maurizi M, Almadori G, Ferrandina G, Distefano M, Romanini ME, Cadoni G, i sur. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in laryngeal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 1996;74:1253-7.
29. Almadori G, Cadoni G, Galli J, Ferrandina G, Scambia G, Exarchakos G, i sur. Epidermal growth factor receptor expression in primary laryngeal cancer; an independent prognostic factor of neck node relapse. *Int J Cancer* 1999;84:188-91.
30. Rubin Grandis J, Melhem MF, Gooding WE, Day R, Holst VA, Wagener MM, i sur. Levels og TGF-alpha and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:824-32.
31. Wen QH, Miwa T, Yoshizaki T, Nagayama I, Furukawa M, Nishijima H. Prognostic value of EFR and TGF-alpha in early laryngeal cancer treated with radiotherapy. *Laryngoscope* 1996;106:884-8.
32. Dassonville O, Formento JL, Francoual M, Ramaioli A, Santini J, Schneider M, i sur. Expression of epidermal growth factor receptor and survival in upper aerodigestive tract cancer. *J Clin Oncol* 1993;11:1873-8.
33. Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, i sur. E-Cadherin-mediated Cell-Cell Adhesion Prevents Invasiveness of Human Carcinoma Cells. *J Cell Biol* 1991;113:173-85.
34. Paksoy M, Hardal U, Caglar C. Expression of cathepsin D and E-cadherin in primary laryngeal cancers correlation with neck lymph node involvement. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011;137:1371-7.
35. Lionello M, Blandamura S, Agostini M, Staffieri C, Lovato A, Tealdo G, i sur. A prognostic role for Nm23-H1 in laryngeal carcinoma treated with postoperative radiotherapy: an introductory investigation. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2013;270(1):197-203.
36. Lionello M, Staffieri A, Marioni G. Potential prognostic and therapeutic role for angiogenesis markers in laryngeal carcinoma. *Acta Otolaryngol* 2012;132:574-82.

37. Sarafoleanu D, Postelnicu V, Iosif C, Manea C, Sarafoleanu C. The role of p53, PCNA and Ki-67 as outcome predictors in the treatment of laryngeal cancer. *J Med Life* 2009;2:219-26.
38. Takeichi M. Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu Rev Biochem* 1990;59:237-52.
39. Takeichi M. Cadherin Cell Adhesion Receptors as a Morphogenic Regulator. *Science* 1991;251:1451-5.
40. Hirohashi S. Inactivation of the E-cadherin-Mediated Cell adhesion system in Human Cancers. *Am J Pathol* 1998;153:333-9.
41. Mittari E, Charalabopoulos A, Batistatou A, Charalabopoulos K. The role of the E-cadherin/catenin complex in laryngeal cancer. *Exp Oncol* 2005;27:257-61.
42. Reichel O, Mayr D, Durst F, Berghaus A. E-cadherin but not  $\beta$ -catenin expression is decreased in laryngeal biopsies from patients with laryngopharyngeal reflux. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2008;265:937-42.
43. Charalabopoulos K, Binolis J, Karkabounas S. Adhesion molecules in carcinogenesis. *Exp Oncol* 2002;24:249-57.
44. Nagafuchi A, Takeichi M. Cell binding function of E-cadherin is regulated by the cytoplasmic domain. *EMBO J* 1988;7:3679-84.
45. Eriksen JG, Steiniche T, Sogaard H, Overgaard J. Expression of integrins and E-cadherin in squamous cell carcinomas of the head and neck. *APMIS* 2004;112:560-8.
46. Eriksen JG, Steiniche T, Overgaard J. The role of epidermal growth factor receptor and E-cadherin for the outcome of reduction in the overall treatment time of radiotherapy of supraglottic larynx squamous cell carcinoma. *Acta Oncol* 2005;44:50-8.
47. Liu M, Lawson G, Delos M, Jamart J, Remacle K. Expression of E-cadherin adhesion molecule in vocal cord carcinomas. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1997;254:417-21.
48. Liu M, Lawson G, Delos M, Jamart J, Chatelatin B, Remacle K, 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;260:28-34.

49. Rodrigo JP, Domínguez F, Alvarez C, Manrique C, Herrero A, Suárez C. Expression of E-cadherin in squamous cell carcinomas of the supraglottic larynx with correlations of clinicopathological features. *Eur J Cancer* 2002;38:1059-64.
50. Rodrigo JP, Domínguez F, Suárez V, Canel M, Secades P, Chiara MD. Focal Adhesion Kinase and E-Cadherin as Markers for Nodal Metastasis in Laryngeal Cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2007;133:145-50.
51. Rodrigo JP, Dominguez F, Alvarez C, Herrero A, Suarez C. Expression of E-Cadherin, CD44s, and CD44v6 in Laryngeal and Pharyngeal Carcinomas. *Am J Otolaryngol* 2003;24:384-9.
52. Massarelli E, Brown E, Tran NK, Liu DD, Izzo GJ, Lee JJ, i sur. Loss of E-Cadherin and p27 Expression is Associated with Head and Neck Squamous Tumorigenesis. *Cancer* 2005;103:952-9.
53. Kurtz KA, Hoffman HT, Zimmerman MB, Robinson RA. Decreased E-Cadherin but not  $\beta$ -Catherin Expression is Associated With Vascular Invasion and Decreased Survival in Head and Neck Squamous Carcinomas. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;134:142-6.
54. Gaspar RH, de los Toyos JR, Alvarez Marcos C, Riera JR, Sampedro A. Quantitative immunohistochemical analyses of the expression of E-cadherin, thrombomodulin, CD44H and CD44v6 in primary tumours of pharynx/larynx squamous cell carcinoma and their lymph node metastases. *Anal Cell Pathol* 1999;18:183-90.
55. Berx G, Becker KF, Höfler H, van Roy F. Mutations of the Human E-Cadherin (CDH1) Gene. *Hum Mutat* 1998;12:226-37.
56. Rieber M, Strasberg Rieber M. DN-R175H p53 mutation is more effective than p53 interference in inducing epithelial disorganization and activation of proliferation signals in human carcinoma cells: Role of E-cadherin. *Int J Cancer* 2009;125:1604-12.
57. Franchi A, Gallo O, Boddi V, Santucci M. Prediction of occult Neck Metastases in Laryngeal Carcinoma: Role of proliferating Cell Nuclear Antigen, MIB-1, and E-Cadherin Immunohistochemical Determination. *Clin Cancer Res* 1996;2:1801-8.

58. Sato F, Shimada Y, Watanabe G, Uchida S, Makino T, Imamura M. Expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase-9, and E-cadherin in the process of lymph node metastasis in oesophageal cancer. *Br J Cancer* 1999;80:1366-72.
59. de Lima JM, de Souza LG, da Silva ID, Forones IM. E-cadherin and metalloproteinase-1 and -7 polymorphisms in colorectal cancer. *Int J Biol Markers* 2009;24:99-106.
60. Xie M, Sun Y, Li Y. Expression of matrix metalloproteinases in supraglottic carcinoma and its clinical implication for estimating lymph node metastases. *Laryngoscope* 2004;114:2243-8.
61. Peschos D, Damala C, Stefanou D, Tsanou E, Assimakopoulos D, Vougiouklakis T, et al. Expression of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) in benign, premalignant and malignant laryngeal lesions. *Histol Histopathol* 2006;21:603-8.
62. Germani RM, Civantos FJ, Elgart G, Roberts B, Franzmann EJ. Molecular markers of micrometastasis in oral cavity carcinomas. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2009;141:52-8.
63. Rosenthal EL, Matrisian LM. Matrix metalloproteases in head and neck cancer. *Head Neck* 2006;28:639-48.
64. Tretiakova MS, Hart J, Shabani-Rad MT, Zhang J, Gao ZH. Distinction of hepatocellular adenoma from hepatocellular carcinoma with and without cirrhosis using E-cadherin and matrix metalloproteinase immunohistochemistry. *Mod Pathol* 2009;22:1113-20.
65. Stamenkovic I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol* 2000;10:415-33.
66. Ray J, Stetler-Stevenson WG. The role of matrix metalloproteases and their inhibitors in tumor invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur Respir J* 1994;7:2062-72.
67. Westermarck J, Kähäri VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J* 1999;13:781-92.
68. O-Charoenrat P, Rhys-Evans PH, Eccles SA. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2001;127:813-20.

69. Görögh T, Beier UH, Bäumken J, Meyer JE, Hoffmann M, Gottschlich S, i sur. Metalloproteinases and their inhibitors: influence on tumor invasiveness and metastasis formation in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck* 2006;28:31-9.
70. Ranuncolo SM, Matos E, Loria D, Vilensky M, Rojo R, Bal de Kier Joffé E, i sur. Circulating 92-Kilodalton Matrix Metalloproteinase (MMP-9) Activity Is Enhanced in the Euglobulin Plasma Fraction of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer* 2002;94:1483-91.
71. Coussens LM, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the development of cancer. *Chem Biol* 1996;3:895-904.
72. Vihinen P, Kähäri VM. Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int J Cancer* 2002;99:157-66.
73. Ikebe T, Shinohara M, Takeuchi H, Beppu M, Kurahara S, Nakamura S, i sur. Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase in tumor tissues correlates with invasiveness of oral cancer. *Clin Exp Metastasis* 1999;17:315-23.
74. Kodate M, Kasai T, Hashimoto H, Yasumoto K, Iwata Y, Manabe H. Expression of matrix metalloproteinase (gelatinase) in T1 adenocarcinoma of the lung. *Pathol Int* 1997;47:461-9.
75. Papathoma AS, Petraki C, Grigorakis A, Papakonstantinou H, Karavan V, Stefanakis S, i sur. Prognostic significance of matrix metalloproteinase 2 and 9 in bladder cancer. *Anticancer Res* 2000;20:2009-13.
76. Schmalfeldt B, Prechtel D, Harting K, Späthe K, Rutke S, Konir E, i sur. Increased expression of matrix metalloproteinases (mmp)-2, mmp-9 and the urokinase-type plasminogen activator is associated with progression from benign to advanced ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7:2396-404.
77. Maeta H, Ohgi S, Terada T. Protein expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinase 1 and 2 in papillary thyroid carcinomas. *Virchows Arch* 2001;438:121-8.
78. Kurahara S, Shinohara M, Ikebe T, Nakamura S, Beppu M, Hiraki A, i sur. Expression of MMPs, MT-MMP and TIMPs in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlations with tumor invasion and metastasis. *Head Neck* 1999;21:627-38.

79. Ohashi K, Nemoto T, Nakamura K, Nemori R. Increased expression of matrix metalloproteinase 7 and 9 and membrane type 1-matrix metalloproteinase in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer* 2000;88:2201-9.
80. Gokaslan ZL, Chintala SK, York JE, Boyapati V, Jasti S, Sawaya R, i sur. Expression and role of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in human spinal column tumors. *Clin Exp Metastasis* 1998;16:721-8.
81. Zeng ZS, Huang Y, Cohen AM, Guillem JG. Prediction of colorectal cancer relapse and survival via tissue RNA levels of matrix metalloproteinase-9. *J Clin Oncol* 1996;14:3133-40.
82. Woo M, Park K, Nam J, Kim JC. Clinical implications of matrix metalloproteinase-1, -3, -7, -9, -12, and plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphisms in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22:1064-70.
83. Kuniyasu H, Ellis LM, Evans DB, Abbruzzese JL, Fenoglio CJ, Bucana CD, i sur. Relative expression of E-cadherin and type IV collagenase genes predicts disease outcome in patients with resectable pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999;5:25-33.
84. Hara I, Miyake h, Hara S, Arakawa S, Kamidono S. Significance of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinase expression in the recurrence of superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 2001;165:1769-72.
85. Loyo M, Pai SI. The molecular genetics of laryngeal cancer. *Otolaryngol Clin North Am* 2008;41:657-72.
86. Bogusiewicz M, Stryjecka-Zimmer M, Szymanski M, Rechberger T, Golabek W. Activity of matrix metalloproteinases-2 and -9 in advanced laryngeal cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;128:132-6.
87. Gou XX, Jin F, Chen HX, Wu WL, Chen L, Zeng Y. Expression of CD147, MMP-2 and MMP 9 in laryngeal carcinoma and clinical significance. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2010;90(18):1264-7.
88. Wittekindt C, Jovanovic N, Guntinas-Lichius O. Expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and blood vessel density in laryngeal squamous cell carcinomas. *Acta Otolaryngol* 2011;131(1):101-6.

89. Smilek P, Dusek L, Vesely K, Rottenberg J, Kostrica R. Correlation of expression of Ki-67, EGFR, c-erbB-2, MMP-9, p53, bcl-2, CD-34 and cell cycle analysis with survival in head and neck squamous cell cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2006;25(4):549-55.
90. Liu WW, Zeng ZY, Wu QL, Hou JH, Chen YY. Overexpression of MMP-2 in laryngeal squamous cell carcinoma: a potential indicator for poor prognosis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;132(3):395-400.
91. Deeb G, Wang J, Ramnath N, Slocum HK, Wiseman S, Beck A, i sur. Altered E-cadherin and epidermal growth factor receptor expressions are associated with patient survival in lung cancer: a study utilizing high-density tissue microarray and immunohistochemistry. *Mod Pathol* 2004;17:430-9.
92. Karahan N, Baspinar S, Yariktas M, Kapucuoglu N. Matrix Metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) and Cyclooxygenase-2 (COX-2) Expressions in Vocal Fold Polyps. *J Voice* 2009;23:29-33.
93. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ M. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2000;56(2):106-30.
94. Pastereli HE, Ozbilim G, Elpek O, Fisenk F, Balkan E. Nm 23 and cathepsin D expression in laryngeal carcinoma. *Adv Clin Path* 2000;4:121-3.
95. Spafford MF, Koeppe J, Pan Z. Correlation of tumor markers p53, bcl-2, CD34, CD44H, CD44v6 and Ki-67 with survival and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2000;122:627-32.
96. Pignatato L, Cappacio P, Pruneri G, Carboni N, Buffa R, Neri A, i sur. The predictive value of p53, MDM-2, cyclin D1 and Ki-67 in the progression from low grade dysplasia towards carcinoma of the larynx. *J Laryngol Otol* 1998;112:455-9.
97. Cappacio P, Pruneri G, Carboni N, Pagliari AV, Buffa R, Neri A, i sur. Cyclin D1 protein expression in related to clinical progression in laryngeal squamous cell carcinoma. *J Laryngol Otol* 1997;111:622-6.
98. Bayazit Y, Mumbuc S, Ucak R, Kanlikama M, Bakir K. Significance of Fas protein in squamous cell carcinoma of the larynx. *Arch Otolaryngol* 2000;120:557-61.
99. Jin C, Jin Y, Wennerberg J, Dictor M, Mertens F. Nonrandom pattern of cytogenetic abnormalities in squamous cell carcinoma of the larynx. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;28:66-76.



100. Sun PC, el-Mofty SK, Haughey BH, Scholnick SB. Allelic loss in squamous cell carcinomas of the larynx: discordance between primary and metastatic tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 1995;14(2):145-8.
101. Mattijssen V, Peters HM, Schalkwijk L, Manni JJ, van 't Hof-Grootenboer B, de Mulder PH, i sur. E-cadherin expression in head and neck squamous cell carcinoma is associated with clinical outcome. *Int J Cancer* 1993;55:580-5.
102. Uloza V, Liutkevicius V, Pangonyte D, Saferis V, Lesauskaite V. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in recurrent respiratory papillomas and laryngeal carcinoma: clinical and morphological parallels. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2011;268(6):871-8.
103. Van den Brekel MW, Bindels EM, Balm AJ. Prognostic factors in head and neck cancer. *Eur J Cancer* 2002;38:1041-3.
104. Chin D, Boyle GM, Theile DR, Parsons PG, Coman WB. Molecular introduction to head and neck cancer (HNSCC) carcinogenesis. *Br J Plast Surg* 2004;57:595-602.

## 10. ŽIVOTOPIS

Rođen sam u Splitu 20. listopada 1972. godine, gdje sam završio osnovnu i srednju školu. Diplomirao sam na Medicinskom fakultetu u Rijeci 1998.godine.

Pripravnički staž obavio sam u KBC Split, a državni ispit položio u Zagrebu.

Početak 2000. godine zaposlio sam se u DZ Hvar u hitnoj službi. Godine 2002. započeo sam specijalizaciju iz Otorinolaringologije u Klinici za bolesti uha, grla i nosa i kirurgiju glave i vrata KBC Split, a specijalistički ispit sam položio 2007. u Zagrebu, te od tada radim kao specijalist otorinolaringolog u Klinici za bolesti uha, grla i nosa i kirurgiju glave i vrata KBC Split.

Aktivno sam sudjelovao na brojnim tečajevima i kongresima u zemlji i inozemstvu, kao predavač i moderator. Također sam bio voditelj tečaja trajnog usavršavanja i u više navrata član organizacijskog odbora raznih stručnih skupova. Autor sam i koautor više znanstvenih i stručnih radova. U sklopu specijalističkog usavršavanja boravio sam u *Institut de cancerologie "Gustave Roussy"* u Parizu i *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center* u New Yorku.

Završio sam stručni poslijediplomski studij: „Otorinolaringologija i maksilofacijalna kirurgija“ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, te poslijediplomski doktorski studij „Klinička medicina“ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu.