

# Prognostička vrijednost intratumorske heterogenosti ekspresije beta-ksenina i E-kadherina u planocelularnim karcinomima grkljana

---

Vasilj, Ankica

Doctoral thesis / Disertacija

2011

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:941618>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-03**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)





## Središnja medicinska knjižnica

**Vasilj, Ankica (2011) *Prognostička vrijednost intratumorske heterogenosti ekspresije beta-katenina i E-kadherina u planocelularnim karcinomima grkljana [Prognostic value of intratumoral heterogeneity of beta-catenin and e-kadherin in the squamous cell laryngeal carcinoma].* Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

<http://medlib.mef.hr/1015>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ankica Vasilj**

**Prognostička vrijednost intratumorske  
heterogenosti ekspresije beta-  
katenina i E-kadherina u  
planocelularnim karcinomima grkljana**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2011.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ankica Vasilj**

**Prognostička vrijednost intratumorske  
heterogenosti ekspresije beta-  
katenina i E-kadherina u  
planocelularnim karcinomima grkljana**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2011.**

Disertacija je izrađena u Kliničkom zavodu za patologiju KBC Zagreb Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Voditelj rada: prof.dr.sc. Sven Seiwert

Zahvaljujem prof.dr.sc. Svenu Seiwertu na mentorstvu, te stručnoj pomoći pruženoj tijekom izrade ovog rada. Zahvaljujem dr.sc. Paški Konjevodi, dr.med. na stručnoj i tehničkoj pomoći. Takođe zahvaljujem mr.sc. Silvi Ćurić-Jurić, dr.med. i mr.sc. Sandri Kojić Katović, dr.med. na potpori i razumijevanju.

Rad posvećujem majci Jeli i sjećanju na prerano preminulog oca Martina.

## POPIS SKRAĆENICA

(p) TNM.....	(p)patološki T tumor N limfni čvorovi M metastaze
WHO.....	Svjetska zdravstvena organizacija
PCNA.....	antigen jezgra proliferirajućih stanica
Ki67.....	proliferacijski marker
EGFR.....	receptor za epidermalni čimbenik rasta
TRF.....	transferinski receptor
p53.....	gen prigušivač tumora
c-erbB-2.....	gen prigušivač tumora
nm 23.....	gen prigušivač tumora
AgNOR.....	argirofilna regija nuklearnog organizatora
DNA.....	deoksiribonukleinska kiselina
CDH1.....	gen za E-kadherin
APC.....	adenomatozna polipoza crijeva
Tcf/LEF.....	T stanični čimbenik/limfoidni čimbenik
CTNNB1.....	gen za beta-katenin
GSK-3.....	glikogen-sintetaza-kinaza-3
c-Myc.....	gen prigušivač tumora
HE.....	hematoksilin-eozin
ABC.....	Avidin biotin kompleks
CT-Bk.....	citoplazmatski beta-katenin
MM-Bk.....	membranski beta-katenin
CT-Ek.....	citoplazmatski E-kadherin
MM-Ek.....	membranski E-kadherin
TR.....	transformacijski rub tumora
CT.....	centar tumora
IR.....	invazivni rub tumora
RPART.....	rekurzivno particioniranje algoritamski program
KM krivulje.....	Kaplan-Meier krivulj

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Grkljan (larynx).....	1
1.1.1. Anatomija grkljana.....	2
1.1.2. Embriologija grkljana.....	3
1.1.3. Histologija grkljana.....	4
1.2. Planocelularni karcinom grkljana.....	5
1.2.1. Histopatologija karcinoma grkljana.....	8
1.3. Prognostički čimbenici karcinoma grkljana.....	10
1.3.1. Standardni prognostički čimbenici.....	10
1.3.1.1. Histološki gradus karcinoma grkljana.....	11
1.3.1.2. Lokalizacija karcinoma grkljana.....	12
1.3.1.3. TNM klasifikacija karcinoma grkljana.....	14
1.3.2. Dodatni prognostički čimbenici karcinoma grkljana.....	17
1.3.3. Značaj prognostičkih čimbenika karcinoma grkljana.....	18
1.4. Kadherin/kateninski proteinski kompleks.....	19
1.4.1 E-kadherin.....	20
1.4.2. Beta-katenin.....	23
1.4.3. Kadherin/kateninski proteinski kompleks u onkološkim studijama.....	24
1.5. Intratumorska heterogenost.....	31
1.5.1. Heterogenost planocelularnog karcinoma grkljana.....	34
1.5.2. Prognostički čimbenici u odnosu na intratumorska heterogenost.....	34
2. HIPOTEZA I CILJ RADA.....	36
3. BOLESNICI I METODE.....	37
3.1. Bolesnici.....	37
3.2. Metode.....	39
3.2.1. Imunohistokemija.....	40
3.2.2. Statistička analiza.....	41
4. REZULTATI.....	44
4.1. E-kadherin.....	45

4.2. Beta-katenin.....	48
4.3. Usporedba membranskog i citoplazmatskog E-kadherina i beta-katenina po tumorskim zonama.....	53
4.4. Vrijednost ispitivanih parametara prema. klasičnim prognostičkim čimbenicima.....	55
4.5. Procjena preživljenja postupkom po Kaplan-Meieru.....	59
4.5.1. Gradus tumora i preživljenje (Kaplan-Meier).....	59
4.5.2. T i preživljenje (Kaplan-Meier).....	60
4.5.3. N i preživljenje (Kaplan-Meier).....	61
4.5.4. Lokalizacija tumora i preživljenje (Kaplan-Meier).....	62
4.5.5. Kaplan-Meierove krivulje preživljenja za E-kadherin.....	63
4.5.5.1. Membranski E-kadherin u transformacijskom rubu tumora i preživljenje (Kaplan-Meier).....	64
4.5.5.2. Membranski E-kadherin u centru tumora i preživljenje (Kaplan-Meier ).....	65
4.5.5.3. Citoplazmatski E-kadherin u invzivnom rubu tumora i preživljenje (Kaplan-Meier).....	66
4.5.6. Kaplan-Meierove krivulje preživljenja za beta-katenin.....	67
4.5.6.1. Membranski beta-katenin u. invazivnom rubu i preživljenje (Kaplan-Meier).....	68
4.5.6.1. Citoplazmatski beta-katenin u transformacijskom rubu i preživljenje (Kaplan-Meier).....	69
4.5.7. Rezultati analize uporabom RPART algoritma.....	70
5. RASPRAVA.....	75
6. ZAKLJUČCI.....	85
7. SAŽETAK.....	88
8. SUMMARY.....	89
9. LITERATURA.....	90
10. ŽIVOTOPIS.....	100



## **UVOD**

### **1.1. Larynx (grkljan)**

Grkljan se nalazi u prednjemu gornjemu dijelu vrata u visini od trećega do šestoga vratnog kralješka. Respiratorna i zaštitna uloga su primarne i vitalne funkcije grkljana. On je dio tubularnog sustava za izmjenu zraka s plućima u tijeku respiratornih pokreta. Pokretima laringealnih mišića regulira se veličina otvora glotisa, a kontrakcijom vanjskih mišića grkljan se tijekom udisaja spušta prema dolje te tako povećava negativan tlak u prsnoj koši, što pospješuje disanje. Osim toga, drži se kako je glotis refleksogeno kontroliran kemijskim sastavom krvi (1).

Zaštitna funkcija grkljana osniva se na mehanizmu sfinktera koji se tijekom evolucije razvio kako bi štitićo dišne puteve od stranih tijela. U grkljanu postoje tri sfinktera. Prvi čine ariepiglotidni nabori, aritenoidne hrskavice i epiglotis. U taj sfinkter ukomponirani su i mišići, a on djeluje u toku degluticije i povraćanja, sprečavajući ulazak hrane i tekućine u dišni sustav. Drugi je sfinkter građen od ventrikularnih nabora, fibroznoga i elastičnoga tkiva i ima dvojaku funkciju. Prva je povećavanje intratorakalnog tlaka, a druga dodatno ojačavanje djelovanja prvog sfinktera. Treći sfinkter, koji čine glasnice djeluje mehanički, ne dopuštajući izlazak ili ulazak zraka iz trahealnoga stabla (2).

Fonacija, kao sekundarna uloga, razvila se iz iz refleksogenog zatvaranja grkljana, razvojem središnjeg živčanog sustava i boljom diferencijacijom perifernih organa, što je omogućilo prilagodbu svih organa koji sudjeluju u funkciji fonacije (3).

### 1.1.1. Anatomija grkljana

Skelet grkljana čine hijaline hrskavice: tiroidna, krikoidna i dvije aritenoidne hrskavice te fibrokartilaginozni epiglotis (4).

Tiroidna hrskavica (*cartilago thyroidea*) najveća je hrskavica grkljana. Pomoću donjih i gornjih rogova tiroidna hrskavica vezana je za hioidnu kost, odnosno krikoidnu hrskavicu. Krikoidna hrskavica (*cartilago cricoidea*) ima oblik prstena pečatnjaka čija je široka ploča okrenuta straga. Svojim kružnim oblikom i čvrstoćom gradi osnovicu hrskavičnog skeleta grkljana. Aritenoidi su parne hrskavice (*cartilagine arytenoideae*) u obliku trostrane piramide postavljene na gornji rub ploče krikoidne hrskavice. Epiglotis, *cartilago epiglottica*, elastična je hrskavica u obliku lista. Pričvršćena je tiroepiglotidnim ligamentom za štitnu hrskavicu, njezin je gornji rub slobodan. Na epiglotisu su brojne udubine, rupice, u koje se uvlači sluznica i njezini adneksi (4).

Sve hrskavice grkljana međusobno su povezane zglobovima i ligamentima. Mišići grkljana funkcionalna su cjelina. Dije se na vanjske i unutarnje. (4). Vanjski su mišići inervirani živčanim vlaknima koja potječu od vagusa, hipoglosusa i gornjeg cervikalnog živca. Služe za fiksaciju grkljana i vertikalne pokrete. Unutarnji mišići grkljana dijele se u dvije skupine: adduktore koji zatvaraju glotis, a jedan je mišić abduktor koji otvara glotis. Abduktor je mišić respiracije, dok su adduktori mišići fonacije (4).

Inervacija u motorici grkljana ima vrlo važnu ulogu. Konačno je prihvaćeno mišljenje kako *n. laryngeus inferior* ili *recurrens* opskrbljuje sve unutarnje mišiće grkljana motornim vlaknima. *Nervus laryngeus*

*superior* ili *cranialis* dijeli se na dvije grane. Njegova je vanjska grana motorna. Unutarnja je grana senzitivna i opskrbljuje sluznicu grkljana iznad glotisa. Oba laringealna živca grane su živca vagusa (4).

Šupljina grkljana anatomski se dijeli na tri etaže. One na presjeku imaju oblik pješčanog sata. Gornja etaža, *vestibulum laryngis*, proteže se od ulaza do ruba *plicae ventricularis*, srednja etaža, *glottis*, prostor je između *plicae ventricularis* i *plicae vocalis*. Tom dijelu pripada i *ventriculus laryngis*, prostor koji se širi i lateralno od spomenutih nabora. Ispod glasnice je subglotidni prostor koji je prema dolje omeđen donjim rubom krikoidne hrskavice (4).

Arterijsku krv dobiva grkljan od gornje, srednje i donje laringealne arterije (4). Limfne žile vestibuluma vode u čvorove na hiotiroidnoj membrani, a one iz glavne šupljine grkljana u čvorove koji leže s lateralne strane dušnika. Vokalne usne nemaju limfnih žila. Kroz epiglotis prolaze limfne žilice prema bazi jezika, pa je to jedan od puteva kojim se može proširiti maligni proces iz grkljana (4).

### **1.1.2. Embriologija grkljana**

Kad je embrio u dobi od približno četiri tjedna, pojavljuje se na ventralnoj stijenci prednjeg crijeva malena izraslina; dišni divertikul (plućni pupoljak) koji je osnova grkljana, dušnika, bronha i pluća. Kranijalni kraj te cijevi otvara se u ždrijelo pomoću uskog otvora (primitivni aditus laryngis), dok kaudalni kraj završava slijepo. Od kranijalnog dijela laringotrahealne cijevi razvijaju se grkljan i dušnik, a od kaudalnog dijela kad se podijeli na dvije grane, bronhi i pluća. Glasnice (*plicae vocalis*) počnu se isticati već potkraj trećeg fetalnog mjeseca, a nešto kasnije i *ventriculus laryngis* (5).

Epitel grkljana je endodermalnog porijekla, a hrskavica i mišići potiču od mezenhima četvrtog i šestog ždrijelnog luka (6).

Budući da mišići grkljana nastaju od mezenhima četvrtog i šestog ždrijelnog luka, sve ih inerviraju ogranci X moždanog živca (*n. vagus*). *N. laryngeus superior* inervira derivate četvrtog ždrijelnog luka, a *n. laryngeus recurrens* derivate šestog ždrijelnog luka. Hrskavični sastojci četvrtog i šestog ždrijelnog luka spoje se i od njih se razvijaju hrskavice grkljana, tijekom drugog mjeseca embrionalnog razvoja (6).

Grkljan dječaka u pubertetu raste pod utjecajem muških spolnih hormona, samo onda ako laringealno tkivo posjeduje odgovarajuće androgene receptore. Tkivo normalnog ženskog grkljana također ima androgene receptore, ali je koncentracija androgenih hormona preniska da bi stimulirala grkljan na odgovarajući rast (7).

### **1.1.3. Histologija grkljana**

Grkljan je nepravilna cijev koja povezuje ždrijelo s dušnikom. Unutrašnjost grkljana prekrivena je sluznicom koja ima višeredni cilindrični epitel s trepetljikama, a u koji su uklopljene vrčaste stanice i tubuloalveolarne žljezde (8).

U lamini propriji smještene su grkljanske hrskavice, koje su po svojoj građi najslabije u dišnom sustavu. Veće hrskavice (tiroidna, krikoidna i najveći dio aritenoidnih) su hijaline, a neke od njih u starijih ljudi ovapnjaju. Manje hrskavice su elastične (epiglottis, kuneiformna, kornikulata i vrhovi aritenoidnih). Hrskavice su međusobno povezane svezama. Većina ih je pripojena na unutrašnje mišiće grkljana, koji su poprečno isprugani. Hrskavice imaju potpornu ulogu (održavaju dišne puteve otvorenima), a služe i kao zalistak koji sprečava ulaženje

progutane hrane ili tekućine u dušnik. Sudjeluju i u stvaranju zvukova pri govoru (8).

Epiglotis strši s ruba grkljana u ždrijelo i ima dvije plohe: jezičnu i grkljansku. Cijela jezična strana i dio grkljanske strane uz vršak, obloženi su mnogoslojnim pločastim epitelom. Prema bazi grkljanske strane epiglotisa taj epitel prelazi u višeredni cilindrični s trepetljikama. Ispod epitela nalaze se mješovite seromukozne žljezde (9).

Ispod epiglotisa sluznica stvara dva para nabora koji strše u lumen grkljana. Gornji par čini lažne glasnice (vestibularni nabori) obložene tipičnim respiracijskim epitelom, ispod kojeg se u lamini propriji nalaze brojne serozne žljezde. Donji par nabora čini prave glasnice. Veliki snopovi usporednih elastičnih vlakana, koji izgrađuju vokalni ligament, leže u vokalnim naborima, koji su obloženi mnogoslojnim pločastim epitelom. Usporedo sa svezama teku snopovi skeletnih vokalnih mišića, koji prilagođavaju napetost nabora i njegovih sveza. Dok se zrak potiskuje između nabora ti mišići omogućuju stvaranje zvukova različite frekvencije. Mnogoslojni pločasti epitel je prikladniji za mehaničko opterećenje glasnica, nego što bi bio nježni višeredni cilindrični epitel (8).

## **1.2. Planocelularni karcinom grkljana**

Zloćudni tumori grkljana čine 1-2% svih zloćudnih tumora. Više od 90% svih malignih tumora grkljana su planocelularni karcinomi. Ostale vrste malignih tumora jesu: sekretorni tumori (neuroendokrini i tumori malih žlijezda slinovnica), tumori vezivnog tkiva (hondrosarkom, leiomiosarkom, rabdomiosarkom i dr.), limfoproliferativni tumori, melanomi i metastatski tumori (10). Od zloćudnog tumora grkljana obolijeva 8-10 puta više muškaraca nego žena. U muškaraca obuhvaća 2-5% svih malignih tumora, a u žena taj udio iznosi 0,3% (11). Broj novooboljelih u Hrvatskoj

iznosi 8,9 (17,3 na 100 000 stanovnika za muškarce i 1,2 na 100 000 stanovnika za žene) (12). Među karcinomima grkljana najčešći je klasični planocelularni karcinom, a rjeđe se javljaju; verukozni planocelularni karcinom, planocelularni karcinom vretenastih stanica, te bazaloidni planocelularni karcinom (13). U vrijeme dijagnosticiranja oko 60% tumora je lokalizirano u grkljanu, 25% ima regionalne, a 10% udaljene metastaze. Obzirom na životnu dob, 70% karcinom grkljana se javlja između pedesete i sedamdesete godine života, oko 12% između četrdesete i pedesete, a 4% između tridesete i četrdesete godine života. Vrlo su rijetki bolesnici mlađi od trideset godina. U dobi između desete i tridesete otkriveno je 1 do 2% slučajeva (2,3).

Etiološki čimbenici koji se povezuju s nastankom karcinoma grkljana su: pušenje, alkohol, gastroezofagealni refluks, infekcija humanim papiloma virusom, laringealna keratoza i leukoplakija, prašina, azbest, formaldehid, izloženost radijaciji te hrana siromašna voćem i povrćem. Učestaliju pojavu karcinoma u starijih osoba neki autori tumače većim utjecajem hormonalnih poremećaja u procesu starenja. Za češću pojavu karcinoma u pojedinim obiteljima okrivljuju se još nedovoljno poznati genetički čimbenici (14).

Gornji aerodigestivni trakt u izravnom je dodiru sa širokom paletom mogućih kancerogenih agenasa kao što su dim, tekućine, pare i prašine. Cigarete i alkohol zajedno su vrlo snažni kancerogeni čimbenici u nastanku karcinoma grkljana. Rizik je razmjerno proporcionalan duljini pušačkog staža i broju popušanih cigareta odnosno količinama alkohola koje se konzumiraju. Svaki od navedenih agenasa može pridonijeti dvostrukom, odnosno trostrukom povećanju rizika; ako se pak udruže, rizik se može povećati za više od petnaest puta. Osim djelovanja kancerogenih tvari iz duhana, pušenje bi moglo i posredno utjecati na razvoj zloćudnog tumora oštećenjem obrambenih sposobnosti dišnog puta (15). Alkohol pak izaziva oštećenje i upalu sluznice gornjih probavnih

puteva te pogoduje nastanku gastroezofagealnog refluksa, što može posredno oštetiti i sluznicu grkljana. Alkohol također smanjuje resorpciju hranjivih tvari i vitamina. Pritom je osobito važan vitamin A koji sudjeluje u regulaciji dijeljenja epitelnih stanica (14,15).

Karcinom grkljana se u Republici Hrvatskoj učestalo otkriva u zemljoradnika premda bi se mogao češće očekivati u gradskoj sredini, zbog većeg onečišćenja zraka industrijskom prašinom, ispušnim plinovima motornih vozila, dimom i slično. Uzrok tomu nije poznat, ali je moguće da odgovor leži u kancerogenim tvarima iz pesticida. Osim toga, radnici izloženi azbestu, niklu ili oni koji rade u drvanoj industriji imaju također veću incidenciju nastanka karcinoma grkljana. Bolesnici s karcinomom grkljana imaju povećani rizik za nastanak sekundarnog tumora u gornjem aerodigestivnom traktu ili plućima (2).

Prvi klinički simptomi su blagi. Bol se obično javlja kasno, kao i simptomi fonatorne disfunkcije. Svaki simptom koji traje duže od tri tjedna u pušača starijeg od četrdeset godina, treba biti povod temeljitom pregledu. Nelagoda ili bol u grlu ili uhu, kašalj, otežano gutanje, dispneja, hemoptiza, povećani cervikalni limfni čvorovi i gubitak tjelesne težine dodatni su simptomi koji su znak uznapredovalosti bolesti. Prodorom kroz kostur grkljana, tumor će se širiti u okolinu. Pritom se vidi otečeno područje oko grkljana, a ako je tumor probio do kože, ona će biti prožeta tumorom, fiksirana, a zbog popratnih upalnih promjena crvena i otečena. Karcinom grkljana daje limfogene metastaze, ali može, istina rijetko, dati i udaljene hematogene metastaze. One se pojavljuju na plućima, pleuri i vrlo rijetko u kostima (3).

Dijagnoza karcinoma grkljana postavlja se na osnovi kliničke slike, palpacije vrata, laringoskopije, laringograma i tomograma grkljana, biopsije odnosno patohistološkog nalaza. Za precizno određivanje

lokalizacije i proširenosti karcinoma, potrebna je laringomikroskopija, koja je ujedno i najpouzdanija za uzimanje biopsije. Negativan patohistološki nalaz ne isključuje karcinom, te uz pozitivnu kliničku sliku biopsiju treba ponoviti (2,3).

Kada je dijagnoza karcinoma postavljena, a prije nego se odluči o načinu liječenja, neophodna je procjena uznapređovalosti bolesti primjenom različitih dijagnostičkih postupaka. Određivanje stadija karcinoma potrebno je zbog tri glavna razloga: pomoć pri ocjenjivanju različitih načina liječenja, omogućavanje usporedbe različitih načina liječenja te na koncu određivanje najprimjerenijeg suvremenog načina liječenja (15). Isto tako, određivanje stadija bolesti ukazuje i na prognozu bolesti (16). Međunarodno prihvatljiv kriterij za utvrđivanje stadija karcinoma je TNM sustav (17). Obzirom na lokalizaciju karcinomi grkljana dijele se u tri skupine: glotički, supraglotički i subglotički, koji se pak međusobno razlikuju po simptomima, načinu širenja i prognozi (2,3).

U liječenju karcinoma grkljana primjenjuje se kirurška terapija, radioterapija, kemoterapija, te palijacija. Izbor terapije ovisi o lokalizaciji i proširenosti tumora, patohistološkoj dijagnozi i općem stanju bolesnika (2).

### **1.2.1. Histopatologija karcinoma grkljana**

Najčešći histološki tip karcinoma grkljana je planocelularni karcinom, uključujući *ca in situ* i čini oko 90% svih karcinoma. Manje od 10% čine verukozni planocelularni karcinom, planocelularni karcinom vretenastih stanica, anaplastični karcinom malih stanica, adenokarcinom, adenoid cistični karcinom, mukoepidermoidni karcinom, melanom i druge nekeratinizirajuće neoplazme (10).



Postoje dva tipa karcinoma grkljana, od kojih jedan nastaje direktnim prijelazom iz normalnog tkiva u invazivni karcinom, a drugi nastaje preko *carcinoma in situ* (10).

*Carcinom in situ* grkljana priznat je kao zasebni entitet. U većini slučajeva, on se vidi kao periferni (vanjski) rub invazivnog karcinoma, te se smatra da 75% invazivnih karcinoma ima *in situ* komponentu. *Carcinom in situ* počinje u bazalnom sloju višeslojnog pločastog epitela. Karakteriziran je staničnom atipijom, povećanim hiperkromatskim jezgrama, nezrelom keratinizacijom i atipičnim mitozama. Prisutna je i akantozna intrapapilarnih produžetaka epitela. Stanice proliferiraju prema površinskim slojevima, ali i u okolinu žarišta. Za razliku od invazivnog karcinoma, bitna značajka *carcinoma in situ* je što on ne probija bazalnu membranu te ona ostaje intaktna (10,18).

Karcinom pločastih stanica (*carcinoma planocellulare*) nastaje od površinskog višeslojnog pločastog epitela glasnica ili epiglotisa, ali i od višerednog cilindričnog epitela s trepetljikama nakon njegove pločaste metaplazije. Debljina zahvaćenog epitela je obično povećana (akantozna) kao posljedica hiperplazije bazalnog sloja ili češće stratuma spinosuma. Uz to stanice površinskog sloja pločastog epitela pokazuju stvaranje keratohijalinih granula i čine skvame (keratinizacija). Prisutna su dva oblika keratinizacije: ortokeratoza kod koje su keratinizirane stanice izgubile svoje jezgre i parakeratoza kod koje su jezgre održane poput malih tamnih točkica u stanici. Relativni omjer akantozne i keratinizacije jako se razlikuju. Često bazalni sloj pokazuje rast u dubinu u subepitelijalni sloj zadržavajući pri tom bazalnu laminu intaktnu (18).

Makroskopski karcinom grkljana može imati tri oblika: proliferativni s papilarnim, bradavičastim ili kvrgastim tvorevinama, zatim infiltrativni oblik karcinoma koji se širi najčešće na mjestu gdje je mukoza debela i

sluznica iznad tumora može dugo vremena biti bez ulceracija, te ulcerativna forma koja može nastati na jednoj od prethodnih ili takav može biti od samog početka. Većina karcinoma grkljana mjeri u promjeru 1-4 cm (18,19).

### **1.3. Prognostički čimbenici**

Kad je dijagnoza karcinoma postavljena, a prije nego se odluči o načinu liječenja, neophodna je procjena uznapredovalosti bolesti primjenom raznih dijagnostičkih i drugih postupaka. Radikalno liječenje namijenjeno izlječenju, obično nije indicirano ako se karcinom proširio preko granica područja koje se namjerava liječiti. Čak i kada se koristi kemoterapija moraju se predvidjeti očekivanja. Za većinu karcinoma liječenje se razlikuje ovisno o raširenosti bolesti, koju je stoga neophodno točno procijeniti. Ta procjena naziva se «staging» (2).

Za neke karcinome, kada bolesniku dodatna adjuvantna terapija može koristiti, neophodna je vrlo precizna procjena «moguće» ili «vjerojatne» raširenosti, ostatne bolesti, prije nego se odlučimo da li uopće dati adjuvantnu terapiju i ako je dati koja je terapija prikladna. Utvrđivanje stadija karcinoma ukazuje donekle na prognozu bolesti, olakšava izmjenu iskustava između raznih centara liječenja i pridonosi stalnom istraživanju zloćudnih tumora (3).

#### **1.3.1. Standardni prognostički čimbenici**

Unatoč širokoj uporabi klasičnih prognostičkih parametara za karcinome grkljana, uobičajena klasifikacija tumora (tip i lokalizacija), TNM i histopatološko stupnjevanje, su vrijedni samo u predviđanju biološkog ponašanja tog tipa tumora koji još uvijek predstavlja izazov za kliničare.

#### **1.3.1.1. Histološki gradus karcinoma grkljana**

Prema tipu stanične diferencijacije mogu se razlikovati tri tipa planocelularnog karcinoma grkljana. Ova podjela izdržala je test vremena kao i pomna istraživanja te je prihvaćena od Svjetske zdravstvene organizacije, WHO (20).

##### **Gradus 1 (Dobro diferencirani planocelularni karcinom)**

Karakteriziran je poligonalnim vretenastim stanicama, dobro razvijenim intracelularnim mostićima i brojnim keratiniziranim perlama. Jezgre su hiperkromatske, nejednake u veličini i obliku, smanjene količine citoplazme. Stroma tumora je oskudna.

##### **Gradus 2 (Umjereno diferencirani planocelularni karcinom)**

Karakteriziran je oskudnim keratinizirajućim perlama ili ih uopće nema. Ističu se pleomorfne jezgre, mitoze (često atipične) su brojne, a mogu biti prisutne i multinuklearne stanice. Rijetki su intracelularni mostići.

##### **Gradus 3 (Slabo diferencirani planocelularni karcinom)**

Karakteriziran je malobrojnim epitelnim perlama, gotova da nema keratinizacije i intracelularnih mostića, brojne su atipične mitoze, jasna je polimorfija stanica i jezgara.

Stupanj keratinizacije najčešće je obrnuto proporcionalan gradusu, no nađu se i slabo diferencirani karcinomi s izraženim orožnjavanjem (20).

### 1.3.1.2. Lokalizacija karcinoma grkljana

Karcinome grkljana svrstavamo u glotičke, supraglotičke i subglotičke. Takva podjela je opravdana jer se tumori tih lokalizacija razlikuju po simptomima, načinu širenja i prognozi. Glotični prostor uključuje glasnice i prednju komisuru. To je najčešća lokalizacija karcinoma grkljana, s učestalošću oko 60%. Obično se javlja na prednjem dijelu glasnica. Većina karcinoma ove regije su dobro diferencirani planocelularni karcinomi. Ovaj prostor oskudjeva limfnom drenažom, te karcinom glotične regije dugo ostaje lokaliziran i bez metastaza. Glotični karcinomi imaju tendenciju širenja po vertikali, ali može invadirati i okolnu unutrašnju laringealnu muskulaturu. Metastaze se javljaju kasno, tek kad se tumor proširi izvan glasnica i zahvati duboke limfne čvorove uz velike krvne žile vrata. Glasnice su ujedno i najčešće mjesto javljanja *carcinoma in situ*, koji se obično javi na prednjem kraju glasnica, a mogu se proširiti preko prednje komisure na drugu glasnicu (21). Za razliku od invazivnog karcinoma grkljana, *carcinoma in situ* grkljana češće se javlja kod muškaraca srednje dobi u vidu diskretnih promjena (19). Tumori na glasnicama vrlo rano uzrokuju promuklost, koja se postupno pojačava, pa se obično i rano dijagnosticiraju. Pravilo je da se svakom bolesniku u kojega promuklost traje dulje od dva tjedna i koja ne reagira na protuupalno liječenje, pregleda grkljan, pogotovo ako je bolesnik pušač. Svojim rastom tumor glasnica može suziti rиму pa se jave i smetnje disanja. Daljnji simptom karcinoma ove regije je kašalj i obilna ekspektoracija. U ispljuvku se može ponekad vidjeti i tračak krvi (2).

Supraglotični prostor uključuje laringealnu površinu glotisa uključivo s njegovim vrhom, ariepiglotične nabore i mukozu Morgagnijeva ventrikla. Učestalost karcinoma ove regije kreće se oko 30%. Najčešća je lokalizacija ove regije ventrikularni nabor, zatim epiglotis (laringealna strana), a najrjeđe Morgagnijev ventrikul. U praksi se često kasno otkrije, te je teško

odrediti ishodište tumora. Iz ove regije tumor se može proširiti u glotični i subglotični prostor, te i izvan grkljana bilo da zahvati i probije štitnu hrskavicu, bilo da se preko glotisa proširi na njegovu faringealnu stranu, u valemule i bazu jezika, ili preko ariepiglotičnih nabora u sinus piriformis. Karcinom ventrikularnog nabora može se širiti i prema natrag te zahvatiti i aritenoid. Limfnim žilicama karcinom supraglotične regije metastazira u limfne čvorove vrata, najčešće na onu stranu vrata na kojoj je primarni tumor, ali može se proširiti i na drugu stranu (15,22). Najčešće budu zahvaćeni limfni čvorovi oko račvišta karotida, rjeđe područje mandibularnog kuta ili supraklavikularne jame (19). Karcinom supraglotičnog područja kasno daje simptome. Često je prvi simptom osjećaj stranog tijela u grlu, smetnje gutanja a kad se tumor poveća i svojom veličinom suzi lumen grkljana, javit će se i smetnje disanja: inspiratorni stridor, koji se postupno pojačava i može završiti gušenjem (3).

Subglotičko područje najuži je dio grkljana. Subglotički (infraglotički) prostor područje je ispod glasnica do razine prve trahealne hrskavice. To je najrjeđa lokalizacija karcinoma grkljana s učestalošću oko 5%. Tumor ove regije može se proširiti na glotidnu regiju, zahvatiti traheju ili prema natrag jednjak. Nerijetko se širi prema naprijed te zahvati štitnjaču. Metastaze se javljaju u prelaringealnom i paratrahealnom prostoru, te u dubokim limfnim čvorovima vrata. Karcinomi ove lokalizacije imaju najlošiju prognozu (22). Karcinomi subglotičke regije uzrokuju smetnje disanja, a javlja se i promuklost. Prodor tumora prema hrskavičnom skeletu omogućuje prodiranje mikroorganizama, te nastaje popratna upala i perihondritis, a zatim se mogu javiti nekroza i oštećenje pojedinih živaca. Ove popratne pojave uzrokuju bol i često vrlo neugodan vonj truleži iz usta (3).

Karcinomi koji se protežu kroz sve navedene prostore i ispod ventrikula javljaju se u oko 5% slučajeva. Prodorom tumora kroz skelet grkljana, tumor će se širiti u okolinu. Pri tom se vidi otečeno područje oko grkljana, a ako je tumor probio do kože, ona će biti prožeta tumorom, fiksirana, a zbog popratnih upalnih promjena crvena i otečena. Karcinom grkljana može rijetko praviti i udaljene metastaze, hematogeno. One se javljaju na plućima, pleuri i vrlo rijetko u kostima (10,19).

### **1.3.1.3. TNM klasifikacija karcinoma grkljana**

TNM sustav podrazumijeva lokalnu proširenost tumora, prisustvo ili odsustvo metastaza u regionalnim limfnim čvorovima te prisustvo ili odsustvo udaljenih metastaza. Klinički TNM sustav služi za usporedbu rezultata radioterapije i kemoterapije. Nasuprot tome, patološki (p) TNM sustav korisniji je u predviđanju prognoze maligne bolesti. Karcinom grkljana je podijeljen u odnosu na veličinu primarnog tumora (T), proširenost karcinoma u regionalne limfne čvorove (N) i udaljene metastaze (M) (17).

#### **Primarni tumor ( T )**

- TX Primarni tumor se ne može odrediti
- T0 Nema znakova primarnog tumora
- Tis *Carcinoma in situ*

### **Supraglotis**

- T1 Tumor ograničen na područje supraglotisa uz urednu pokretljivost glasnica
- T2 Tumor zahvaća više od jednog područja supraglotisa ili glotisa uz urednu prokrvljenost glasnica
- T3 Tumor ograničen na područje grkljana sa fiksacijom glasnice i/ili se širi na postkrikoidno područje, medijalni zid piriformnog sinusa ili preepiglотиčni prostor
- T4 Tumor se širi kroz tireoidnu hrskavicu i/ili na druga tkiva oko grkljana, npr. orofarinks, meka tkiva vrata

### **Glottis**

- T1 Tumor ograničen na glasnicu(e) / može se širiti na prednju ili stražnju komisuru s normalnom pokretljivošću
- T1a Tumor ograničen na jednu glasnicu
- T1b Tumor zahvaća obje glasnice
- T2 Tumor se širi na supraglotis i/ili glottis, s normalnom ili poremećenom pokretljivošću glasnica
- T3 Tumor ograničen na grkljan s fiksacijom jedne ili obje glasnice
- T4 Tumor se širi kroz tireoidnu hrskavicu i/ili na druga tkiva oko grkljana, npr. orofarinks, meka tkiva vrata

### **Subglottis**

- T1 Tumor ograničen na subglotičnu regiju
- T2 Tumor se širi na jednu ili obje glasnice s normalnom ili poremećenom pokretljivošću
- T3 Tumor je ograničen na grkljan s fiksacijom jedne ili obje glasnice

- T4 Tumor se širi kroz štitnu hrskavicu i/ili na druga tkiva oko grkljana, npr. orofarinks, meka tkiva vrata

### **Regionalni limfni čvorovi na vratu ( N )**

- NX Regionalni limfni čvorovi se ne mogu odrediti
- N0 Nema znakova zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova
- N1 Metastaza je jednom ipsilateralnom limfnom čvoru, do 3 cm veličine
- N2 Metastaza je u jednom ipsilateralnom limfnom čvoru većem od 3 cm, a manjem od 6 cm u najvećem promjeru, ili u multiplim ipsilateralnim limfnim čvorovima ne većim od 6 cm u najvećem promjeru, ili bilateralno ili u kontralateralnom limfnom čvoru ne većem od 6 cm u najvećem promjeru
- N2a Metastaza je u jednom ipsilateralnom limfnom čvoru većem od 3 cm ali ne većem od 6 cm u najvećem promjeru
- N2b Metastaze su u više ipsilateralnih čvorova ne većim od 6 cm u najvećem promjeru
- N2c Metastaze su bilateralne ili kontralateralne ne većih promjera od 6 cm
- N3 Metastaze u limfnom čvoru većeg promjera od 6 cm

### **Udaljene metastaze ( M )**

- MX Udaljene metastaze se ne mogu odrediti
- M0 Nema znakova udaljenih metastaza
- M1 Postoje znakovi udaljenih metastaza

Stadij bolesti znači stvarnu proširenost bolesti u njezinom predterapijskom stanju (16). Patološki TNM u skladu s kliničkom klasifikacijom karcinoma grkljana prikazana je u Tablici 1.



**Tablica 1.**

## Stadij bolesti

Stadij bolesti	Veličina tumora	Regionalni limfni čvorovi	Metastaze
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
IV	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	svaki T	N2	M0
	svaki T	N3	M0
	svaki T	svaki N	M1

**1.3.2. Dodatni prognostički čimbenici**

Postoje brojne studije koje istražuju različite novije prognostičke čimbenike koji bi pomogli u predviđanju biološkog ponašanja tumora na različitim lokalitacijama. Na području karcinoma grkljana istraživane su proteinaze (katepsini B, L i D), membranski glikoproteini kadherin/kateninski proteinski kompleks), zatim proliferacijski markeri (PCNA, Ki-67, EGFR, TFR), onkogeni (p53, c-erbB-2, nm23, ciklinD1) te AgNOR i sadržaj DNA (23-26). Dosadašnji rezultati ukazuju kako noviji čimbenici pokazuju određenu prognostičku vrijednost, primjerice proliferacijski marker Ki 67, sadržaj DNA, AgNOR te proteinaza katepsin D. Isto tako aktivacija nekih protoonkogeno (ras), smanjena ekspresija antionkogeno (p53), kao i poremećaj regulacije regulatornih gena koji kodiraju regulatorne bjelančevine (ciklin D1) imaju određenu prognostičku vrijednost (27-29). Rezultati navedenih studija

većinom pokazuju korelaciju novih, dodatnih prognostičkih čimbenika s klasičnim prognostičkim čimbenicima, kao što su veličina tumora, lokalizacija tumora, TNM i histološki gradus, s tim da se niti jedan do sada istraženiji noviji prognostički parametar ne može izdvojiti kao neovisan prognostički čimbenik (23-29). Nekonzistentni rezultati govore u prilog prognostičkog potencijala kadherin/kateninskog proteinskog kompleksa (30). Mogući razlog toj činjenici je heterogenost tumora koja rezultira disperzijom mjerenih vrijednosti novih prognostičkih parametara na histološkoj razini (31,32).

### **1.3.3. Značaj prognostičkih čimbenika**

Za sljedeće čimbenike utvrđeno je da imaju prognostičko značenje kod karcinoma grkljana;

1. Klinički stadij i lokalizacija su dva međusobno povezana prognostička čimbenika te ih zajedno i navodimo u odnosu na petogodišnje preživljenje: za glotičke karcinome 80% (GI-90%, GII-85%, GIII-60%, GIV<5%), za supraglotičke karcinome 65% (GI-85%, GII-75%, GIII-45%, GIV<5%), za subglotičke 40% (karcinomi lokalizirani na ariepiglotečnim naborima imaju najlošiju prognozu) te za transglotičke karcinome 50% (2).
2. Stupanj diferencijacije tumorskih stanica je neovisan prognostički čimbenik, a razlikujemo; G1 dobro diferencirani, G2 srednje diferencirani i G3 slabo diferencirani karcinom, s tim da dobro diferencirani karcinomi imaju najbolju prognozu (20).
3. Veličina tumora je važan prognostički čimbenik, dokazano je da veći tumori u T1 skupini nakon radioterapije češće lokalno recidiviraju (17).
4. Zahvaćenost limfnih čvorova takođe ima prognostičko značenje; ukoliko su pozitivni na maligne stanice, prognoza ovisi o broju zahvaćenih čvorova, njihovoj veličini i prisustvu ili odsustvu ektranodalnog širenja malignog procesa (18).

5. DNA ploidiya ima prognostički značaj, jer se pokazalo da aneuploidni tumori imaju lošiju prognozu u odnosu na diploidne tumore (32).

Navedeni prognostički čimbenici za karcinome grkljana, čija je prognostička vrijednost dokazana, bazirani su na morfološkim i kliničkim osobitostima karcinoma grkljana, koji se promatra kao uniformna tumorska masa (31).

Unatoč dokazanoj prognostičkoj vrijednosti navedenih klasičnih prognostičkih čimbenika za karcinom pločastih stanica grkljana i dalje postoje nastojanja za otkrivanjem novih prognostičkih parametara koji će, uzimajući u obzir intratumorsku heterogenost, pomoći u razotkrivanju očekivanog ponašanja tumora.

#### **1.4. Kadherin/kateninski proteinski kompleks**

Sposobnost stanica da adheriraju međusobno, te s elementima izvanstaničnog matriksa putem specifičnih molekularnih interakcija, igra odlučujuću ulogu u čitavom nizu procesa poput hemostaze, posebice u održavanju vaskularne i epitelne cjelovitosti, imunog odgovora, upale, embriogeneze i organogeneze te razvoja živčanog sustava. Molekularne interakcije koje omogućuju tu adheziju događaju se pomoću čitavog niza proteina koje zajedničkim imenom nazivamo adhezijske molekule. Gubitak adhezijskih interakcija kao i njihova pretjerana stimulacija mogu biti uzrokom raznih bolesti. Stabilne međustanične sveze osiguravaju integritet tkiva i omogućuju međustaničnu komunikaciju. Ove funkcije su preduvjet za normalnu diferencijaciju stanica i njihovu organizaciju u pojedina tkiva i organe, a kasnije o njima ovisi svrsishodno funkcioniranje stanica unutar tkiva (33).

Adhezijske molekule su proteini na staničnoj površini koji sudjeluju u međusobnom povezivanju stanica koje može biti homotropno i heterotropno, te u povezivanju stanica s elementima izvanstaničnog matriksa. Homotropna adhezija je međusobno povezivanje istovrsnih stanica, dok je heterotropna adhezija međusobno povezivanje različitih vrsta stanica. S obzirom na tip adhezijskih molekula koje uključuju, međusobnu interakciju stanica također možemo podijeliti u dvije kategorije: homotropne i heterotropne. Članovi iste skupine molekula ulaze u homotropne interakcije, a u heterotropne interakcije ulaze molekule koje pripadaju različitim skupinama. Međustanična adhezija je selektivan proces, tako da stanica priliže samo uz stanicu određenog tipa. Pet vrsta membranskih glikoproteina posreduje povezivanje: selektini, integrini, imunoglobulinska superporodica, kadherini i CD44 (34).

U povezivanju stanica epitelnog tkiva posebnu ulogu ima kadherin/kateninski proteinski kompleks. E-kadherin je molekula tipična za epitelno tkivo, lokalizirana u regijama stanične membrane, znanim kao adherentni spojevi. Izvanstanična domena E-kadherina je zadužena za povezivanje sa susjednim stanicama, dok je unutarstanična domena zadužena za povezivanje s citoskeletom. To povezivanje sa citoskeletom nije direktno, već se ostvaruje putem pomoćnih proteina, katenina. Unutarstanična domena E-kadherina veže ili beta ili gama-katenin, koji se zatim pomoću alfa-katenina veže za aktinski citoskelet (35). U procesu kancerogeneze jedan od ključnih momenata je gubitak mehanizma međustanične adhezije. Neoplastične stanice tada lakše invadiraju okolno tkivo, infiltriraju krvne i limfne žile te naposljetku i metastaziraju (36).

#### **1.4.1. E-kadherin**

Kadherini su molekule, koje obzirom na svoje strukturalne i funkcionalne osobine, spadaju u adhezijske molekule. Postoje dvije različite skupine

međustaničnih adhezijskih molekula, a razlikuju se u potrebi za ionima kalcija, pa tako govorimo o kalciju ovisnim i kalciju neovisnim međustaničnim adhezijskim molekulama. Superobitelj integralnih transmembranskih glikoproteina koji ostvaruju o kalciju ovisnu adheziju stanica nazivamo kadherinima. Kadherini se sastoje od dvije evolucijski različite podobitelji: kadherini tipa 1 (poznati kao klasični kadherini) i kadherini tipa 2. Klasični kadherini ostvaruju međustaničnu interakciju homofilnim tipom vezanja (isti dio molekule na jednoj stanici veže se s istim dijelom molekule na drugoj stanici) dok kadherini tipa 2 (dezmosomalni kadherini) smješteni u dezmozomima gdje su povezani s intermedijarnim filamentima, pokazuju vrlo malo homologije s onima klasičnog tipa te posjeduju neke zajedničke karakteristike koje nisu nađene u kadherina tipa 1 (36,37).

U klasične kadherine ubrajamo N, P, R, B i E kadherine, a ostali članovi obitelji kadherina su dezmogleini i dezmokolini. To su glikoproteini molekularne mase 120-140kD. Osnovnu strukturu klasičnih članova kadherina, čini jedan proteinski lanac koji je smješten transmembranski, a u izvanstaničnoj domeni sadrže seriju od pet motiva koji su premošteni molekulama kalcija. Kalcij je odgovoran za funkciju kadherina i služi za održavanje konformacije, odnosno strukturne cjelovitosti proteina. Klasični kadherini imaju visoko konzerviranu unutarcitoplazmatsku domenu, koju ne nalazimo u ostalih kadherina. Ta domena služi za vezanje staničnog citoskeleta putem specifičnih interakcija s unutarstaničnim proteinima, alfa i beta kateninom. Ove interakcije presudne su u procesima povezivanja stanice sa stanicom (38,39).

E-kadherin je glikoprotein tipičan za epitelno tkivo, a ostali poznatiji predstavnici ove proteinske obitelji su P-kadherin, karakterističan za posteljicu i N-kadherin, karakterističan za neuralno tkivo (37).

CDH1 gen, smješten na kromosomskom mjestu 16q22.1, kodira glikoprotein 120 kD, odnosno E-kadherin, koji se sastoji od jedne velike izvanstanične domene, transmembranskog segmenta i kratke citoplazmatske domene. Strukturu izvanstanične domene E-kadherina čini pet ponavljajućih domena, koje se sastoje od ponavljanja motiva 100 amino-kiselinskih sekvenci, a najveći dio N-terminalnog ostatka ima adhezivnu ulogu (40). Ovaj dio molekule E-kadherina ima vezna mjesta za ione  $Ca^{2+}$ , koja se nalaze između ponavljajućih domena. Sekvence amino kiselina, koje čine mjesto za  $Ca^{2+}$  ione, su visoko specifične kako za razne kadherine unutar obitelji kadherina, tako i za određenu vrstu. Međustanična adhezija, posredovana interakcijom homofilnih E-kadherin izvanstaničnih domena, dio je procesa bočnih dimerizacija (41,42).

Kratka citoplazmatska domena E-kadherina, odnosno C-terminalni ostatak, koji čini očuvani niz od oko 150 amino kiselinskih sekvenci, je visoko homologan s beta i gama kateninom s kojima se povezuje te uz pomoć alfa-katenina, ostvaruje vezu E-kadherina s aktinskim citoskeletom. Smatra se da citoplazmatska domena E-kadherina regulira međustaničnu funkciju izvanstanične domene E-kadherina, kroz interakciju s citoskeletom. E-kadherin je jedna od najvažnijih adhezivnih molekula u epitelnim tkivima (42). Gubitak E-kadherin posredovane međustanične adhezije smatra se jednim od glavnih molekularnih zbivanja odgovornih za prijelaz benignih lezija u maligne, koje karakterizira abnormalna stanična arhitektura, gubitak integriteta tkiva, lokalna invazivnost te na koncu metastaziranje (43,44).

Gubitak funkcije E-kadherina - tumor supresorskog proteina, poklapa se s pojavom invazivnosti i metastaziranjem tumora, zbog čega mu je dodijeljen naziv gen «supresor invazije». Osim toga potvrđeno je kako E-kadherin ima određenu ulogu u Wnt-signalnom putu, zajedno s drugim

ključnim molekulama koje u njemu sudjeluju kao što su beta-katenin i drugi (45,46,47).

#### **1.4.2. Beta-katenin**

Kateninski kompleks se sastoji od; alfa-katenina koji ima strukturne sličnosti s vinculinom, jedna od ključnih molekula membrane fibroblasta koja se veže za mikrofilament, beta-katenina koji je molekula slična armadillo proteinima *Drosophila melanogaster* i gama-katenina koji je identičan plakoglobinu, proteinu koji se nalazi u desmozomima, te kateninima slične molekule, p120 proteina. Do nedavno se smatralo da je jedina uloga ovog kompleksa mehaničko povezivanje E-kadherina s aktinskim citoskeletom. Unutarstanična domena E-kadherina veže ili beta ili gama katenin, koji se zatim pomoću alfa-katenina veže na aktinski citoskelet. Uloga p120 proteina još nije do kraja razjašnjena, no smatra se da regulira međustaničnu adheziju posredovanu E-kadherinom, neovisno o kateninskom kompleksu (34,37).

Beta-katenin je 92-kDa protein kojeg kodira CTNNB1 gen. Ovaj protein se sastoji od više kopija takozvanih armadillo ponavljajućih domena koje su specijalizirane za protein-protein povezivanje. Kada beta-katenin nije povezan s kaderinima i alfa-kateninom, on može stupati u interakcije s drugim proteinima kao što je APC protein, transkripcijski čimbenici, aksinom, komponentama Wnt signalnog puta. Beta-katenin je dio skupine proteina koji osiguravaju adherentne sveze. Upravo adherentne sveze su neophodne za stvaranje slojeva epitelnih stanica koji reguliraju rast stanica i međustaničnu povezanost. Beta-katenin je također uključen u aktinski citoskelet i može biti odgovoran za prijenos signala kontaktne inhibicije kojim se zaustavlja dijeljenje stanica u epitelnim slojevima. U stanici se slobodan beta-katenin, kad ne sudjeluje u Wnt signalnom putu, fosforilira pomoću protein-kinaze GSK-3 te razgrađuje

ubikvitin-proteasomskim sustavom. U ovom procesu razgradnje sudjeluju i APC protein i aksin (48-51).

Novija istraživanja su pokazala da katenini imaju daleko dinamičniju funkciju od pukih vezivanja elemenata, sudjelujući u brojnim signalnim putevima unutar stanice. Jedan od primjera uključuje signalni put Wnt-polipeptida, ključan za procese diferencijacije u vrijeme embriogeneze. Posljedica aktivacije ovog puta je kočenje aktivnosti protein-kinaze GSK-3, te porast slobodnog citoplazmatskog beta-katenina. Slobodni beta-katenin ulazi u staničnu jezgru gdje funkcionira kao kofaktor za Tcf/LEF transkripcijske faktore. Genetski program koji se aktivira pomoću beta-katenin/Tcf/LEF kompleksa, kodira transkripciju skupine gena zaduženih za staničnu proliferaciju, uključujući c-Myc onkogen i ciklin D1 (52,53). Istraživanja molekularnih mehanizama kancerogeneze izdiferencirala su prekomjernu aktivaciju ovog puta u nekim vrstama karcinoma. Beta-katenin također ima funkciju onkogeno, a mutacija ovog gena može dovesti do karcinoma debelog crijeva, pilomatrikoma, meduloblastoma i karcinoma ovarija (36,43).

#### **1.4.3. Kadherin/kateninski proteinski kompleks u onkološkim studijama**

Progresivna akumulacija somatskih mutacija u nekoliko različitih gena karakterizira proces tumorogeneze. Maligne stanice općenito karakteriziraju loše međustanične veze, gubitak epitelne stanične diferencijacije i povećanje stanične pokretljivosti. Smanjena ili potpuno izostala ekspresija E-kadherina, mutacija gena E-kadherina ili drugi mehanizmi koji ometaju funkciju adherentnih spojeva su u podlozi maligne transformacije epitelnih stanica (43).

Rezultati dosadašnjih istraživanja pokazala su povezanost između gubitka heterozigotnosti na 16q i metastatskog potencijala malignih tumora jetre,



prostate i dojke, a mutacije u CDH1 genu se povezuju s nastankom malignih tumora dojke, želuca, endometrija, jajnika i štitne žlezde. Za sada je poznato, da do smanjene ekspresije E-kadherina, koja rezultira malignom transformacijom, dolazi na dva načina. Jedan od njih, nešto su rjeđe mutacije CDH1 gena koji kodira E-kadherin, te se u stanicama nakuplja disfunkcionalna molekula koja se ne može ugraditi u membranu, niti imati adhezivna svojstva. Ovo je svojstveno za lobularni karcinom dojke i difuzni karcinom želuca. Drugi, češći način, je smanjenje ekspresije E-kadherina epigenetskim mehanizmom, metilacijom promotora E-kadherinskog gena koja dovodi do smanjene transkripcije. Ovaj mehanizam svojstven je karcinomu debelog crijeva, hepatocelularnom karcinomu te karcinomima glave i vrata (43,45,47).

Ukoliko je smanjena ekspresija E-kadherina, suvišni beta-katenin se fosforilira, spaja u kompleks s APC proteinom i aksinom te razgrađuje ubikvitin-proteasomskim sustavom. Mutacija koja pogađa kateninsko vezno mjesto za fosforilazu, APC ili aksin, te mutacija samog APC-a ili aksina mogu dovesti do povišene razine beta-katenina u citoplazmi. Tada dolazi do trajne aktivacije Wnt- signalnog puta. Beta-katenin ulazi u jezgru stanice, veže se na Tcf/LEF kompleks i aktivira se transkripcija gena zaduženih za staničnu proliferaciju (48,50,52).

Proces kancerogeneze i uloga kadherin/katenin kompleksa za sada je najbolje proučeno na modelu karcinoma debelog crijeva. U studijama koje su pokušavale razjasniti ulogu kadherin-kateninskog kompleksa u karcinomima debelog crijeva, prije svega je uočena različita imunohistokemijska ekspresija E-kadherina i alfa-, beta- i gama-katenina u stanicama tumora, okolnoj stromi i metastazama. Uočena je značajno veća citoplazmatska ekspresija E-kadherina te alfa-, beta- i gama-katenina u tumorskim stanicama u odnosu na okolnu stromu, a isto tako je uočena značajno veća nuklearna ekspresija beta-katenina u stanicama invazivnog ruba tumora (54,55).

U daljnim istraživanjima imunohistokemijska ekspresija je korelirana s ostalim kliničko-patološkim parametrima kako bi se odredilo značenje i eventualna mogućnost korištenja ekspresije komponenti kadherin-kateninskog kompleksa u razjašnjavanju nastanka i progresije karcinoma crijeva. Tako rezultati jedne studije, ukazuju na povezanost smanjene ekspresije membranskog E-kadherina i slabije diferenciranosti karcinoma crijeva, dok neki autori izvješćuju o značajnoj povezanosti povećane ekspresije citoplazmatskog E-kadherina u stanicama primarnog tumora i ranije pojave recidiva, a potvrđuju i značajnu povezanost visoke ekspresije membranskog E-kadherina u stanicama primarnog tumora i dobre prognoze (56). Ovaj nalaz sugerira da ekspresija citoplazmatskog E-kadherina, koja se ujedno smatra nenormalnom, u tumorskim stanicama karcinoma crijeva ima suprotno biološko značenje u prirodi karcinoma crijeva od ekspresije membranskog E-kadherina, koja se inače smatra normalnom (57).

U ovoj studiji dobiven je i jedan zanimljiv nalaz, povećana ekspresija i membranskog i citoplazmatskog E-kadherina u metastatskim stanicama karcinoma crijeva u jetri, u odnosu na ekspresiju istih u metastatskim stanicama nađenim u drugim sijelima metastaza primarnog karcinoma crijeva. Ovaj nalaz, zajedno s uočenim mutacijama gena za E-kadherin koje ga prate, sugerira da međustanična adhezija posredovana E-kadherinom, može biti uzrokom ulaska i širenja tumorskih stanica u neke organe, kao što je jetra (57,58).

Studija u kojoj se istražuje imunohistokemijska ekspresija E-kadherina, alfa-, beta- i gama-katenina u tumorskim stanicama hepatocelularnog karcinoma i njihova povezanost s kliničko-patološkim parametrima takođe donosi zanimljive rezultate. Slaba ekspresija E-kadherina u tumorskim stanicama hepatocelularnog karcinoma pokazala je značajnu povezanost sa slabom diferencijacijom karcinoma, jaka ekspresija gama-katenina značajno korelira s kapsularnom invazijom i prisustvom

satelitskih čvorića dok jaka ekspresija beta-ksenina značajno korelira s vaskularnom invazijom. U istoj studiji, u odnosu na preživljenje bolesnika s hepatocelularnim karcinomom nađeno je da slaba ekspresija E-kadherina, alfa- i gama-ksenina te jaka ekspresija beta-ksenina ukazuje na kraće preživljenje ovih bolesnika (59,60).

Slična studija rađena je na karcinomima gušterače, pri čemu je uočeno da tumorske stanice pokazuju gubitak membranske i pojavu citoplazmatske ekspresije E-kadherina i alfa-ksenina u slabije diferenciranim karcinomima i onima s metastazama u čvorovima i jetri, dok je ista pojava za beta-ksenin povezana samo s prisustvom metastaza u čvorovima i jetri (61,62).

Slaba ili izostala ekspresija E-kadherina se povezuje i sa slabom diferencijacijom, uznapredovalim kliničkim stadijem i kraćim preživljenjem bolesnika s karcinomom prostate (63).

Poznato je da povećana aktivnost slobodnog beta-ksenina dovodi do pojačane stanične proliferacije, a gubitak ekspresije E-kadherina do smanjena međustanične adhezivnosti (44). Rezultati većine istraživanja provedenih na humanim neoplazmama, ukazuju da je ekspresija E-kadherina u korelaciji sa stupnjem diferencijacije tumorskih stanica (43).

Nalazi većine studija koje su istraživale imunohistokemijsku ekspresiju E-kadherina na stanicama primarnog invazivnog duktalnog i lobularnog karcinoma dojke, te u metastatskim stanicama istih karcinoma, nađena je različita ekspresija E-kadherina u stanicama invazivnog duktalnog karcinoma kao i u metastazama istog (64).

Nasuprot tom nalazu, u stanicama primarnog lobularnog karcinoma dojke ekspresija E-kadherina se kompletno gubi, za razliku od nalaza smanjene ili heterogene ekspresije E-kadherina u područjima lobularne

hiperplazije ili lobularnog ca in situ. Kako u ovoj studiji, tako i više drugih studija koje su se bavile istraživanjem uloge E-kadherin-kateninskog proteinskog kompleksa u karcinomima dojke, nađena je re-ekspresija E-kadherina, ali i alfa-katenina i beta-katenina u metastatskim stanicama lobularnog karcinoma, dok su isti markeri bili istovremeno suprimirani u stanicama primarnog lobularnog karcinoma (65,66).

Na osnovi dosadašnjih istraživanja smatra se da je re-ekspresija ovih adhezivnih molekula u tumorskim stanicama nakon napuštanja primarnog sijela tumora, vjerojatno važna i neophodna tumorskim stanicama pri naseljavanju metastazama drugih organa. Isto tako rezultati više studija sugeriraju kako je ekspresija E-kadherina u karcinomima dojke više povezana s histološkim tipom i stupnjem diferenciranosti tumorskih stanica, nego s invazivnim i metastatskim potencijalom ovog karcinoma (67-69). Novija studija imunohistokemijske ekspresije E-kadherina provedena na uzorku od 204 ne-lobularna karcinoma dojke bez metastaza u unilateralnim limfnim čvorovima, pokazala je da imunohistokemijski pozitivan status E-kadherina nije uvijek povezan s dobrom prognozom karcinoma dojke (70).

Različiti, a često i kontradiktorni rezultati brojnih studija u kojima se pokušava razjasniti uloga i značenje kadherin-kateninskog proteinskog kompleksa u čitavom nizu humanih neoplazmi, vjerojatno je posljedica primjene različitih metoda, između ostalog, i u očitavanju dobivenih rezultata. To je moguće najlakše uočiti na invazivnom duktalnom karcinomu dojke, za kojeg je ustanovljena vrlo heterogena ekspresija E-kadherina unutar istog tipa karcinoma, a što se u raznim studijama na različite načine obrazlagalo i interpretiralo u odnosu na ostale, već od prije etablirane, primjenjene prognostičke čimbenike (64,68).

Istraživanja ekspresije beta-katenina na superficijalno širećim melanomima, uočilo je da bolesnici s Clarkom 4 i 5 imaju značajno nižu ekspresiju beta-katenina od one u bolesnika s Clarkom 2 i 3. Ovaj nalaz

sugerira povezanost beta-katenina i mehanizma nastanka melanoma te otvara mogućnost korištenja beta-katenina kao biljega progresije bolesti (71-73).

Slična istraživanja rađena su i na uzorcima karcinoma grkljana, ali rezultati su nekonzistentni, jer se većina istraživanja radila na relativno malom i heterogenom uzorku, primjenjivani imunohistokemijski markeri te dobiveni rezultati i njihova interpretacija razlikovali su se od studije do studije (30).

U studiji koja analizira ekspresiju E-kadherina u 101 bolesnika sa supraglotičkim karcinomom grkljana, s određenim TNM i stupnjem diferencijacije karcinoma, nađeno je da smanjena ekspresija E-kadherina i na membrani tumorskih stanica ukazuje na povećan rizik od recidiva, a time i na kraće preživljenje. Ekspresija E-kadherina određena je kao score na bazi intenziteta imunohistokemijskog bojenja membrane stanica sustavom od 0 do 4 i postotka obojenih stanica unutar tumora (0-100%) te je score mogao biti od 0 do 400. Rezultat ove studije ukazuje da niski score ekspresije E-kadherina u bolesnika sa supraglotičkim karcinomom ukazuje na metastatski fenotip karcinoma, odnosno da ovaj nalaz može izdvojiti bolesnike s klinički negativnim limfnim čvorovima koji imaju veći rizik za razvoj okultnih metastaza (74).

Koristeći isti sustav skoriranja za ekspresiju E-kadherina, ali i drugih molekula za koje se zna da sudjeluju u tumorogenezi, nađeno je da je smanjena ekspresija E-kadherina i CD44v6 povezana s pojavom metastaza u bolesnika s karcinomom grkljana, ali ne i u bolesnika s karcinomom ždrijela. Ista studija je pokazala da smanjena ekspresija E-kadherina, CD44s i CD44v6 ukazuje na lošiju prognozu bolesnika s karcinomom grkljana, ali ne i u bolesnika s karcinomom ždrijela (75-77).

Rezultati studije koja uključuje 95 bolesnika s karcinomom grkljana praćenih 5 godina, u kojoj se smanjenom ekspresijom E-kadherina smatra ako je manje od 50% tumorskih stanica imunohistokemijski

obojeno, govori u prilog povezanosti smanjene ekspresije E-kadherina s diferencijacijom tumora, metastazama u limfne čvorove i recidivom (78,79). Veći broj studija rađen je na karcinomima pločastih stanica raznih lokalizacija u području glave i vrata, često koristeći sustav smanjene ekspresije ako 50% tumorskih stanica pokazuje smanjeno imunohistokemijsko bojanje u odnosu na normalno bojanje pločastog epitela. Tako prikupljeni rezultati pokazali su povezanost smanjene ekspresije E-kadherina s vaskularnom infiltracijom i skraćenim preživljenjem kod planocelularnih karcinoma u području glave i vrata, dok u odnosu na beta-katenin takva povezanost nije nađena u odnosu niti na jedan promatrani kliničko-patološki parametar (80-82).

Smanjena ekspresija membranskog beta-katenina se povezuje s gubitkom diferencijacije u karcinomima grkljana, a isto tako preliminarne studije govore i za karcinom jednjaka, karcinom želuca i karcinom kolona (83-86). Obzirom na ta saznanja rađena je studija u kojoj se semikvantitativno mjerila membranska i citoplazmatska ekspresija beta-katenina u tumorskim stanicama karcinoma grkljana, za koje je određen stupanj diferencijacije prema Brodersu, s tim da je jaka ekspresija bila jednaka onoj u normalnim stanicama pločastog epitela. U ovoj studiji je također, nađena povezanost smanjene ekspresije membranskog beta-katenina i dediferencijacije tumorskih stanica, a ujedno se beta-katenin pozicionira kao stanična molekula čije oštećenje se može povezati s invazivnijim fenotipom stanica pločastog karcinoma grkljana (87).

Nastavljena istraživanja beta-katenina u pločastim karcinomima glave i vrata potvrđuju uglavnom membransku ekspresiju beta-katenina, a smanjena ekspresija membranskog beta-katenina se povezuje s lošijom prognozom, ali istovremeno nije nađena mutacija gena za beta-katenin. Na osnovi ovih saznanja, smatra se da beta-katenin u tumorskim stanicama pločastih karcinoma, uglavnom djeluje kao adhezivna molekula koja sudjeluje u procesima međustanične adhezije posredovane

E-kadherinom, odnosno da ne sudjeluje u signalnim putevima unutar ovih tumorskih stanica (87,88).

Ovaj pregled studija, njihovih metoda, uzoraka, rezultata i interpretacija rezultata su dovoljno intrigantni te zahtijevaju nastavak istraživanja uloge i značenja ovih markera u tumorogenezi. Isto tako iz svega navedenog proizilazi, kao je neophodno unijeti više standardnih veličina kako bi rezultati raznih istraživača bili usporedivi, što do sada nije bio slučaj pa su prikazani rezultati nekonzistentni, a ponekad i kontradiktorni. Osim inzistiranja na uniformiranju primjenjenih metoda, potrebno je voditi računa o uzorcima, pri čemu treba uzeti u obzir njihovu višestruku i višestranu heterogenost, koja se često zanemaruje, a može značajno utjecati na dobivene rezultate (30).

Sve navedeno, sugerira da bi primjenjivanje standardnih metoda imunohistokemijskih bojenja, jednostavan način očitavanja rezultata bojenja uz poštivanje intratumorske heterogenosti, mogao biti model budućih istraživanja, čiji bi rezultati mogli biti doprinos dosadašnjim saznanjima o značenju i ulozi ekspresije E-kadherina i beta-katenina u karcinomima grkljana.

### **1.5. Intratumorska heterogenost**

Intratumorska heterogenost se definira kao prisustvo višestrukih abnormalnih staničnih linija u različitim dijelovima jednog tumora ili istovremenog postojanja diploidnog i aneuploidnog sadržaja DNA u tumorskim stanicama jednog tumora. Postoji veći broj biokemijskih, citogenetskih, molekularnih, genetičkih i imunoloških dokaza koji govore da većina tumora nastaje iz jedne promijenjene stanice, iz koje napredovanjem nastaje klon tumorskih stanica (89).

Klinički i biološki događaji koji dovode do tumorske progresije ili napredovanja, nastaju kao rezultat sekvencionalne selekcije staničnih

subpopulacija unutar tog klona. U nekih tumora zapažena je progresija od benignih preko neinvazivnih tumora, tumora in situ, pa do pojave maligne bolesti. U pojedinim fazama razvoja tumora može doći do povećanja anaplazije i kromosomskih aberacija. Smatra se da do razvoja klona dolazi uslijed povećanja genetičke nestabilnosti unutar tumorske stanične populacije, a nadalje ta nestabilnost dovodi do budućih genetičkih nepravilnosti i kasnije njihovom selekcijom (90).

Na molekularnoj razini, tumorsko napredovanje i združena različitost najvjerojatnije su posljedica višestrukih mutacija koje se neovisno nakupljaju u različitim stanicama, stvarajući tako subklonove različitih obilježja. Neke od tih mutacija mogu biti smrtonosne, druge mogu usmjeriti rast stanica djelujući na protoonkogene i gene prigušivače tumora. Tako stvoreni klonovi podložni su odabiranju na temelju imunih i neimunih utjecaja, što znači da će stanice koje su izrazito antigene biti razorene obrambenim mehanizmima domaćina, a one koje imaju smanjen zahtjev za čimbenicima rasta budu prihvaćene. Prema tome možemo zaključiti da je tumor bogat onim subklonovima stanica koje su sposobne za preživljavanje, rast i invaziju, odnosno metastaziranje (91,93).

Subklonovi koji su ostali mogu posjedovati zajedničke biljege, mnogi imaju nove osobine koje vode heterogenosti. Većina tumorskih stanica je genetički nestabilnija u odnosu na normalne stanice, a to može biti glavni uzrok fenomenu klonalnog razvoja. Promjene koje se događaju u tumorskim stanicama igraju važnu ulogu u tumorskom napredovanju-progresiji tumora, osim toga smatra se da osobine domaćina utječu na to koji će se klon predominantno širiti (92)

Smatra se da imuni sustav domaćina predstavlja jedan tip selektivnog čimbenika u razvoju neoplazme, osobito u ranim stadijima. Istraživanja na ljudskim i eksperimentalnim tumorima su pokazala kako su tumorske stanice unutar nekog tumora heterogene. Tumorsko tkivo karakterizira genetska i fenotipska heterogenost. Već u vrijeme dijagnosticiranja većina



tumora sadrži različite populacije stanica s nejednakim osobitostima. Razlike mogu biti izražene u kariotipu, proizvodnji hormona, broju i izraženosti receptora na površini stanične membrane, osjetljivost na citotoksične lijekove, biokemijske produkte te sposobnosti metastaziranja. U ranoj fazi rasta tumorske se stanice mogu fenotipski tek malo razlikovati od svog polazišnog tkiva, ali kako tumorsko tkivo raste, stanice postaju manje diferencirane, odnosno više neoplastične. Genetski materijal tumorske stanice je znatno nestabilniji u odnosu na zdravu stanicu, što uzrokuje veći broj mutacija (89).

Tako unatoč činjenici da je većina zloćudnih tumora monoklonalnog porijekla, s vremenom postaje jasno kako su stanice od kojih su sastavljeni različite (heterogene). Na molekularnoj razini, tumorsko napredovanje i tumorska različitost najvjerojatnije su posljedica višestrukih mutacija koje se neovisno nakupljaju u različitim stanicama, stvarajući tako subklonove različitih obilježja. Mutacije u vrijeme klonalnog širenja mogu biti smrtonosne ili mogu usmjeriti rast stanica djelujući na protoonkogene i gene prigušivače (90).

Progresija tumora zasniva se na razvoju subklonova. Tako stvoreni subklonovi podložni su odabiru na temelju imunih i neimunih utjecaja. Rastući tumor sklon je onim klonovima koji su sposobni za rast, preživljavanje te invaziju. Citogenetska istraživanja otkrivaju istodobno postojanje multiple subpopulacije stanica unutar tumora u tijeku progresije (90,94).

Višestruki mehanizmi utječu na tumorsku progresiju te za posljedicu imaju promjene kako u broju tako i u strukturi kromosoma. Oni se mogu podijeliti na prirodene defekte kromosoma, stečene defekte te ekstracelularne čimbenike. Kod prirodnih defekata, nestabilnost defektnih kromosoma rezultira sklonošću određenim tipovima karcinoma. Stečeni defekti kromosoma nastaju pod utjecajem različitih čimbenika

kao što su toksične tvari koje se oslobađaju iz nekrotičnih tumorskih stanica, slobodni radikali koje proizvode makrofagi, radikali kisika iz NK stanica i drugo. Ekstracelularni čimbenici uključuju različite biološke, fizikalne i kemijske agense, kao što su onkogeni virusi, rendgensko zračenje i UV zračenje te kemoterapeutici. Višestruka izloženost nekim od ovih čimbenika dovest će do novih i ireverzibilnih genetskih promjena koje će tumorsku stanicu učiniti još agresivnijom u biološkom ponašanju (89,90,92).

### **1.5.1. Heterogenost planocelularnog karcinoma grkljana**

Tumorska heterogenost odgovorna je za različite biološke i histološke osobine tumora, ali i za njegovo biološko ponašanje te može objasniti veliku varijabilnost u prognozi različitih tumora. Malo se zna o heterogenosti planocelularnog karcinoma grkljana. Poznato je da se u planocelularnom karcinomu može izdvojiti područje dobro diferenciranih stanica s niskom mitotskom aktivnošću od područja sa stanicama koje imaju visoku proliferativnu aktivnost i slabu diferencijaciju. Danas se smatra da područje s višim histološkim gradusom određuje prognozu bolesnika s malignom bolešću te da se recidiv najvjerojatnije javlja u tom području. Mada je intratumorska heterogenost višestruko potvrđena, malo je studija koje istražuju njen utjecaj na prognostički potencijal brojnih prognostičkih čimbenika (95,96).

### **1.5.2. Prognostički čimbenici u odnosu na intratumorsku heterogenost**

U istraživanjima prognostičke vrijednosti cijelog niza prognostičkih čimbenika kod različitih tumora (uključujući i karcinome grkljana), u literaturi se pojavljuju kontradiktorni rezultati, tako da neki autori

opisuju vrlo visoku prognostičku vrijednost za istraživane čimbenike dok ih drugi u potpunosti negiraju (30).

Nekonzistentnost rezultata moguće je povezati s intratumorskom heterogenosti, jer se zajedno obrađuju područja tumora s potpuno različitim biološkim karakteristikama. Procjena tumorske heterogenosti značajna je jer tumori s heterogenom staničnom populacijom imaju veću mogućnost metastaziranja i recidiviranja, kao i lošiji odgovor na kemoterapiju (95).

Postojanje različitih staničnih populacija u jednom tumoru teško se može odrediti rutinskim pregledom histološkog preparata, ali je to moguće uporabom kvantitativnih ili kvalitativnih pokazatelja, odnosno na njima baziranih prognostičkih parametara. Iako je intratumorska heterogenost dobro poznata zahvaljujući eksperimentalnim istraživanjima, malo je kliničkih istraživanja na tom području. Analizirajući morfologiju epitelnih tumora općenito, a karcinoma grkljana posebno, može se ustanoviti da postoje dva različita područja koja se mogu nazvati «rub». Jedno područje je invazivni rub (u većini radova to područje se i uzima kao «rub»), a drugo područje je proliferativni rub, mjesto gdje normalni epitel prelazi u tumorski. Između ta dva područja je centar tumora. Ovakvo razlikovanje tumorskih područja moguće je isključivo na razini histološke pripreme preparata za daljnu analizu (97).

Pregledom dostupne literature nismo našli rad koji je analizirao prognostički potencijal kadherin/kateninskog proteinskog kompleksa u odnosu spram, predhodno opisane, mikroskopski definirane intratumorske heterogenosti.

## 2. HIPOTEZA I CILJEVI RADA

Imajući na umu ulogu beta-ksenina i E-kadherina u procesu kancerogeneze i progresiji tumorskog rasta, predpostavljam da bi ekspresija beta-ksenina i E-kadherina mogla biti još jedan važan prognostički čimbenik kod karcinoma grkljana. Nadalje, uvažavajući intratumorsku heterogenost, prepostavljam da postoji i intratumorska heterogenost ekspresije beta-ksenina i E-kadherina u bolesnika s planocelularnim karcinomom grkljana. Obzirom da su dosadašnji rezultati u smislu prognostičke vrijednosti ekspresije beta-ksenina i E-kadherina u karcinomima grkljana nekonzistentni, prepostavka je da bi njihova ekspresija u različitim, histološki definiranim, dijelovima tumora mogla pružiti čvršće prognostičke pokazatelje.

Ciljevi rada su:

1. Odrediti intratumorsku ekspresiju membranskog i citoplazmatskog beta-ksenina i E-kadherina u planocelularnom karcinomu grkljana u tri različite regije tumora (centar, transformacijski i invazivni rub).
2. Odrediti postoji li prognostička vrijednost ekspresije membranskog i citoplazmatskog beta-ksenina i E-kadherina u planocelularnom karcinomu grkljana.
3. Utvrditi da li intratumorska heterogenost ekspresije membranskog i citoplazmatskog beta-ksenina i E-kadherina pokazuje povezanost s prognostičkim čimbenicima: TNM, histološkim gradusom i lokalizacijom tumora, odnosno s dužinom preživljenja.

### 3. BOLESNICI I METODE

#### 3.1. Bolesnici

U istraživanje je bilo uključeno 90 bolesnika s karcinomom grkljana, koji su operirani na Klinici za bolesti uha, nosa i grla i kirurgiju glave i vrata KBC Zagreb u periodu od 2000.-2005. godine, a kojima je patohistološka dijagnoza planocelularnog karcinoma grkljana postavljena na Kliničkom zavodu za patologiju KBC Zagreb. Za većinu bolesnika poznati su dob, spol, lokalizacija tumora, TNM i histološki gradus tumora, te preživljenje zaključno s 11. studenom 2009. godine. Niti kod jednog bolesnika uključenog u ovo istraživanje preoperativno nije bila provedena terapija citostaticima ili zračenjem.

**Dob bolesnika** bila je u rasponu od 23 do 91 godine, sa srednjom vrijednosti od 57,25 godina (Tablica 2).

**Tablica 2.** Dob bolesnika

<b>Dob bolesnika</b>	<b>Srednja vrijednost</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maksimum</b>	<b>Medijan</b>	<b>Standardna devijacija</b>
n	57,25	23	88	58	9,38

**Spol bolesnika:** Većina bolesnika je muškog spola, a 7 ženskog spola (Tablica 3).

**Tablica 3.** Spol bolesnika

<b>Spol bolesnika</b>	<b>M</b>	<b>Ž</b>
n	83	7
%	92,2	7,8

**Veličina primarnog tumora** prema TNM klasifikaciji bila je: T1 kod 26 bolesnika, T2 kod 14 bolesnika, T3 kod 20 bolesnika, T4 kod 23 bolesnika, a nepoznata veličina primarnog tumora bila je TX kod 7 bolesnika (Tablica 4).

**Tablica 4.** Veličina primarnog tumora

<b>TNM</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>TX</b>
<b>n</b>	26	14	20	23	7
<b>%</b>	28,9	15,6	22,2	25,6	7,8

**Limfni čvorovi** bili su zahvaćeni tumorom u 40 bolesnika, a od toga N1 kod 8 bolesnika, N2 kod 30 bolesnika, N3 kod 2 bolesnika, a za 13 bolesnika podatak o zahvaćenosti limfnih čvorova NX, nismo imali (Tablica 5).

**Tablica 5.** Zahvaćenost limfnih čvorova tumorom

<b>Zahvaćenost limfnih čvorova</b>	<b>NO</b>	<b>N1</b>	<b>N2</b>	<b>N3</b>	<b>NX</b>
<b>n</b>	37	8	30	2	13
<b>%</b>	41,1	8,9	33,3	2,2	14,4

Udaljene metastaze nađene su kod 2 bolesnika.

**Histološki stupanj diferencijacije** je bio G1 (dobro diferenciran) u 18 bolesnika, G2 (umjereno diferenciran) u 43 bolesnika i G3 (slabo diferenciran) u 31 bolesnika (Tablica 6).

**Tablica 6.** Stupanj diferencijacije tumora

<b>Stupanj diferencijacije</b>	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>
<b>n</b>	17	42	31
<b>%</b>	18,9	46,7	34,4

**Lokalizacija primarnog tumora** određena je za sve bolesnike te je bilo 32 glotička, 22 supraglotička, 8 subglotičkih i 28 transglotička karcinoma grkljana (Tablica 7).

**Tablica 7.** Lokalizacija karcinoma grkljana

<b>Lokalizacija tumora</b>	<b>glotis</b>	<b>supraglotis</b>	<b>subglotis</b>	<b>transglotis</b>
<b>n</b>	32	22	8	28
<b>%</b>	35,6	24,4	8,9	31,1

Bolesnici su bili praćeni kroz razdoblje od 4 do 105 mjeseci, s tim da je minimalni period praćenja bolesnika koji nisu umrli bio 54 mjeseca. Od toga je kompletno praćenih-necenzoriranih (onih koji su umrli tijekom perioda praćenja) bilo 46, a cenzoriranih 28. (Tablica 8).

**Tablica 8.** Preživljenje bolesnika

<b>Preživljenje</b>	<b>cenzorirani</b>	<b>necenzorirani</b>	<b>Nema podataka</b>
<b>n</b>	28	46	16
<b>%</b>	31,1	51,1	17,8

### **3.2. Metode**

Uzorci tumorskog tkiva rutinski su fiksirani u 10% formalinu, dehidrirani u uzlaznom nizu alkohola i uklopljeni u parafin, rezani na 3-5 µm tanke rezove koji su stavljeni na silizirane predmetnice. Za histološku analizu rezovi su bojani hemalaun-eozinom. Imunohistokemijska obrada uključila je bojenje anti E-kadherin i anti beta-katenin protutijelima (DAKO, Glostrup, Danska) prema naputcima proizvođača.

### 3.2.1. Imunohistokemija

Imunohistokemijska tehnika je tehnika za određivanje staničnih ili sastavnih dijelova tkiva pomoću reakcije antigen i protutijelo. Mjesto vezivanja protutijela se identificira ili direktnim vezivanjem protutijela ili se koristi metoda sekundarnog vezanja. Antigeni su molekule proteina, ugljikohidrata ili lipida koje imaju jedno ili više veznih mjesta za protutijelo. Vezna mjesta su visoko specifične regije sastavljene od malog broja aminokiselinskih ili monosaharidnih komponenti poznatih kao antigene determinante ili epitopi. Protutijela su imunoglobulini koji se stvaraju u humoralnom imunom sustavu. Produciraju ih plazma stanice, završne stanice u transformaciji B limfocita poslije prepoznavanja stranog antigena. Protutijelo i antigen se vežu kombinacijom vodikovih, elektrostatskih i van der Waalsovih sila.

Indirektna imunohistokemijska metoda podrazumjeva da se primarno nekonjugirano protutijelo veže za antigen. Sekundarno protutijelo konjugirano s markerom uzgojeno u drugoj životinji specifično je za životinju i klasu imunoglobulina te se veže na primarno protutijelo. Inkubacijom u odgovarajućem kromogenom supstratu kompleks postaje vidljiv. Ova metoda je osjetljivija od direktne metode.

Avidin biotin kompleks (ABC) metoda je indirektna imunohistokemijska metoda, a zasniva se na principu sposobnosti glikoproteina avidina iz bjelanjka jajeta da neimunološki veže 4 molekule biotina (vitamina H). Koriste se tri reagensa. Prvi je primarno protutijelo specifično za lokaliziranje antigena. Sekundarno protutijelo konjugirano je s biotinom i avidinom. Enzim peroksidaza i postojanje traženog antigena se vizualizira odgovarajućim kromogenom. Iako se koriste konjugirana protutijela, jako privlačenje između avidina i biotina daje ovoj metodi veću osjetljivost od drugih metoda. ABC metoda omogućuje lokalizaciju brojnih antigena u različitim uzorcima tkiva. Bojenje pozadine («background») se u



imunohistokemiji nastoji eliminirati različitim postupcima, npr. proteolizom. Proteoliza (predigestija) je uspostavljanje imunoreaktivnosti antigena ukoliko su maskirani uslijed djelovanja fiksacije. To se radi s proteolitičkim enzimima 0,1%-tnom pronazom, ali se može raditi i s tripsinom i pepsinom. Izvodi se na temperaturi od 37°C.

Iz predhodno napravljenih parafinskih blokova rezani su rezovi debljine 3-4 µm, nakon čega su deparafinizirani u ksilolu (3x5 minuta), zatim preneseni kroz silazni niz alkohola od 100%, 96% do 80% (rehidracija) i na kraju stavljeni u destiliranu vodu. Rezovi debljine 3 µm stavljeni su na silizirane predmetnice.

Za imunohistokemijsko bojanje E-kadherina korišteno je protutijelo tvrtke Dako, a za bojanje beta-katenina protutijelo takođe tvrtke Dako. Za detekciju ekspresije koristila se indirektna ABC tehnika (LSAB+, Dako, Glostrup, Danska).

Na gotovim preparatima, imunohistokemijska reakcija se mjerila semikvantitativno, koristeći sustav ocjena 0-3 (0-nema reakcije, 1-slaba reakcija, 2-umjerena reakcija, 3-jaka reakcija). Tumorsko tkivo se promatralo u tri različite regije: transformacijskoj zoni-mjestu prelaska normalnog u tumorsko tkivo, centru tumora i u invazivnim tračcima, s tim da su različite regije međusobno udaljene za najmanje jedno vidno polje povećanja 40x. Razina ekspresije beta-katenina i E-kadherina određena je i u citoplazmi i na membrani stanica u tri navedene, različite tumorske regije.

### **3.2.2. Statistička analiza podataka**

Nominalni i ordinalni podaci su prikazani tabelarno kao apsolutne i relativne frekvencije. Razlika u ekspresiji markera u pojedinim regijama je izvršena uporabom  $\chi^2$ -testa. Razlika u preživljenju ispitanika s različitom ekspresijom

za pojedinačne markere procjenjivana je uporabom Kaplan-Meierove metode, a razlike među dobivenim krivuljama određivane su uporabom log-rank testa i Tarone-Ware testa (98).

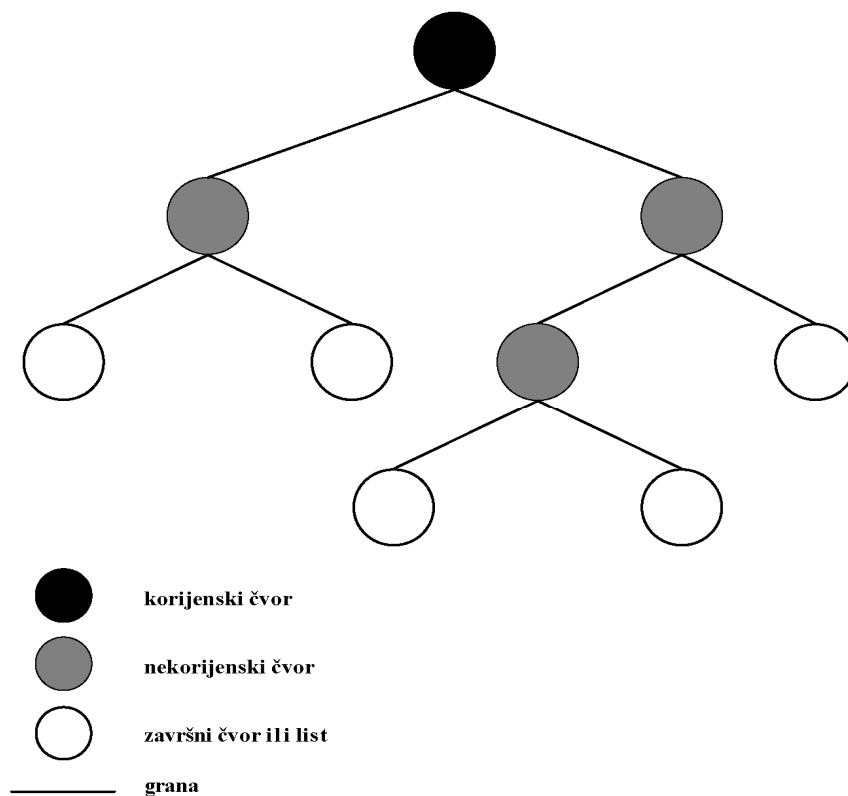
Utjecaj kombinacije varijabli na preživljenje procjenjivan je uporabom RPART klasifikatora. RPART klasifikator može za razliku od klasičnih klasifikatora prihvatiti cenzorirane podatke, kao i podatke o dužini preživljenja. Rekurzivno particioniranje (RP) je metoda umjetne inteligencije koja se koristi za izgradnju klasifikacijskih i regresijskih modela. U onkologiji se koristi za izdvajanje čimbenika rizika, određivanje prognostičkih indeksa, te optimizaciju dijagnostičkih i terapijskih postupaka. Bitna je i činjenica da se rezultati RP-a daleko lakše interpretiraju u odnosu na klasične regresijske metode, koje se koriste u analizi preživljenja poput Coxove regresije ili logističke regresije (99).

Stablo odluke se izgrađuje rekurzivnim (ponavljanim) postupkom razdvajanja podataka, počevši od viših razina prema nižim razinama stabla. Završni čvorovi predstavljaju izdvojene podskupine, dok svaki nekorijenski čvor sadrži pravilo za razdvajanje zvano i pravilo odluke (eng. *splitting or decision rule*). Prema rezultatima usporedbe primjeri se razvrstavaju u lijevu ili desnu granu, pri čemu se nastoji minimizirati razlika između primjera unutar svake grane, što se postiže primjenom različitih optimizacijskih algoritama (99).

Specifičnost je rpart algoritma što može analizirati cenzorirane podatke koji su karakteristični za analizu preživljenja u onkologiji. Odgovor koji se modelira jest umiranje ili recidiv bolesti, a postupak koji se koristi za modeliranje jest Coxova regresija. Vrijednost prikazana u završnim čvorovima (lišću) jest omjer hazarda (eng. *hazard ratio*) koji proizlazi iz Coxove regresije (98,99).

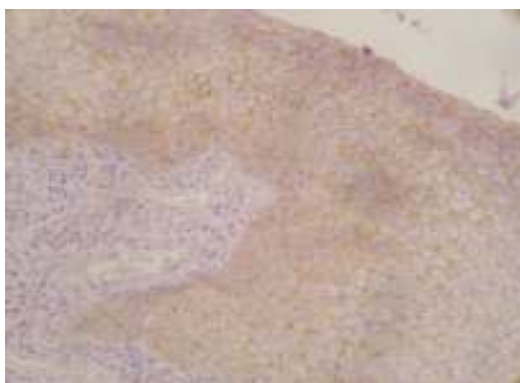
Omjer hazarda u biti predstavlja relativni rizik. Ako je omjer 0,5, to znači da je relativni rizik umiranja u jednoj skupini polovica rizika umiranja u drugoj skupini. Regresija s proporcionalnim hazardom, također zvana Coxova regresija prema statističaru koji je ovu metodu razvio, koristi regresijske

metode za izračunavanje relativnog rizika pomoću jedne ili više prediktorskih varijabli (99,100). Točka razdvajanja u RPART klasifikatoru se zasniva na uporabi tzv. alter priors indeksa koji potječe iz algoritamske teorije informacija, a detaljno je raspravljen u referencama Therneay i suradnici (98-100).



**Slika 1. Stablo odluke.**

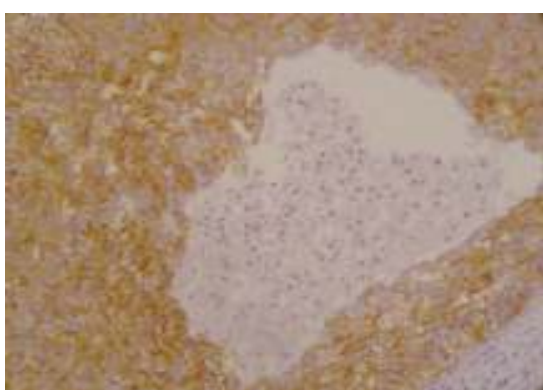
#### 4. REZULTATI



a. Beta-katenin u transformacijskom rubu.



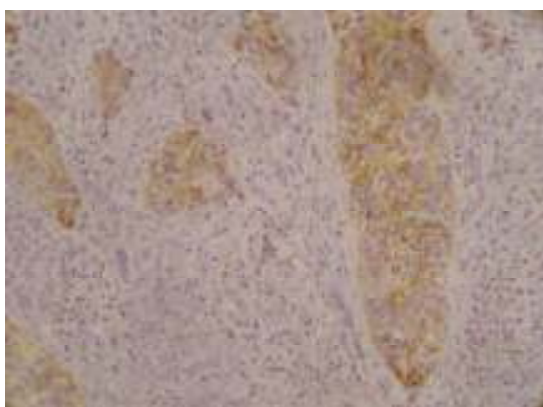
b. E-kadherin u transformacijskom rubu.



c. Beta-katenin u centru tumora.



d. E-kadherin u centru tumora.



e. Beta-katenin u invazivnom rubu.



f. E-kadherin u invazivnom rubu.

**Slika 2. Imunohistokemijsko bojanje beta-katenina i e-kadherina (povećanje ×20).**

#### 4.1. E-kadherin

Mjerenjem E-kadherina na membrani tumorskih stanica u transformacijskom rubu tumora za ispitivanu skupinu bolesnika dobivene su sljedeće vrijednosti prikazane u Tablici 9. Iz prikazane tablice vidi se da je na membrani tumorskih stanica transformacijskog ruba E-kadherina bio najčešće intenziteta 2.

Tablica 9. Intenzitet membranskog bojenja E-kadherina u tumorskim stanicama transformacijskog ruba tumora

Membranski E-kadherin	0	1	2	3	Nedostaje
n	0	8	35	30	17
%	0	8,9	38,9	33,3	18,9

Mjerenjem membranskog E-kadherina u tumorskim stanicama centra tumora dobivene su sljedeće vrijednosti prikazane u tablici 10. Iz prikazane tablice vidljivo je da je membransko bojenje E-kadherina u tumorskim stanicama centra tumora najčešće bilo intenziteta 2.

Tablica 10. Intenzitet membranskog bojenja E-kadherina u tumorskim stanicama centra tumora

Membranski E-kadherin	0	1	2	3	Nedostaje
n	0	9	56	23	2
%	0	10	62,2	25,6	2,2

Mjerenjem membranskog E-kadherina u stanicama invazivnog ruba tumora dobiveni su sljedeći rezultati prikazani u Tablici 11. Iz prikazane tablice vidljivo je da je membransko bojanje E-kadherina u tumorskim stanicama invazivnog ruba tumora najčešće bilo intenziteta 1.

Tablica 11. Intenzitet membranskog bojenja E-kadherina u tumorskim stanicama invazivnog ruba tumora

Membranski E-kaderin	0	1	2	3	Nedostaje
n	0	42	37	8	3
%	0	46,7	41,1	8,9	3,3

Mjerenjem E-kadherina u citoplazmi tumorskih stanica u transformacijskom rubu tumora dobivene su sljedeće vrijednosti prikazane u Tablici 12. Iz prikazane tablice vidi se da je u citoplazmi tumorskih stanica transformacijskog ruba E-kadherin bio najčešće intenziteta 1.

Tablica 12. Intenzitet citoplazmatskog bojenja E-kadherina u tumorskim stanicama transformacijskog ruba tumora

Citoplazmatski E-kaderin	0	1	2	3	Nedostaje
n	1	46	25	1	17
%	1,1	51,1	27,8	1,1	18,9

Mjerenjem citoplazmatskog E-kadherina u tumorskim stanicama centra tumora dobivene su sljedeće vrijednosti prikazane u tablici 13. Iz prikazane tablice vidljivo je da je citoplazmatsko bojenje E-kadherina u tumorskim stanicama centra tumora najčešće bilo intenziteta 1.

Tablica 13. Intenzitet citoplazmatskog bojenja E-kadherina u tumorskim stanicama centra tumora

Citoplazmatski E-kadherin	0	1	2	Nedostaje
n	1	57	30	2
%	1,1	63,3	33,3	2,2

Mjerenjem citoplazmatskog E-kadherina u stanicama invazivnog ruba tumora dobiveni su sljedeći rezultati prikazani u Tablici 14. Iz ove tablice vidljivo je da je citoplazmatsko bojanje E-kadherina u tumorskim stanicama invazivnog ruba tumora najčešće bilo intenziteta 1.

Tablica 14. Intenzitet citoplazmatskog bojenja E-kadherina u tumorskim stanicama invazivnog ruba tumora

Citoplazmatski E-kadherin	0	1	2	3	Nedostaje
n	2	63	20	2	3
%	2,2	70	22,2	2,2	3,3

Radi lakše obrade podataka, u daljnjem istraživanju imunohistokemijsku ekspresiju membranskog i citoplazmatskog E-kadherina promatrat će mo kao nisku ekspresiju, koja podrazumljeva intenzitet bojenja 0 i 1, te visoku ekspresiju, koja podrazumljeva intenzitet bojenja 2 i 3.

Iz prikazanih rezultata vidljivo je da je niska ekspresija membranskog E-kadherina, označena intenzitetom bojanja 0 i 1, u stanicama transformacijskog ruba i centra tumora nađena u 10,6% bolesnika, a u invazivnom rubu tumora kod 48,3% bolesnika, dok je visoka ekspresija membranskog E-kadherina, označena intenzitetom bojenja 2 i 3, u stanicama transformacijskog ruba i centra tumora nađena u 89,4% bolesnika, a u invazivnom rubu tumora kod 51,7% bolesnika, što se vidi iz Tablice 15.

Tablica 15. Distribucija niske i visoke ekspresije membranskog E-kadherina kod ispitanih bolesnika po tumorskim zonama.

Membranski E-kadherin	Transformacijski rub tumora	Centar tumora	Invazivni rub tumora
Niska ekspresija	8 (10,95%)	9 (10,22%)	42 (48,27%)
Visoka ekspresija	65 (89,04%)	79 (89,77%)	45 (51,72%)

$\chi^2 = 46,791, df=2, p < 0,001$ .

Usporedili smo ekspresiju membranskog E-kadherina po zonama tumora  $\chi^2$  testom te smo statistički značajnu razliku našli između visoke ekspresije membranskog E-kadherina u tumorskim stanicama transformacijskog ruba i centra tumora, u odnosu na ekspresiju membranskog E-kadherina u invazivnom rubu ( $p < 0,001$ ). Rezultati su pokazali da je niska ekspresija citoplazmatskog E-kadherina, označena intenzitetom bojenja 0 i 1, u stanicama transformacijskog ruba, centra tumora i invazivnom rubu tumora nađena u 64,4-74,7% bolesnika. Visoka ekspresija citoplazmatskog E-kadherina, označena intenzitetom 2 i 3, u stanicama invazivnog ruba tumora, centru tumora i transformacijskom rubu tumora nađena je u 25,3-35,6% bolesnika, što se vidi iz Tablice 16.

Tablica 16. Distribucija niske i visoke citoplazmatske ekspresije E-kadherina kod ispitanih bolesnika po tumorskim zonama.

Citoplazmatski E-kadherin	Transformacijski rub tumora	Centar tumora	Invazivni rub tumora
Niska ekspresija	47 (64,38%)	58 (65,90%)	65 (74,71%)
Visoka ekspresija	26 (35,61%)	30 (34,09%)	22 (25,28%)

( $\chi^2 = 2,405$ ,  $df=2$   $p = 0,300$ )

Usporedili smo ekspresiju citoplazmatskog E-kadherina po zonama tumora  $\chi^2$  testom te nismo našli statistički značajnu razliku između ekspresije citoplazmatskog E-kadherina u tumorskim stanicama po tumorskim zonama ( $p = 0,300$ ).

#### 4.2. Beta-katenin

Mjerenjem Beta-katenina na membrani tumorskih stanica u transformacijskom rubu tumora za ispitivanu skupinu bolesnika dobivene su sljedeće vrijednosti prikazane u Tablici 17. Iz prikazane tablice vidljivo je da je membransko bojanje Beta-katenina u stanicama transformacijskog ruba tumora najčešće bilo intenziteta 1 i 2.



Tablica 17. Intenzitet membranskog bojanja beta-katenina u tumorskim stanicama transformacijskog ruba tumora.

Membranski Beta-katenin	0	1	2	3	Nedostaje
n	0	34	34	6	16
%	0	37,8	37,8	6,7	17,8

Tablica 18. Intenzitet membranskog bojanja beta-katenina u stanicama centra tumora. Iz prikazane tablice vidljivo je da je membransko bojeaje beta-katenina u stanicama centra tumora najčešće bilo intenziteta 2.

Membranski Beta-katenin	0	1	2	3	Nedostaje
n	0	35	50	3	2
%	0	38,9	55,6	3,3	2,2

Tablica 19. Intenzitet membranskog bojanja beta-katenina u stanicama invazivnog ruba tumora.

Membranski Beta-katenin	0	1	2	3	Nedostaje
n	0	65	22	0	3
%	0	72,2	24,4	0	3,3

Iz prikazane tablice vidljivo je da je membransko bojanje beta-katenina u stanicama invazivnog ruba tumora najčešće bilo intenziteta 1.

Mjerenjem beta-katenina u citoplazmi stanica u transformacijskom rubu tumora dobivene su sljedeće vrijednosti prikazane u Tablici 20. Iz prikazane tablice vidi se da je u citoplazmi tumorskih stanica transformacijskog ruba beta-katenin bio najčešće intenziteta 1.

Tablica 20. Intenzitet citoplazmatskog bojanja beta-katenina u stanicama transformacijske zone tumora.

Citoplazmatski Beta-katenin	0	1	2	3	Nedostaje
n	1	46	24	3	16
%	1,1	51,1	26,7	3,3	17,8

Mjerenjem citoplazmatskog beta-katenina u tumorskim stanicama centra tumora dobivene su sljedeće vrijednosti prikazane u tablici 21. Iz prikazane tablice vidljivo je da je citoplazmatsko bojanje E-kadherina u tumorskim stanicama centra tumora najčešće bilo intenziteta 1.

Tablica 21. Intenzitet citoplazmatskog bojanja beta-katenina u stanicama centra tumora

Citoplazmatski Beta-katenin	0	1	2	3	Nedostaje
n	1	62	23	2	2
%	1,1	68,9	25,6	2,2	2,2

Mjerenjem citoplazmatskog beta-katenina u stanicama invazivnog ruba tumora dobiveni su sljedeći rezultati prikazani u Tablici 22. Iz ove tablice vidljivo je da je citoplazmatsko bojanje beta-katenina u tumorskim stanicama invazivnog ruba tumora najčešće bilo intenziteta 1.

Tablica 22. Intenzitet citoplazmatskog bojanja beta-katenina u stanicama invazivnog ruba tumora

Citoplazmatski Beta-katenin	0	1	2	Nedostaje
n	5	60	21	4
%	5,6	66,7	23,3	4,4

Radi lakše obrade podataka, na isti način kao što je imunohistokemijska ekspresija E-kadherina razdjeljena u dvije skupine, tako će se u daljnjem istraživanju imunohistokemijska ekspresija membranskog i citoplazmatskog beta-katenina promatrati kao niska ekspresija, koja podrazumijeva intenzitet bojenja 0 i 1, te visoka ekspresija, koja podrazumijeva intenzitet bojenja 2 i 3.

Rezultati su pokazali da je niska ekspresija membranskog beta-katenina, označena intenzitetom bojenja 0 i 1, u stanicama transformacijskog ruba i

invazivnom rubu tumora nađena u 46-48% bolesnika, a u stanicama invazivnog ruba tumora nađena je kod 10% bolesnika. Umjerena i visoka ekspresija membranskog beta-katenina, označena intenzitetom 2 i 3, u stanicama transformacijskog ruba tumora i stanicama invazivnog ruba tumora nađena je u 52-54% bolesnika, dok je u stanicama centra tumora nađena u 90% bolesnika, što je prikazano u Tablici 23.

Tablica 23. Distribucija niske i visoke ekspresije membranskog beta-katenina kod ispitanih bolesnika po tumorskim zonama.

Membranski Beta-katenin	Transformacijski rub tumora	Centar tumora	Invazivni rub tumora
Niska ekspresija	34 (45,94%)	35 (39,77%)	65 (74,71%)
Visoka ekspresija	40 (54,05%)	53 (60,22%)	22 (25,28%)

$\chi^2$  -test =13,953, df=2, p< 0,001

Usporedili smo ekspresiju membranskog beta-katenina po zonama tumora  $\chi^2$  testom te smo statistički značajnu razliku našli između niske ekspresije membranskog beta-katenina u tumorskim stanicama invazivnog ruba tumora u odnosu na ekspresiju membranskog beta-katenina u transformacijskom rubu i centru tumora (p<0,001).

Iz rezultata semikvantitativno određene ekspresije citoplazmatskog beta-katenina vidljivo je da je izostala niska ekspresija citoplazmatskog beta-katenina, označena intenzitetom bojanja 0 i 1, u stanicama transformacijskog ruba, centra i invazivnog ruba tumora nađena u 65-71,5% bolesnika, a umjerena i visoka ekspresija citoplazmatskog beta-katenina, označena intenzitetom bojanja 2 i 3, u stanicama invazivnog ruba, preko centra do transformacijskog ruba tumora nađena u 28,4-36,5% bolesnika, što je prikazano u Tablici 24.

Tablica 24 . Distribucija niske i visoke ekspresije citoplazmatskog beta-katenina kod ispitanih bolesnika po tumorskim zonama.

Citoplazmatski Beta-katenin	Transformacijski rub tumora	Centar tumora	Invazivni rub tumora
Niska ekspresija	47 (63,51%)	63 (71,59%)	65 (75,58%)
Visoka ekspresija	27 (36,48%)	25 (28,40%)	21 (24,41%)

$$\chi^2 = 2,858, df=2, p < 0,240$$

Usporedili smo ekspresiju citoplazmatskog beta-katenina po zonama tumora  $\chi^2$  testom te nismo našli statistički značajnu razliku između ekspresije citoplazmatskog beta-katenina u tumorskim stanicama po tumorskim zonama ( $p = 0,240$ ).

### 4.3. Usporedba ekspresije membranskog i citoplazmatskog E-kadherina i beta-katenina po tumorskim zonama

Usporedili smo ekspresiju membranskog i citoplazmatskog E-kadherina po zonama tumora  $\chi^2$  testom te smo našli statistički značajnu razliku između visoke ekspresije membranskog E-kadherina u odnosu na ekspresiju citoplazmatskog E-kadherina u transformacijskoj zoni i centru tumora ( $p < 0,001$ ) i statistički značajno nižu ekspresiju citoplazmatskog E-kadherina u invazivnom rubu u odnosu na membranski E-kadherin u invazivnom rubu ( $p < 0,001$ ), što je prikazano u Tablici 25.

Tablica 25. Distribucija niske i visoke ekspresije membranskog i citoplazmatskog E-kadherina po tumorskim zonama

Tumorske zone	Membranski E-kadherin		Citoplazmatski E-kadherin	
	Niska	Visoka	Niska	Visoka
Transformacijski rub <sup>a</sup>	8 (10,95%)	65 (89,04%)	47 (64,38%)	26 (35,61%)
Centar tumora <sup>b</sup>	9 (10,22%)	79 (89,77%)	58 (10,22%)	30 (34,09%)
Invazivni rub <sup>c</sup>	42 (48,27%)	45 (51,72%)	65 (74,71%)	22 (25,28%)

a ( $\chi^2$ -test = 11,923, df = 1,  $p < 0,001$ )

b ( $\chi^2$ -test = 13,176, df = 1,  $p < 0,001$ )

c ( $\chi^2$ -test = 13,176, df = 1,  $p < 0,001$ )

Na isti smo način usporedili ekspresiju membranskog i citoplazmatskog beta-katenina po zonama tumora  $\chi^2$  testom te smo našli statistički značajnu razliku između niske ekspresije citoplazmatskog beta-katenina u odnosu na ekspresiju membranskog beta-katenina u transformacijskoj zoni tumora ( $p = 0,001$ ), a statistički značajnu razliku nismo našli između ekspresije

membranskog i citoplazmatskog beta-katenina u centru i invazivnom rubu tumora ( $p = 0,1524$ ) te ( $p = 0,965$ ), što je prikazano u Tablici 26.

Tablica 26. Distribucija niske i visoke ekspresije membranskog i citoplazmatskog beta-katenin po tumorskim zonama

Tumorske zone	Membranski beta-katenin		Citoplazmatski beta-katenin	
	Niska	Visoka	Niska	Visoka
Transformacijski rub <sup>a</sup>	34 (45,94%)	40 (54,05%)	47 (63,51%)	27 (36,48%)
Centar tumora <sup>b</sup>	35 (39,77%)	53 (60,22%)	63 (71,59%)	25 (28,40%)
Invazivni rub <sup>c</sup>	65 (74,71%)	22 (25,28%)	65 (75,58%)	21 (24,41%)

a ( $\chi^2$ -test = 3,927, df =1,  $p = 0,001$ )

b ( $\chi^2$ -test = 2,927, df =1,  $p = 0,1524$ )

c ( $\chi^2$ -test = 0,0091, df =1,  $p = 0,965$ )

#### 4.4. Vrijednosti ispitivanih parametara prema klasičnim prognostičkim čimbenicima

Pomoću  $\chi^2$ -testa analizirali smo distribuciju niske i visoke ekspresije membranskog i citoplazmatskog E-kadherina i beta- katenina u transformacijskom rubu, centru i invazivnom rubu tumora u odnosu prema klasičnim prognostičkim čimbenicima kao što su stupanj histološke diferencijacije tumora (gradus), veličina tumora (T) prema ljestvici TNM, zahvaćenost limfnih čvorova (N) prema ljestvici TNM, prisutnost udaljenih metastaza (M) prema ljestvici TNM te lokalizacija primarnog tumora. Statistički značajna razlika u distribuciji niske i visoke ekspresije E-kadherina i beta- katenina nije nađena u odnosu prema veličini tumora (T), zahvaćenosti limfnih čvorova (N) i prisutnosti udaljenih metastaza. Statistički značajna razlika u distribuciji niske i visoke ekspresije membranskog E-kadherina i membranskog i citoplazmatskog beta- katenina u određenim tumorskim zonama, uočena je kod različitih stupnjeva histološke diferencijacije tumora (gradusa) i lokalizacije primarnog tumora, što je prikazano u tablicama.

Tablica 27. Gradus-Membranski E-kadherin po tumorskim zonama

Gradus tumora	MM-EK transformacijski rub <sup>a</sup>		MM-EK centar tumora <sup>b</sup>		MM-EK invanzivni rub <sup>c</sup>	
	Niska	Visoka	Niska	Visoka	Niska	Visoka
G1	3 (4,10%)	10(13,70%)	3(3,41%)	14(15,91%)	13(14,94%)	4(4,60%)
G2	5 (6,85%)	29(39,73%)	2(2,72%)	41(46,60%)	19(21,84%)	23(26,44%)
G3	0 (0%)	26(35,62%)	4(4,55%)	24(27,27%)	10(11,49%)	18(20,69%)
Ukupno	8(10,96%)	65(89,04%)	9(10,23%)	79(89,77%)	42(48,28%)	45(51,72%)

a ( $\chi^2$ -test = 5.646, df =2, p = 0.059);b ( $\chi^2$ -test=2.978, df =2, p =0.226);

c ( $\chi^2$ -test=7.337, df =2, **p = 0.026**)

Značajno češća niska ekspresija u odnosu na visoku ekspresiju u dobro diferenciranim tumorima odnosno gradusu G1 nađena je za membranski E-kadherin u invazivnom rubu tumora, prikazano u Tablici 27.

Tablica 28. Gradus-Membranski beta-katenin po tumorskim zonama

Gradus tumora	MM-BK transformacijski rub <sup>a</sup>		MM-BK centar tumora <sup>b</sup>		MM-BK invanzivni rub <sup>c</sup>	
	Niska	Visoka	Niska	Visoka	Niska	Visoka
G1	8(10,81%)	5(6,76%)	5(5,68%)	10(11,36%)	16(18,39%)	1(1,15%)
G2	16(21,62%)	19(25,68%)	15(17,05%)	28(31,82%)	29(33,33%)	13(14,94%)
G3	10(13,51%)	16(21,62%)	13(14,77%)	15(17,05%)	20(22,73%)	8(9,20%)
Ukupno	34(45,95%)	40(54,05%)	35(39,77%)	53(60,23%)	65(74,71%)	22(25,29%)

a ( $\chi^2$ -test=1.860, df =2, p =0.395); b ( $\chi^2$ -test=0.961, df =2, p =0.619); c ( $\chi^2$ -test=6.341, df =2, **p =0.042**)

Značajno češća prisutnost niske ekspresije membranskog beta-katenina u invazivnom rubu dobro diferenciranog tumora, odnosno gradus G1, prikazano u Tablici 28.

Tablica 29. Gradus-Citoplazmatski beta-katenin po tumorskim zonama

Gradus tumora	CT-BK transformacijski rub <sup>a</sup>		CT-BK centar tumora <sup>b</sup>		CT-BK invazivni rub <sup>c</sup>	
	Niska	Visoka	Niska	Visoka	Niska	Visoka
G1	10(13,51%)	3(4,05%)	14(15,91%)	3(3,41%)	15(17,44%)	2(2,33%)
G2	22(29,73%)	13(17,57%)	35(39,77%)	8(9,10%)	31(36,05%)	11(12,80%)
G3	15(20,27%)	11(14,86%)	14(15,91%)	14(15,91%)	19(22,10%)	8(9,30%)
Ukupno	47(63,51%)	27(36,49%)	63(71,59%)	25(28,41%)	65(75,58%)	21(24,42%)

a ( $\chi^2$ -test= 1.395, df =2, p =0.498); b ( $\chi^2$ -test=9.418, df =2, **p =0.009**); c ( $\chi^2$ -test=1.944, df =2, p =0.378)



Značajno češća visoka razina ekspresije citoplazmatskog beta-katenina u slabo diferenciranim tumorima odnosno gradus G3, prikazana je u Tablici 29

Tablica 30. Lokalizacija-Citoplazmatski beta-katenin po tumorskim zonama

Gradus tumora	CT-BK transformacijski rub <sup>a</sup>		CT-BK centar tumora <sup>b</sup>		CT-BK invazivni rub <sup>c</sup>	
	Niska	Visoka	Niska	Visoka	Niska	Visoka
Glottis	19(25,68%)	6(8,11%)	26(29,55%)	6(6,82%)	26(30,23%)	6(6,98%)
Subgl.	5(6,76%)	1(1,35%)	6(6,82%)	1(1,14%)	5(5,81%)	2(2,33%)
Supragl.	8(10,81%)	13(17,57%)	15(17,05%)	7(7,95%)	13(15,12%)	9(10,47%)
Transgl.	15(20,27%)	7(9,46%)	16(18,18%)	11(12,50%)	21(24,42%)	4(4,65%)
Ukupno	47(63,51%)	27(36,49%)	63(71,59%)	25(28,41%)	65(75,58%)	21(24,42%)

a (  $\chi^2$ -test=8.761, df =3, **p =0.033**);b (  $\chi^2$ -test=4.299, df =3, p =0.231);c (  $\chi^2$ -test=4.824, df =3, p =0.185)

Značajno češća niska razina citoplazmatskog beta-katenina u transformacijskom rubu glotičkog tumora, prikazana je u Tablici 30.

Uporabom Spearmanova testa istražena je korelacija između membranskog i citoplazmatskog beta-katenina u sve tri tumorske regije s veličinom tumora, zahvaćenošću limfnih čvorova, udaljenim metastazama i gradusom tumora. Spearmanovim testom utvrđena je slaba statistički značajna korelacija između ekspresije citoplazmatskog beta-katenina u transformacijskom rubu i postojanja udaljenih metastaza, dok je slaba statistički značajna, negativna korelacija utvrđena između ekspresije citoplazmatskog beta-katenina u centru tumora i histološkog gradusa tumora, što je prikazano u Tablici 31.

Tablica 31. Korelacija beta-katenina s T, N, M i Gradusom Spearman's rho testom. Statistički signifikantne vrijednosti zatamnjene ( $p \leq 0,05$ ).

<b>Korelacija</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>	<b>Gradus</b>
<b>CT-Bk-TR</b>	0.164	-0.225	<b>0.263</b>	-0.165
<b>CT-Bk-CT</b>	0.146	-0.001	0.130	<b>-0.230</b>
<b>CT-Bk-IR</b>	0.030	-0.001	0.205	-0.186
<b>MM-Bk-TR</b>	0.073	0.010	0.221	-0.148
<b>MM-Bk-CT</b>	0.016	0.044	-0.155	0.065
<b>MM-Bk-IR</b>	-0.106	0.092	0.123	-0.148

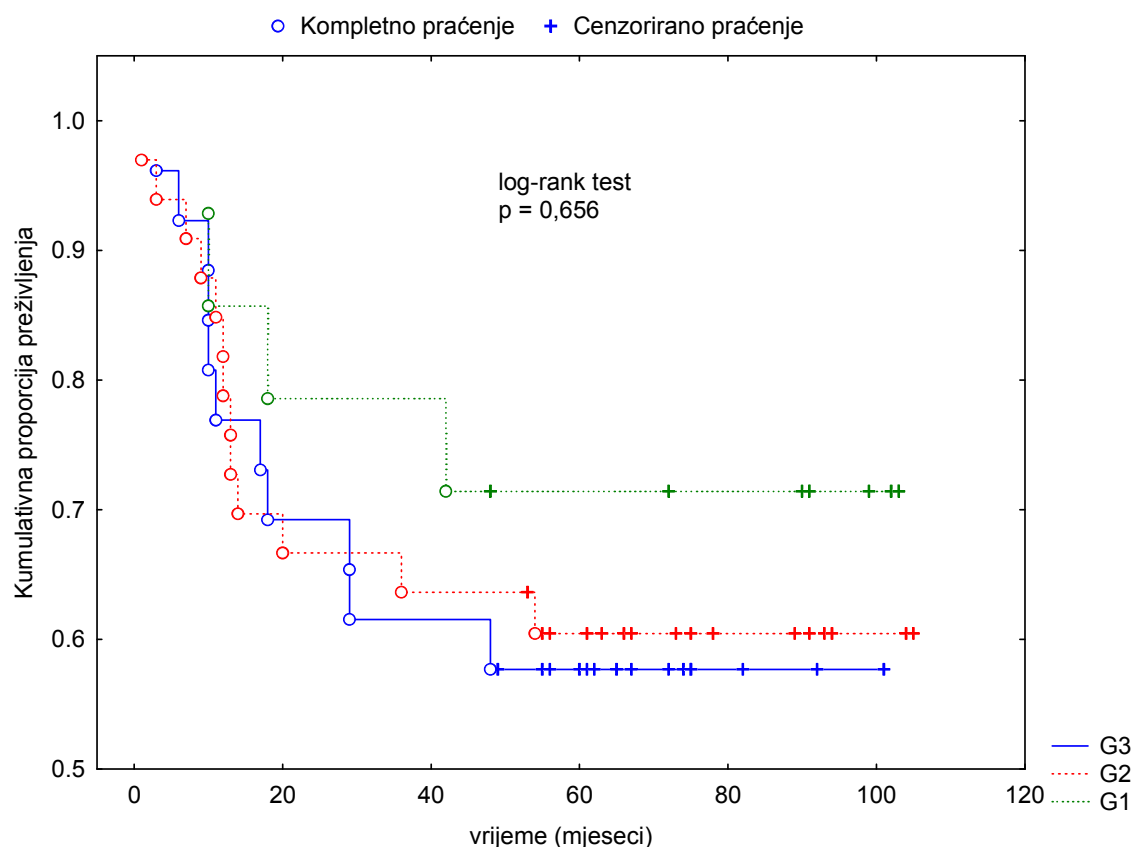
Spearmanovim testom utvrđena je slaba statistički značajna, negativna korelacija između ekspresije citoplazmatskog E-kadherina u invazivnom rubu i membranskog E-kadherina u transformacijskom rubu tumora i histološkog gradusa tumora, te između ekspresije membranskog E-kadherina u centru tumora i postojanja udaljenih metastaza što je prikazano u Tablici 32.

Tablica 32. Korelacija E-kadherina s T, N, M i Gradusom Spearman's rho testom. Statistički signifikantne vrijednosti zatamnjene ( $p \leq 0,05$ )

<b>Korelacija</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>	<b>Gradus</b>
<b>CT-Ek-TR</b>	0.139	0.180	0.130	-0.109
<b>CT-Ek-CT</b>	-0.014	0.004	-0.126	0.016
<b>CT-Ek-IR</b>	0.001	0.033	0.101	<b>-0.258</b>
<b>MM-Ek-TR</b>	0.043	-0.023	0.174	<b>-0.312</b>
<b>MM-Ek-CT</b>	0.010	-0.034	<b>-0.307</b>	0.085
<b>MM-Ek-IR</b>	-0.016	0.004	0.105	-0.225

## 4.5. Procjena preživljenja postupkom po Kaplan-Meieru ( KM )

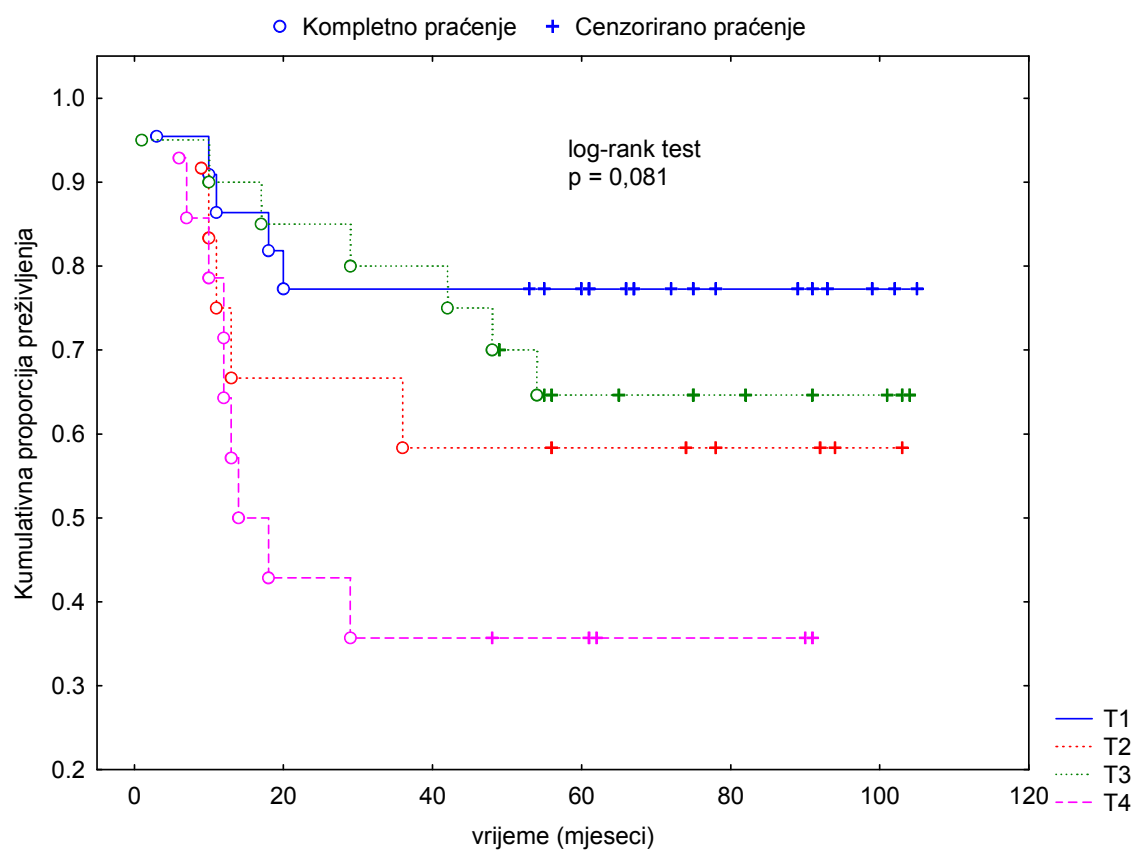
### 4.5.1. Gradus tumora i preživljenje ( Kaplan-Meier )



Slika 3. KM krivulja preživljenja za histološki gradus tumora.

KM krivulje preživljenja za gradus tumora prikazane su na slici 3. Razlika u kumulativnoj proporciji preživljenja nije bila signifikantna ( $p=0.656$ ).

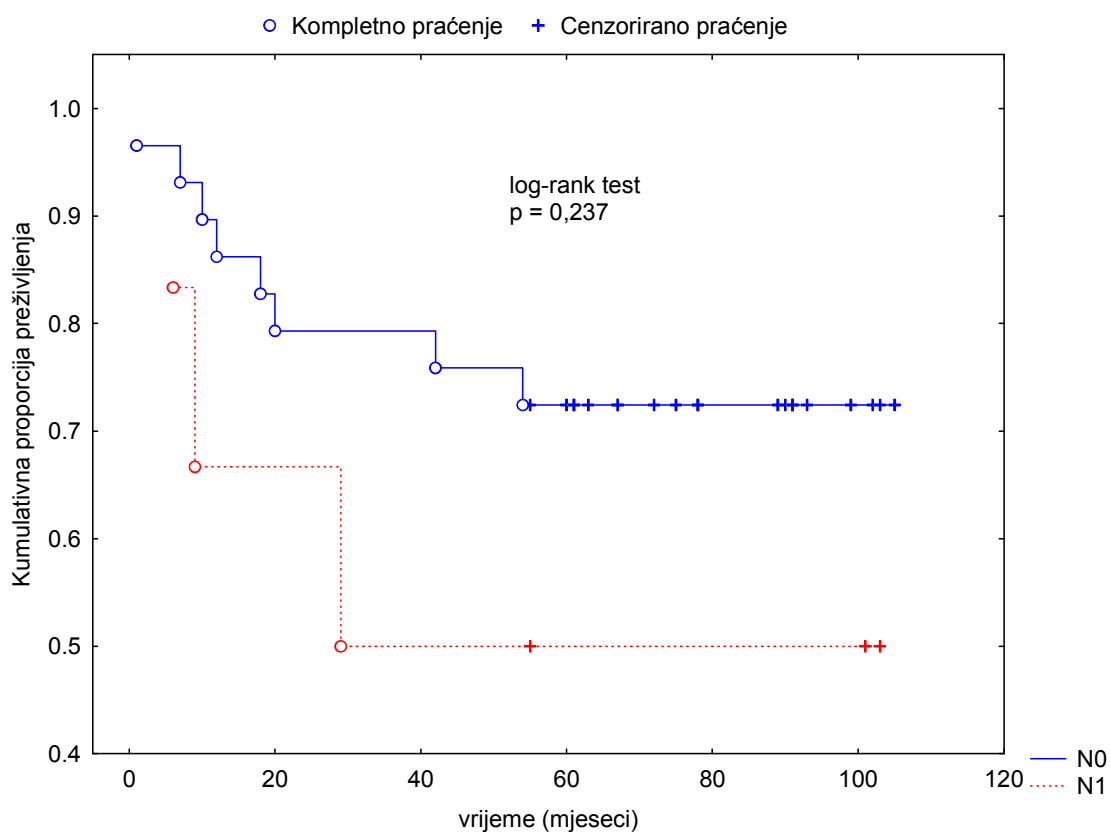
#### 4.5.2. T i preživljenje ( Kaplan-Meier )



Slika 4. KM krivulja preživljenja za T (veličinu tumora) iz TNM ljestvice.

KM krivulje preživljenja za veličinu tumora (T) prikazane su na slici 4. Razlika u kumulativnoj procjeni preživljenja bila je na rubu signifikantnosti ( $p=0.081$ ).

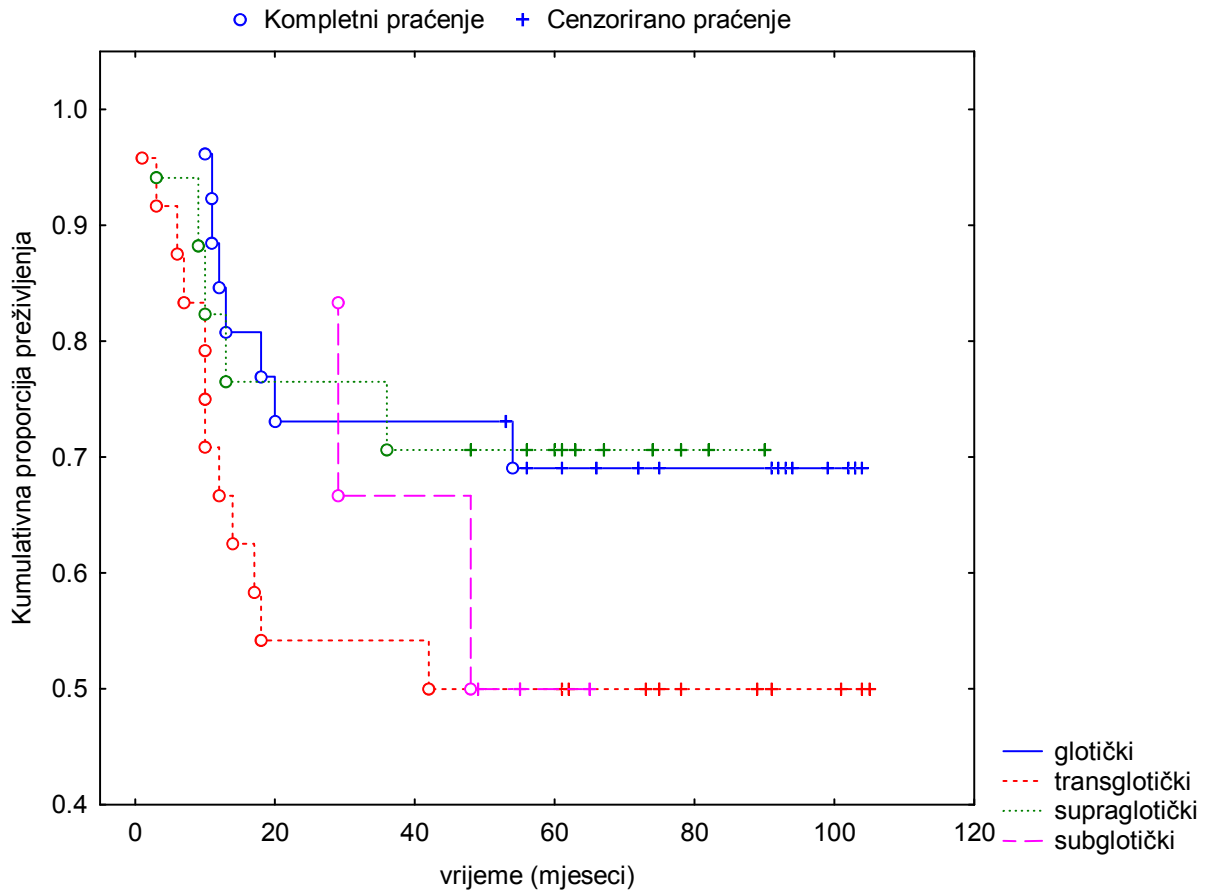
### 4.5.3. N i preživljenje ( Kaplan-Meier )



Slika 5. KM krivulje za N (zahvaćenost limfnih čvorova) iz TNM ljestvice.

KM krivulje za zahvaćenost limfnih čvorova (N) prikazane su na slici 5. Long-rank test je pokazao da kumulativna proporcija preživljenja nije statistički značajna ( $p=0.237$ ).

#### 4.5.4. Lokalizacija tumora i preživljenje ( Kaplan-Meier )



Slika 6. KM krivulje za lokalizaciju primarnog tumora.

KM krivulje za lokalizaciju primarnog tumora prikazane su na slici 6. Kumulativna proporcija preživljenja nije bila statistički signifikantna ( $p=0,310$ ).

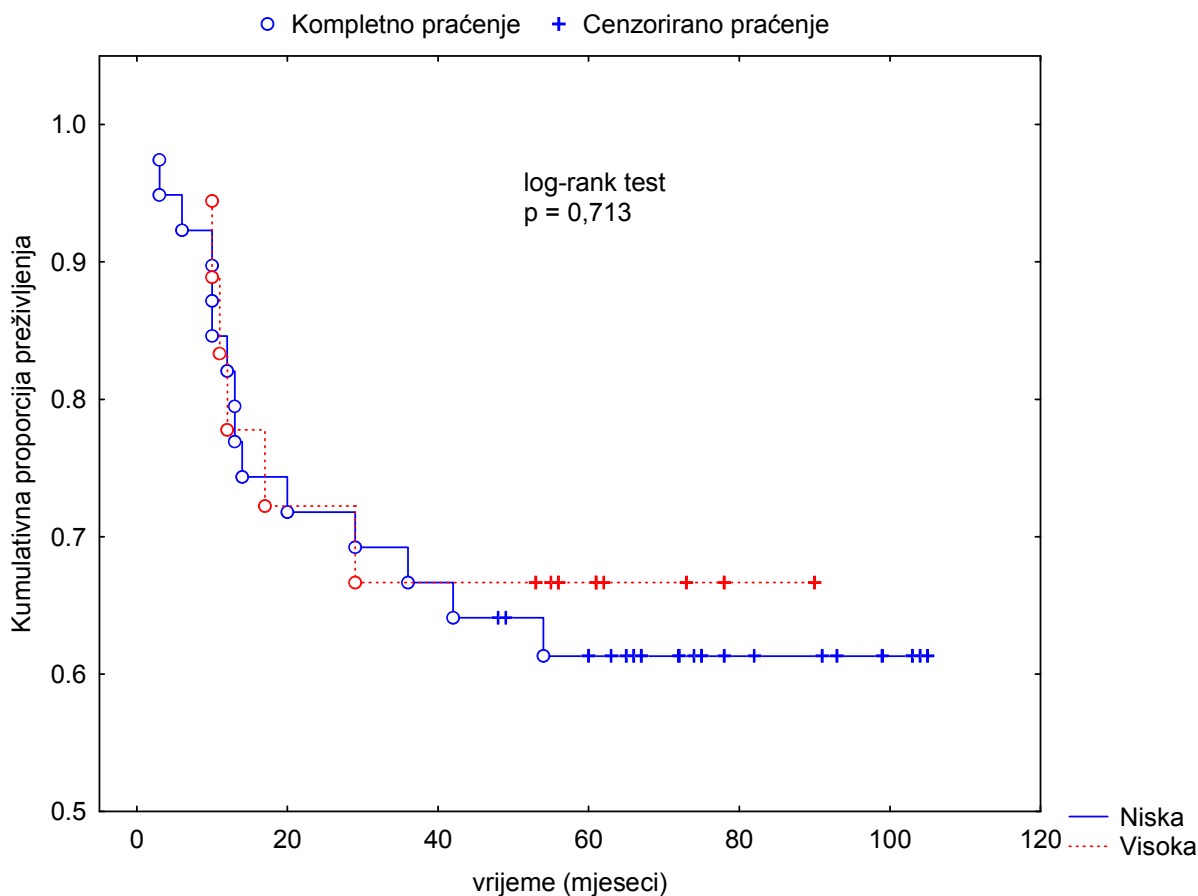
#### **4.5.5. Kaplan-Meierove (KM) krivulje preživljenja za E-kadherin**

KM krivulje preživljenja prikazane su za sljedeće varijable:

- Membranski E-kadherin u transformacijskoj zoni tumora
- Membranski E-kadherin u centru tumora
- Citoplazmatski E-kadherin u invazivnom rubu tumora

Bolesnici su podijeljeni u dvije skupine: na skupinu čije su niske vrijednosti ekspresije E-kadherina u tumorskim stanicama obuhvaćale imunohistokemijske reakcije semikvantitativno obilježene s 0 i 1, te skupinu čije su visoke vrijednosti ekspresije E-kadherina u tumorskim stanicama obuhvaćale imunohistokemijsku reakciju semikvantitativno obilježenu s 2 i 3. Uzevši u obzir ovu podjelu na dvije skupine bolesnika, nađena je statistički značajna razlika u ekspresiji membranskog E-kadherina u membrani tumorskih stanica transformacijskog ruba i centra tumora i citoplazmatskog E-kadherina u invazivnom rubu, te su njihove niske i visoke vrijednosti ekspresije izdvojene za korelaciju s preživljenjem.

#### 4.5.5.1. Membranski E-kadherin u transformacijskom rubu tumora i preživljenje ( Kaplan-Meier )

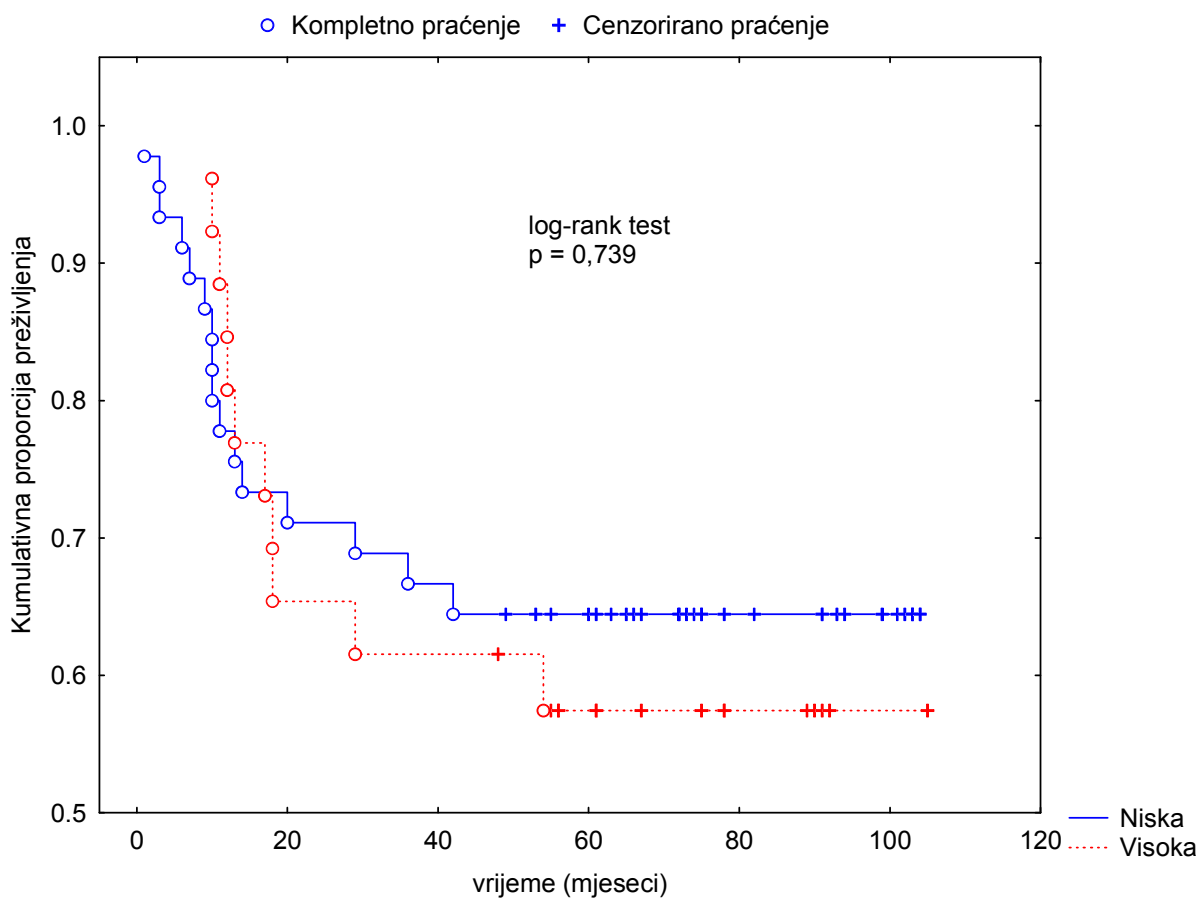


Slika 7. KM krivulje za membranski E-kadherin u transformacijskom rubu tumora.

KM krivulje za membranski E-kadherin u transformacijskom rubu tumora prikazane su na slici 7. Kumulativna proporcija preživljenja nije bila statistički signifikantna ( $p=0,713$ ).



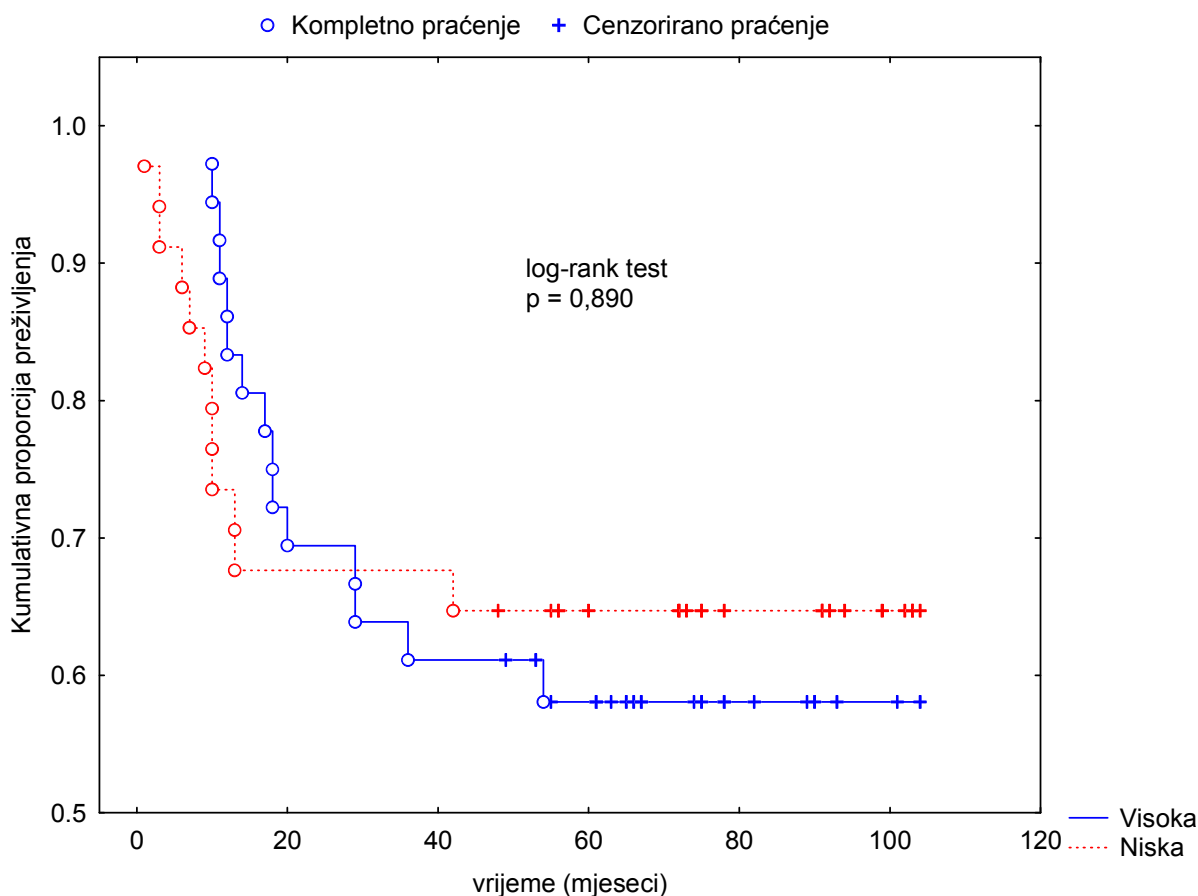
#### 4.5.5.2. Membranski E-kadherin u centru tumora i preživljenje ( Kaplan-Meier )



Slika 8. KM krivulje za membranski E-kadherin u centru tumora.

KM krivulje za membranski E-kadherin u centru tumora prikazane su na slici 8. Kumulativna proporcija preživljenja nije bila statistički signifikantna ( $p=0,739$ ).

#### 4.5.5.3. Citoplazmatski E-kadherin u invazivnom rubu tumora i preživljenje ( Kaplan-Meier )



Slika 9. KM krivulje za citoplazmatski E-kadherin u invazivnom rubu tumora.

KM krivulje za citoplazmatski E-kadherin u invazivnom rubu tumora prikazane su na slici 9. Kumulativna proporcija preživljenja nije bila statistički signifikantna (  $p=0,890$  ).

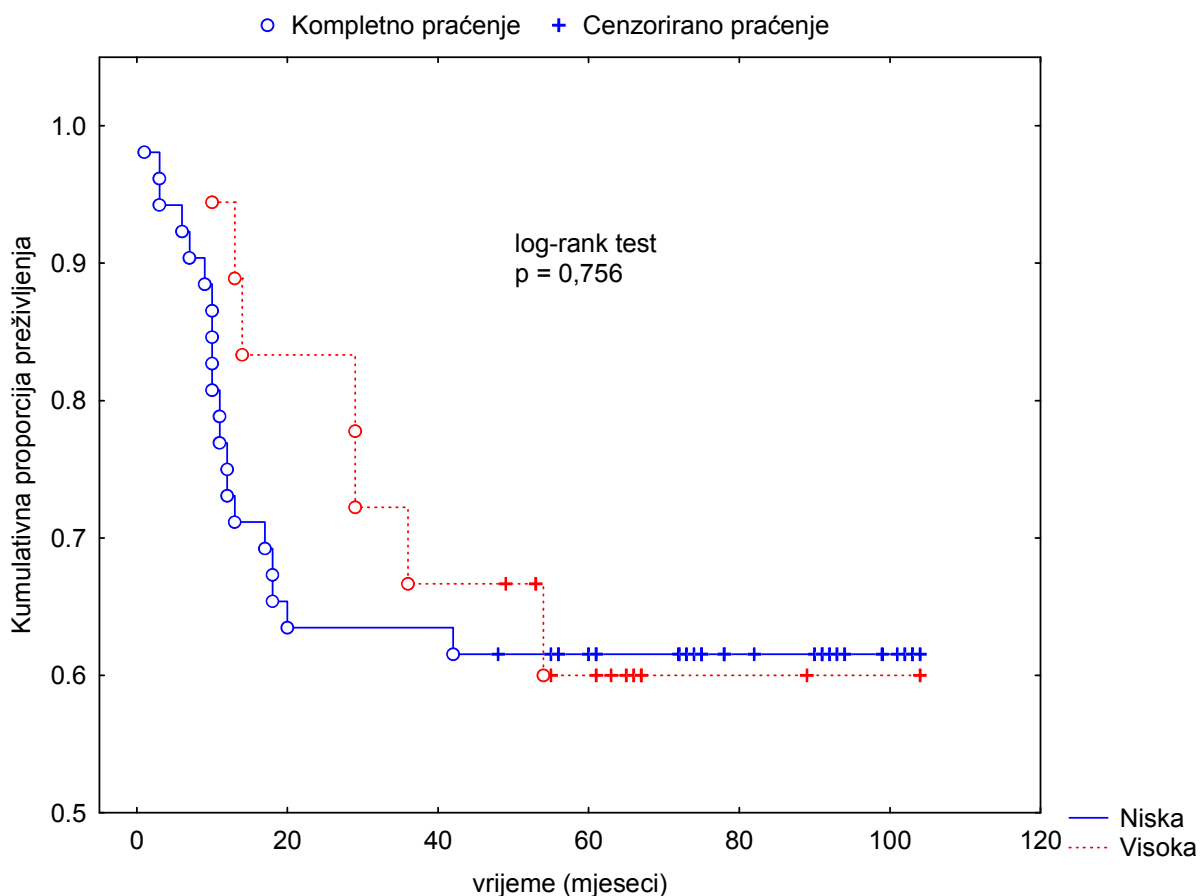
#### **4.5.6. Kaplan-Meierove (KM) krivulje preživljenja za beta-katenin**

KM krivulje preživljenja prikazane su za sljedeće varijable:

- Membranski beta-katenin u invazivnom rubu tumora
- Citoplazmatski beta-katenin u transformacijskoj zoni tumora

Bolesnici su podijeljeni u dvije skupine: na skupinu čije su niske vrijednosti ekspresije beta-katenina u tumorskim stanicama obuhvaćale imunohistokemijske reakcije semikvantitativno obilježene s 0 i 1, te skupinu čije su visoke vrijednosti ekspresije beta-katenina u tumorskim stanicama obuhvaćale imunohistokemijsku reakciju semikvantitativno obilježenu s 2 i 3. Uzevši u obzir ovu podjelu na dvije skupine bolesnika, nađena je statistički značajna razlika u ekspresiji membranskog beta-katenina u membrani tumorskih stanica invazivnog ruba tumora te citoplazmatskog beta-katenina u transformacijskom rubu, te su vrijednosti ekspresije beta-katenina izdvojene za korelaciju s preživljenjem.

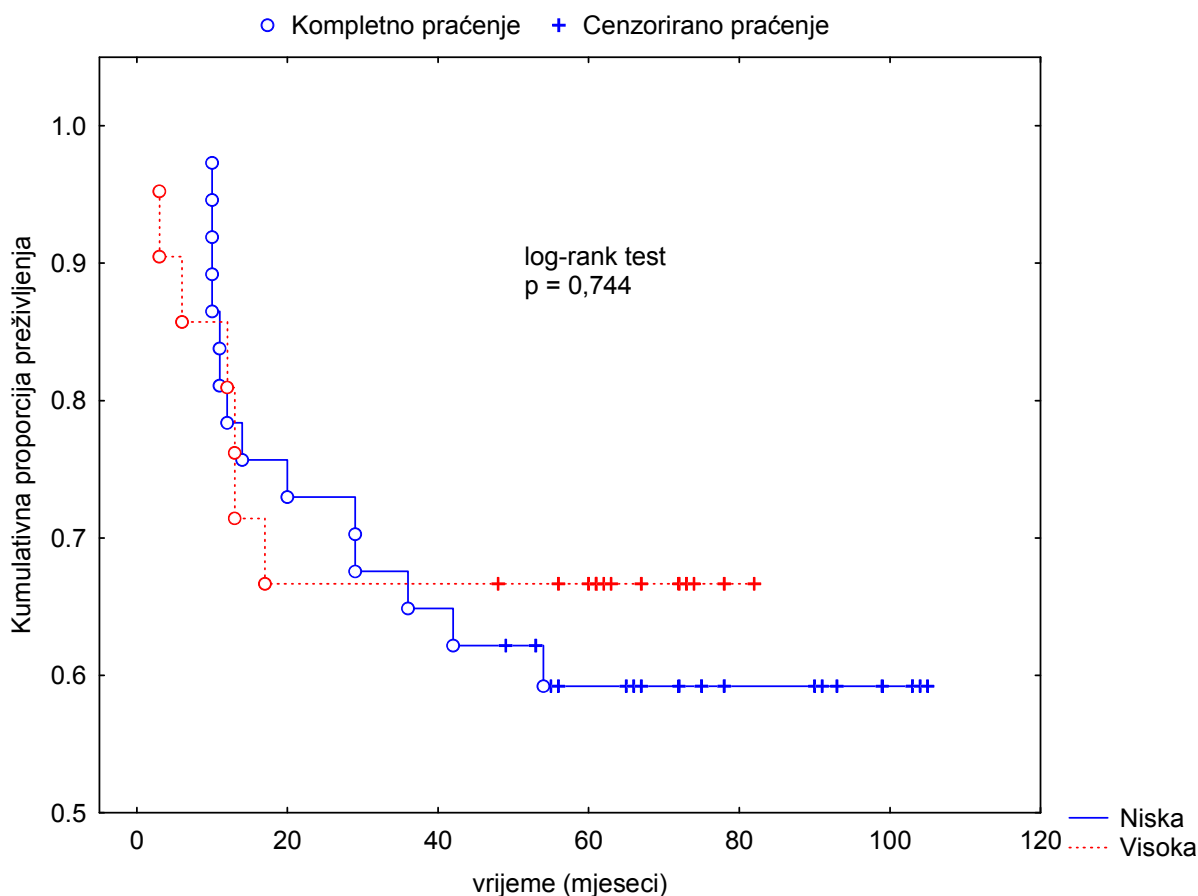
#### 4.5.6.1. Membranski beta-katenin u invazivnom rubu tumora i preživljenje ( Kaplan-Meier )



Slika 10. KM krivulje za membranski beta-katenin u invazivnom rubu tumora.

KM krivulje za membranski beta-katenin u invazivnom rubu tumora prikazane su na slici 10. Kumulativna proporcija preživljenja nije bila statistički signifikantna ( $p=0,756$ ).

#### 4.5.6.2. Citoplazmatski beta-katenin u transformacijskom rubu tumora i preživljenje ( Kaplan-Meier )



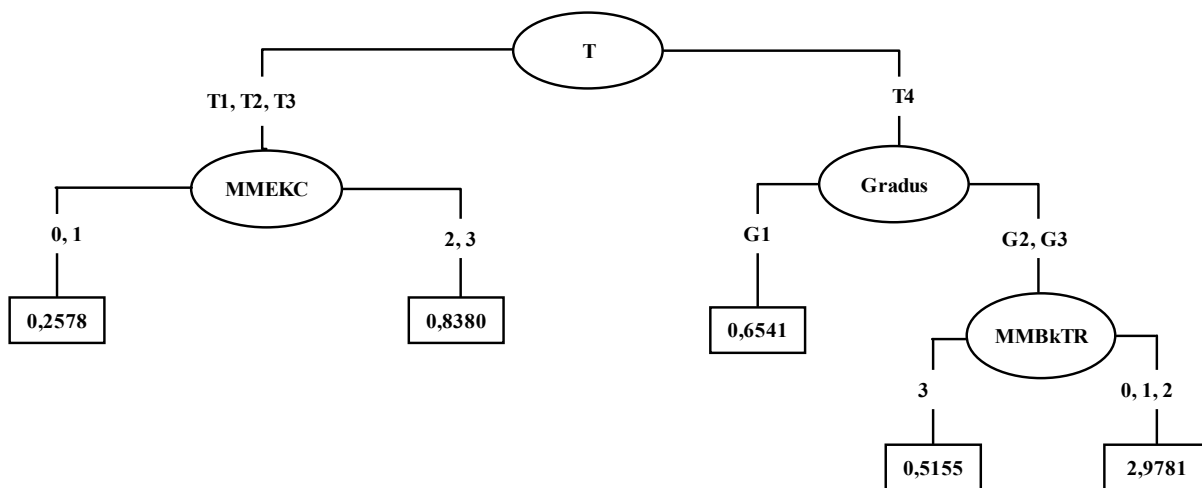
Slika 11. KM krivulje za citoplazmatski beta-katenin u transformacijskom rubu tumora.

KM krivulje za membranski beta-katenin u transformacijskom rubu tumora prikazane su na slici 11. Kumulativna proporcija preživljenja nije bila statistički signifikantna ( $p=0,744$ ).

#### 4.5.7. REZULTATI ANALIZE UPORABOM RPART ALGORITMA

Rezultat analize uporabom RPART algoritma je podjela na podskupine ispitanika koje imaju različit hazard. RPART konstruira klasifikacijski model koji se može predočiti kao binarno stablo. Stablo se gradi sljedećim procesom: prvo se pronađe varijabla koja najbolje dijeli podatke u dvije skupine. Podaci se razdvajaju, a potom se ovaj proces ponavlja odvojeno za svaku podskupinu i tako rekurzivno dok podskupine ne postignu minimalnu, unaprijed definiranu veličinu, ili kad više nema poboljšanja u razvrstavanju.

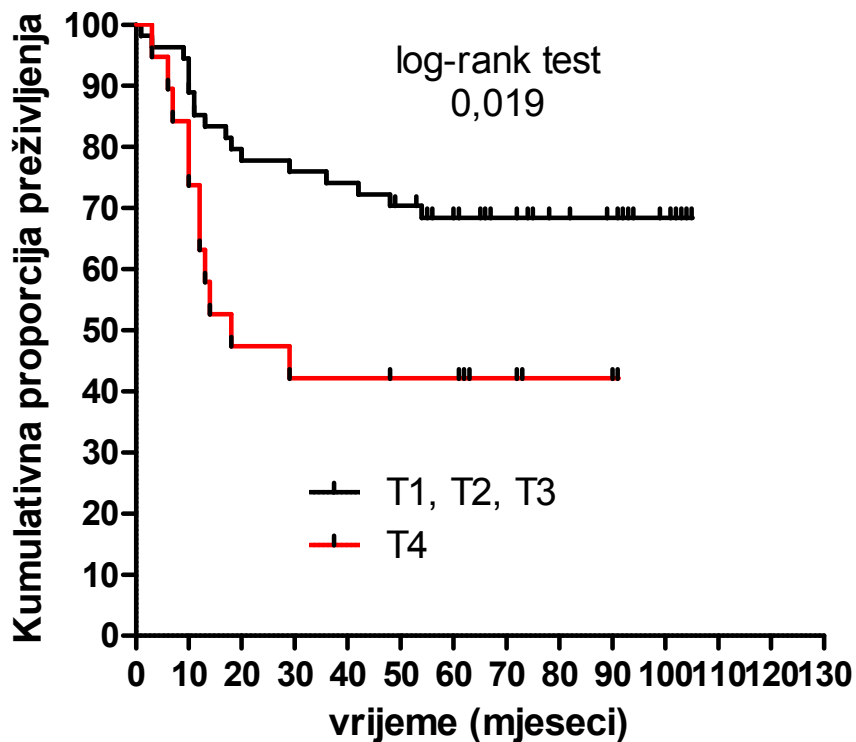
Uporabom rpart-a dobiveno je stablo odluke s četiri čvora odluke, koje je prikazano na slici 12.



Slika 12. Stablo odluke dobiveno uporabom rpart algoritma.

Stablo odluke treba tumačiti na sljedeći način:

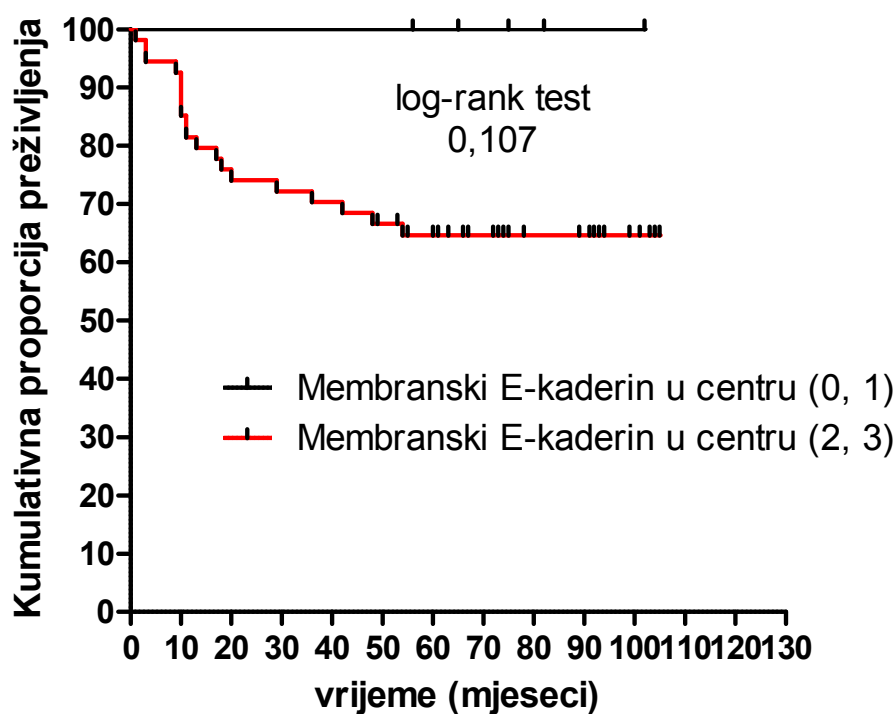
1. Najvažniji čimbenik povezan s umiranjem jest veličina tumora. Bolesnici s veličinom tumora T1, T2 i T3 imaju manji relativni rizik umiranja od bolesnika s veličinom tumora T4. Ako učestalost umiranja (hazard) kod svih bolesnika izrazimo brojem 1, tada je relativni rizik u bolesnika s T1, T2 i T3 0,7625, a u bolesnika s T4 1,8764. Dobiveni rezultat potvrđuje procjena preživljenja po Kaplan-Meieru, prikazana na slici 13., iz koje je vidljivo da je razlika između te dvije skupine statistički signifikantna (log-rank test,  $p = 0,019$ ). Ovaj rezultat jasno upućuje da je veličina tumora osnovni prognostički čimbenik.



Slika 13. KM preživljenja za veličinu tumora.

2. U drugom čvoru odluke (bolesnici s T1, T2, i T3) vrši se razdvajanje prema vrijednosti ekspresije membranskog E-kaderina u stanicama

centra tumora na dvije podskupine: (a) bolesnici s niskom ekspresijom (intezitet bojanja 0 i 1); (b) bolesnici s visokom ekspresijom (intezitet bojanja 2 i 3). Relativni rizik umiranja u bolesnika s niskom aktivnošću membranskog E-kadherina u stanicama centra tumora jest 0,2578, a u bolesnika s visokom aktivnošću 0,8380. Dobiveni rezultat nije potvrđen procjenom preživljenja po Kaplan-Meieru (Slika 14.) jer razlika između te dvije skupine statistički nije bila signifikantna (log-rank test,  $p = 0,107$ ). Ovi podaci upućuju da ekspresija membranskog E-kadherina u stanicama centra tumora ima niži informacijski sadržaj od veličine tumora.

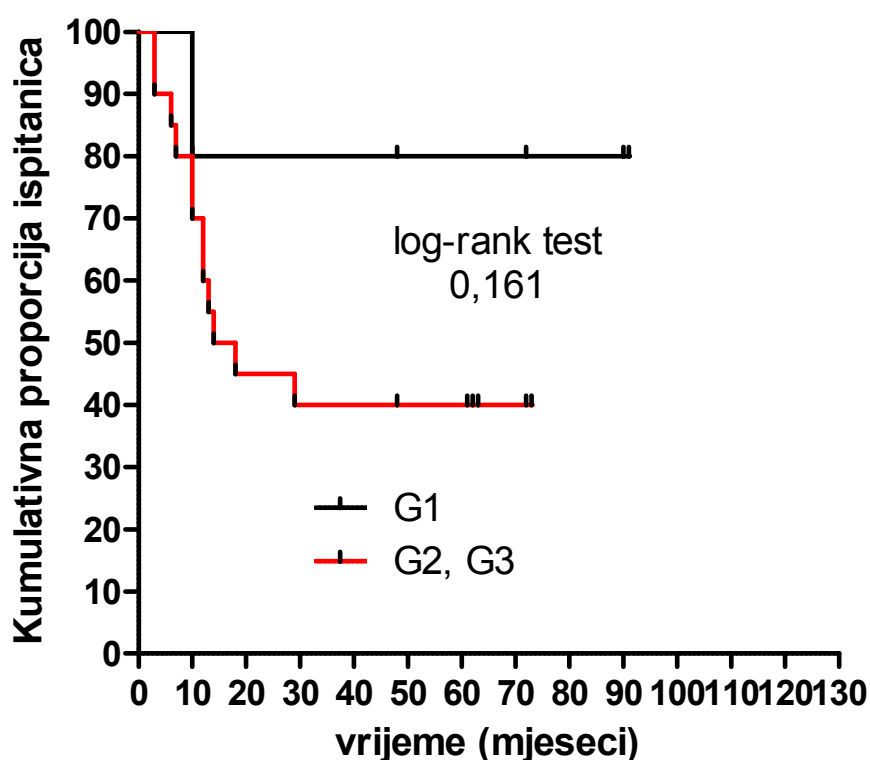


Slika 14. KM preživljenja za membranski E-kadherin u centru tumora

- U trećem čvoru vrši se razdvajanje bolesnika s T4 prema stupnju histološke diferenciranosti (gradus) na dvije podskupine: (a) bolesnici



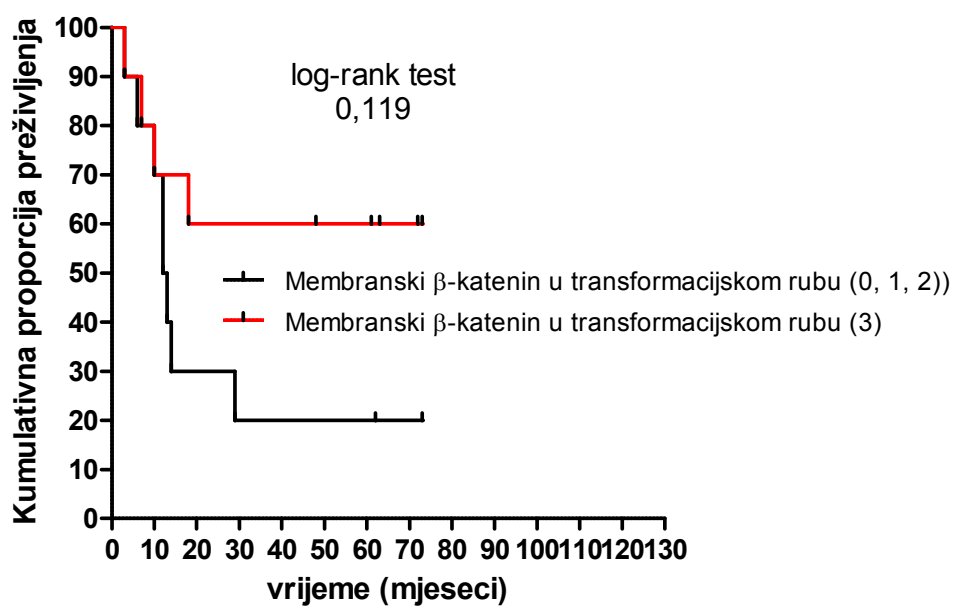
s G1; (b) bolesnici s G2 i G3. Bolesnici s G1 imaju relativni rizik umiranja 0,6541, a bolesnici s G2 i G3 2,5362. Dobiveni rezultat nije potvrđen procjenom preživljenja po Kaplan-Meieru (Slika 15.) jer razlika između te dvije skupine statistički nije bila signifikantna (log-rank test,  $p = 0,161$ ). Podaci upućuju da je informacijski sadržaj T4 važniji za procjenu preživljenja od informacije sadržane u gradusu.



Slika 15. KM preživljenja za gradus tumora

- U četvrtom čvoru odluke bolesnici s T4, te G2 i G3 se razvrstavaju u dvije daljnje podskupine prema razini ekspresije membranskog beta-katenina u stanicama transformacijskog ruba tumora: (a) bolesnici s razinom ekspresije 3; (b) bolesnici s razinom ekspresije 0, 1 i 2. Relativni rizik umiranja bolesnika s razinom ekspresije 3 je 0,5155, a bolesnika s razinom ekspresije 0, 1 i 2 je 2,9781. Dobiveni rezultat

nije potvrđen procjenom preživljenja po Kaplan-Meieru (Slika 16.) jer razlika između te dvije skupine statistički nije bila signifikantna (log-rank test,  $p = 0,119$ ). Podaci upućuju da je informacijski sadržaj membranskog beta-katenina u stanicama transformacijskog ruba tumora niži od informacijskog sadržaja visokog stupnja gradusa (G2 i G3).



Slika 16. KM preživljenja za membranski beta-katenin u transformacijskom rubu

## 5. RASPRAVA

Rezultati predhodno spomenutih studija većinom pokazuju korelaciju novih, dodatnih prognostičkih čimbenika s klasičnim prognostičkim čimbenicima, kao što su veličina tumora, lokalizacija tumora, TNM i histološki gradus, s tim da se niti jedan do sada istraženiji noviji prognostički parametar ne može izdvojiti kao neovisan prognostički čimbenik (23-29). Unatoč dokazanoj prognostičkoj vrijednosti navedenih klasičnih prognostičkih čimbenika za karcinom pločastih stanica grkljana i dalje postoje nastojanja za otkrivanjem novih prognostičkih parametara koji će, uzimajući u obzir intratumorsku heterogenost, pomoći u razotkrivanju očekivanog ponašanja tumora. Istraživanja na ljudskim i eksperimentalnim tumorima su pokazala kako su tumorske stanice unutar nekog tumora heterogene. Tumorsko tkivo karakterizira genetska i fenotipska heterogenost. Već u vrijeme dijagnosticiranja većina tumora sadrži različite populacije stanica s nejednakim osobitostima. Tumorska heterogenost odgovorna je za različite biološke i histološke osobine tumora, ali i za njegovo biološko ponašanje te može objasniti veliku varijabilnost u prognozi različitih tumora (30-32).

Malo se zna o heterogenosti planocelularnog karcinoma grkljana. Poznato je da se u planocelularnom karcinomu može izdvojiti područje dobro diferenciranih stanica s niskom mitotskom aktivnošću od područja sa stanicama koje imaju visoku proliferativnu aktivnost i slabu diferencijaciju. Danas se smatra da područje s višim histološkim gradusom određuje prognozu bolesnika s malignom bolešću te da se recidiv najvjerojatnije javlja u tom području. Značaj ovakve heterogenosti ogleda se u mogućem divergentnom biološkom ponašanju pojedinih tumorskih podklonova (95,96). U praktičnom smislu to znači da će pojedini dijelovi tumora pokazati drugačiju sposobnost invadiranja, metastaziranja, otpornost prema kemoterapiji i/ili zračenju. Mogućnost predviđanja takvog ponašanja pojedinih dijelova unutar tumora, bio bi značajan doprinos u praćenju

bolesnika, prognozi ali i terapiji malignih bolesti. Takva mogućnost otvara i pitanje svrsishodnosti određivanja prognostičkih (ali i svih drugih) parametara u heterogenoj populaciji tumorskih stanica. Tumor je trodimenzionalna struktura unutar koje, teoretski, različiti klonovi mogu biti raspoređeni jednoliko ili predominantno u pojedinim dijelovima tumora. Uzmemo li u obzir trodimenzionalnost tumorske tvorbe u interakciji s domaćinom, onda je logično očekivati i određenu trodimenzionalnu organizacijsku strukturu i raspored unutar samog tumora (97).

Imajući na umu manjkavosti do sada poznatih prognostičkih čimbenika karcinoma grkljana i predhodno navedene osobine kadherin-kateninskog kompleksa te uvažavajući intratumorsku heterogenost, ovaj rad ima za cilj ukazati na ulogu E-kadherina i beta-katenina u karcinomima grkljana, o čemu postoje nekonzistentni nalazi u literaturi. Korištena je standardna metoda imunohistokemijskog bojanja E-kadherina i beta-katenina, koja se semikvantitativno izražavala sustavom mjerenja razine ekspresije od 0 do 3, na membrani i u citoplazmi tumorskih stanica u transformacijskom rubu, centru i invazivnom rubu tumora. Dobivene rezultate niske ekspresije, koja podrazumijeva intenzitet ekspresije 0 i 1, kao i visoke ekspresije, koja podrazumijeva intenzitet ekspresije 2 i 3, na membrani i u citoplazmi tumorskih stanica, E-kadherina i beta-katenina, određenih za sve tri tumorske zone posebno, obrađeni su u multivarijatnom modelu zajedno s drugim odabranim prognostičkim parametrima te ih možemo tumačiti na sljedeći način.

Usporedili smo distribuciju ekspresije membranskog E-kadherina u tri različite regije tumora (transformacijskom rubu, centru i invazivnom rubu), te  $\chi^2$ -testom našli značajno češću pojavu visoke membranske ekspresije E-kadherina u tumorskim stanicama transformacijskog ruba i centra tumora u odnosu na nisku ekspresiju membranskog E-kadherina u invazivnom rubu tumora ( $p < 0,001$ ).

Zatim smo istim testom usporedili distribuciju ekspresije citoplazmatskog E-kadherina po tumorskim zonama i nismo našli statistički značajnu razliku ( $p=0,300$ ).

Istim testom usporedili smo distribuciju membranskog i citoplazmatskog E-kadherina u tri različite tumorske regije te našli statistički značajnu razliku između češće distribucije visoke ekspresije membranskog E-kadherina u transformacijskom rubu ( $p<0,001$ ) i centru tumora ( $p<0,001$ ) u odnosu na ekspresiju citoplazmatskog E-kadherina u tim regijama, te statistički značajno češću distribuciju niske ekspresije citoplazmatskog E-kadherina u odnosu na membranski E-kadherin u invazivnom rubu tumora ( $p<0,003$ ).

Uporabom KM krivulja preživljenja za membranski E-kadherin u transformacijskom rubu i centru tumora te citoplazmatski E-kadherin u invazivnom rubu tumora nije bilo moguće utvrditi utjecaj niske i visoke ekspresije E-kadherina u ovim tumorskim regijama na preživljenje.

Usporedili smo distribuciju ekspresije membranskog beta-katenina u tri različite regije tumora (transformacijskom rubu, centru i invazivnom rubu), te  $\chi^2$ -testom našli značajno češću pojavu niske ekspresije membranskog beta-katenina u tumorskim stanicama invazivnog ruba tumora u odnosu na visoku ekspresiju membranskog beta-katenina u transformacijskom rubu i centru tumora ( $p<0,001$ ).

Zatim smo istim testom usporedili distribuciju ekspresije citoplazmatskog beta-katenina po tumorskim zonama i nismo našli statistički značajnu razliku ( $p=0,240$ ).

Istim testom usporedili smo distribuciju membranskog i citoplazmatskog beta-katenina u tri različite tumorske regije te našli statistički značajnu

razliku između češće distribucije niske ekspresije citoplazmatskog beta-katenina u odnosu na ekspresiju membranskog beta-katenina u transformacijskom rubu ( $p < 0,001$ ).

Uporabom KM krivulja preživljenja za membranski beta-katenin u transformacijskom rubu i invazivnom rubu tumora te citoplazmatski beta-katenin u transformacijskom rubu tumora nije bilo moguće utvrditi utjecaj niske i visoke ekspresije beta-katenina u ovim tumorskim regijama na preživljenje.

Prognostički značaj E-kadherina i beta-katenina u karcinomima grkljana bio je predmet brojnih studija čiji rezultati nisu eksplicitni. U većini studija utjecaj ekspresije E-kadherina i beta-katenina na preživljenje indirektno se, uglavnom u korelaciji s veličinom tumora, gradusom ili metastazama u limfnim čvorovima, povezuje s prognozom (74,78). Izostanak korelacije ekspresije E-kadherina i beta-katenina na membrani i u citoplazmi tumorskih stanica, promatranog u tri tumorske regije s preživljenjem bolesnika, u skladu je s nalazima u literaturi, jer niti jedna studija nije potvrdila neovisni prognostički značaj E-kadherina i beta-katenina u karcinomima grkljana.

Naši rezultati pokazali su da u promatranom uzorku postoji statistički značajna heterogenost u ekspresiji E-kadherina i beta-katenina u pojedinim regijama tumora. Tako su invazivni rubovi pokazali značajno slabiju ekspresiju membranskog E-kadherina i membranskog beta-katenina u odnosu na centar i transformacijski rub tumora, dok za citoplazmatsku ekspresiju nije nađena razlika po tumorskim regijama ni za E-kadherin ni za beta-katenin. Ovi podaci, vezani za intratumorsku heterogenost, u skladu su s do sada objavljenim podacima za AgNOR, sadržaj nukleinskih kiselina, katepsin D i ciklin D1 (25,26). Smatram da je od velike važnosti različita ekspresija komponenti kadherin/kateninskog kompleksa u tumoru ili nekom

njegovom dijelu, jer različita ekspresija ujedno implicira različit metastatski i invazivni potencijal zbog promjene u adhezivnim karakteristikama tumorskih stanica. Rađene su brojne studije bazirane na hipotezi da interakcije adhezivnih molekula mogu imati svoj doprinos pri metastaziranju, čiji rezultati su pokazali negativnu korelaciju između invazivnog kapaciteta i ekspresije kadherina (78-80). Dobiveni rezultati u ovoj studiji, odnosno niska ekspresija membranskog E-kadherina i beta-katenina u invazivnom rubu tumora, u dostupnoj literaturi se objašnjava kao moguća pomoć tumorskim stanicama u procesu infiltracije i metastaziranja. Potencijalno bi se na osnovi ekspresije adhezivnih molekula u tumorima, mogla odrediti njihova invazivnost i sposobnost metastaziranja, na koju u ovom radu upućuje istina, slaba negativna statistički značajna korelacija (Spearman test Tablica 32.) membranskog E-kadherina u centru tumora i slaba pozitivna statistički značajna korelacija (Spearman test Tablica 31.) citoplazmatskog beta-katenina u transformacijskom rubu tumora i postojanje udaljenih metastaza a što bi doprinjelo predviđanju prognoze, ali i adekvatnijem terapijskom pristupu datom tumoru. To se odnosi na teoretsku mogućnost ciljanog antitumorskog liječenja koje bi za cilj imalo normalizaciju razina komponenti kadherin/kateninskog kompleksa s ciljem smanjivanja ili blokade invazije tumorskih stanica, a takva neinvazivna strategija liječenja mogla bi povećati preživljenje i kvalitetu života oboljelih.

U ovom istraživanju našla sam statistički značajno nisku ekspresiju membranskog E-kadherina i beta-katenina u stanicama invazivnog ruba tumora kod bolesnika s dobro diferenciranim karcinomom grkljana odnosno gradusom G1, što se može objasniti smanjenom međustaničnom adhezijom tumorskih stanica u invazivnom rubu kod dobro diferenciranih tumora. S druge strane nađena je statistički značajno viša ekspresija citoplazmatskog beta-katenina u centru slabo diferenciranih karcinoma grkljana, gradusa G3, a što potvrđuje i Spearman test (Tablica 31.) slabom statistički značajnom negativnom korelacijom, što možemo protumačiti akumulacijom

slobodnog beta-ksenina u citoplazmi tumorskih stanica koja dovodi do pojačane proliferacije i slabije diferencijacije tih stanica.

Zanimljiv je nalaz statistički značajno češće niske ekspresije citoplazmatskog beta-ksenina u invazivnom rubu glotičkih karcinoma dobiven u ovoj studiji, koji možemo povezati s niskim invazivnim potencijalom karcinoma grkljana glotičke lokalizacije koji ujedno ima i najbolju prognozu.

U našoj studiji nije dokazana niti jedna značajna korelacija i razlika u ekspresiji citoplazmatskog E-kadherina, te ostaje naći objašnjenje podjednake ekspresije citoplazmatskog E-kadherina u tri različite promatrane tumorske regije. Budući da u invazivnom rubu tumora bilježimo značajno nižu ekspresiju membranskog E-kadherina i beta-ksenina, za razliku od citoplazmatskog E-kadherina pretpostavlja se da je razlog tom nemogućnost integracije defektnog proteina na svoj inače normalan položaj. To može biti jedan od razloga akumulacije E-kadherina u citoplazmi tumorskih stanica, ali još nije jasno da li ga tumor koristi u neku svrhu obzirom na ulogu E-kadherina u regulaciji stanične migracije, proliferacije, apoptoze i diferencijacije.

Među rezultatima ove studije je i opravdanost promatranja tumora kroz prizmu heterogenosti koja je i prostorno određena kroz tri tumorske regije. Upravo izneseni rezultati različite ekspresije E-kadherina i beta-ksenina u tri tumorske regije potvrđuju naše sumnje da naizgled uniformni tumor pokazuje i prostorne razlike u biološkom ponašanju.

Rezultati analize, nadalje pokazuju da se klinički određeni TNM ne može koristiti kao neovisni prognostički čimbenik. Uporabom KM krivulje preživljenja nije bilo moguće utvrditi utjecaj zasebno analiziranih T odnosno veličina tumora, N (zahvaćenost limfnih čvorova) i M (prisutnost udaljenih metastaza) iz ljestvice TNM na prognozu. Vjerojatno odgovor leži u činjenici



da mikrometastaze nije moguće klinički otkriti, a to je i objašnjenje zašto je pouzdanost i valjanost klinički određenog TNM nedostatna.

Stupanj histološke diferencijacije tumora (gradus) uporabom KM krivulje preživljenja pokazao je da se podjela na gradus G1, G2 i G3 ne može koristiti kao neovisan prognostički čimbenik, dok je RPART algoritam pokazao da je ta podjela ipak opravdana jer s porastom gradusa raste rizik umiranja.

Na kraju smo primjenili multivarijatnu analizu uporabom RPART algoritma. Rekurzivno particioniranje (RP) je metoda umjetne inteligencije koja se koristi za izgradnju klasifikacijskih i regresijskih modela. RP je koristan postupak za rješavanje cijelog niza problema, ponajviše zbog sposobnosti opisa kompleksnih i nelinearnih interakcija. U onkologiji se koristi za izdvajanje čimbenika rizika, određivanje prognostičkih indeksa, te optimizaciju dijagnostičkih i terapijskih postupaka. Bitna je činjenica da se rezultati RP-a daleko lakše interpretiraju u odnosu na klasične regresijske metode. RP generira skup pravila i konstruira stablo odluke. Postoji više algoritama rekurzivnog particioniranja, a za analizu u ovoj studiji odabran je rpart algoritam koji se izrađuje dvostupanjskim postupkom. U prvom koraku koriste se svi ispitanici. Algoritam pronalazi varijablu koja najbolje razdvaja ispitanike u dvije podskupine. Potom se postupak ponavlja odvojeno za svaku podskupinu sve dok ne dosegne podskupine minimalne veličine. Drugi korak je postupak koji smanjuje kompleksnost modela.

Uporabom rpart-a dobiveno je stablo odluke s četiri čvora odluke, koje je prikazano na slici 3.

Stablo odluke protumačili smo na sljedeći način:

1. Najvažniji čimbenik povezan s umiranjem jest stadij tumora. Bolesnici s tumorom T1, T2 i T3 (hazard 0,7625) imaju dva i pol puta manji relativni rizik umiranja od bolesnika s tumorom T4 (hazard 1,8764). Dobiveni rezultat potvrđuje procjena preživljenja po Kaplan-Meieru, prikazana na (Slika 13.), iz koje je vidljivo da je razlika među te dvije

skupine statistički signifikantna (log-rank test,  $p = 0,019$ ). Ovaj rezultat jasno upućuje da je veličina tumora osnovni prognostički čimbenik.

2. U drugom čvoru odluke (bolesnici s T1, T2, i T3) vrši se razdvajanje prema vrijednosti ekspresije membranskog E-kadherina u stanicama centra tumora na dvije podskupine: (a) bolesnici s niskom ekspresijom (intezitet bojanja 0 i 1); i (b) bolesnici s visokom ekspresijom (intezitet bojanja 2 i 3). Relativni rizik umiranja je tri puta manji u bolesnika s niskom aktivnošću membranskog E-kadherina u stanicama centra tumora (hazard 0,2578) u odnosu na bolesnike s visokom aktivnošću (hazard 0,8380). Dobiveni rezultat nije potvrđen procjenom preživljenja po Kaplan-Meieru (Slika 14.) jer razlika između te dvije skupine statistički nije bila signifikantna (log-rank test,  $p = 0,107$ ). Ovi podaci upućuju da ekspresija membranskog E-kadherina u stanicama centra tumora ima niži informacijski sadržaj od veličine tumora.

3. U trećem čvoru vrši se razdvajanje bolesnika s T4 prema stupnju histološke diferenciranosti (gradus) na dvije podskupine: (a) bolesnici s G1; i (b) bolesnici s G2 i G3. Bolesnici s G1 imaju četiri puta manji relativni rizik umiranja (hazard 0,6541) u odnosu na bolesnike s G2 i G3 (hazard 2,5362). Dobiveni rezultat nije potvrđen procjenom preživljenja po Kaplan-Meieru (Slika 15.) jer razlika između te dvije skupine statistički nije bila signifikantna (log-rank test,  $p = 0,161$ ). Podaci upućuju da je informacijski sadržaj T4 važniji za procjenu preživljenja od informacije sadržane u gradusu.

4. U četvrtom čvoru odluke bolesnici s T4, te G2 i G3 se razvrstavaju u dvije daljnje podskupine prema razini ekspresije membranskog beta-katenina u stanicama transformacijskog ruba tumora: (a) bolesnici s razinom ekspresije 3; i (b) bolesnici s razinom ekspresije 0, 1 i 2. Relativni rizik umiranja je šest puta manji u bolesnika s razinom ekspresije 3

(hazard 0,5155) u odnosu na bolesnike s razinom ekspresije 0, 1 i 2 (hazard 2,9781). Dobiveni rezultat nije potvrđen procjenom preživljenja po Kaplan-Meieru (Slika 16.) jer razlika između te dvije skupine statistički nije bila signifikantna (log-rank test,  $p = 0,119$ ). Podaci upućuju da je informacijski sadržaj membranskog beta-katenina u stanicama transformacijskog ruba tumora niži od informacijskog sadržaja visokog stupnja gradusa (G2 i G3).

Na kraju ostaje činjenica da su svi ispitanici uključeni u ovu studiju operirani, a radikalnost zahvata određena je relativno nepouzdanim kliničkim TNM. Operativnim zahvatom odstranjen je primarni tumor, a veličina tumora je prema rezultatima ove studije jedini signifikantan prognostički čimbenik, i ako nije bilo metastaza to znači izlječenje. Ali ako je tumor dao metastaze prognoza je lošija, te svaki pokušaj pronalaska pokazatelja sposobnosti metastaziranja odnosno agresivnijeg biološkog ponašanja tumora može doprinijeti adekvatnom terapijskom pristupu. Takva mogućnost je u našoj studiji uočena kod tumora T1, T2 i T3 koji su imali nisku razinu ekspresije membranskog E-kadherina u centru tumora, što potvrđuju i podaci iz literature koji to objašnjavaju nekrozom u centru dobro diferenciranih tumora.

Stupanj histološke diferencijacije tumora (gradus) nije neovisan prognostički čimbenik, ali i u ovoj su studiji izdvojeni bolesnici s gradusom G1, odnosno dobro diferencirani koji su pokazali manji rizik od umiranja iako se radi o veličini tumora T4. S druge strane bolesnici s gradusom G2 i G3 odnosno umjereno i slabo diferencirani tumori imaju manji rizik umiranja ukoliko im je visoka razina ekspresije membranskog beta-katenina u stanicama transformacijskog ruba tumora, što također potvrđuju podaci iz literature koji visoku ekspresiju membranskog beta-katenina povezuju s boljom diferencijacijom tumora uz objašnjenje da beta-katenin u kancerogenezi pločastih karcinoma grkljana imaju ulogu adhezivne molekule.

Rezultati dobiveni u ovoj studiji, kao i podaci iz literature, ukazuju da informaciju o agresivnosti biološkog ponašanja tumora, a onda i prognozu, za sada nije moguće dobiti promatranjem samo jednog parametra. Za sada je jasno da s porastom broja promatranih parametara raste sposobnost pravilnog klasificiranja bolesnika u dijagnostičko-prognostičke podskupine, ali samo dok broj parametara ne usporava i ne poskupljuje rutinske dijagnostičke postupke, čemu bi u budućnosti moglo doprinijeti i uvažavanje intratumorske heterogenosti koju sam u ovoj studiji primjenila promatranjem tumora u tri tumorske regije na rutinskim preparatima.

## 6. ZAKLJUČCI

U ovoj studiji, provedenoj na 90 bolesnika s operiranim karcinomom grkljana, analizirana je prognostička vrijednost određenog pTNM, stupanj histološke diferenciranosti (gradusa) tumora, lokalizacije primarnog tumora, membranskog i citoplazmatskog E-kadherina i beta-katenina u transformacijskom rubu, centru i invazivnom rubu tumora semikvantitativno određenih na imunohistokemijski obojenim rutinskim preparatima. Pomoću Kaplan-Meierovih krivulja preživljenja i RPRT algoritamskom analizom došli smo do sljedećih zaključaka:

1. Imunohistokemijskom metodom (Avidin-biotin kompleks) dokazana je ekspresija membranskog i citoplazmatskog E-kadherina u stanicama planocelularnog karcinoma grkljana u tri različite tumorske regije odnosno u transformacijskom rubu, centru i invazivnom rubu tumora.
2. Nađena je statistički značajno češća visoka ekspresija membranskog E-kadherina u transformacijskom rubu i centru tumora u odnosu na nisku ekspresiju membranskog E-kadherina u invazivnom rubu tumora.
3. Ekspresija citoplazmatskog E-kadherina nije pokazala statistički značajnu razliku u tri različite tumorske regije.
4. Imunohistokemijskom metodom (Avidin-biotin kompleks) dokazana je ekspresija membranskog i citoplazmatskog beta-katenina u stanicama planocelularnog karcinoma grkljana u tri različite regije odnosno transformacijskom rubu, centru i invazivnom rubu tumora.
5. Nađena je statistički značajno češća visoka ekspresija membranskog beta-katenina u transformacijskom rubu i centru tumora u odnosu na nisku ekspresiju membranskog beta-katenina u invazivnom rubu.

6. Ekspresija citoplazmatskog beta-katenina nije pokazala statistički značajnu razliku u tri različite tumorske regije.
7. Niska ekspresija membranskog E-kadherina i membranskog beta-katenina statistički je značajno češće nađena u invazivnom rubu dobro diferenciranih karcinoma grkljana, gradus G1.
8. Visoka ekspresija citoplazmatskog beta-katenina statistički je značajno češće nađena u centru slabo diferenciranih karcinoma grkljana, gradus G3.
9. Niska ekspresija citoplazmatskog beta-katenina statistički je značajno češće nađena u invazivnom rubu glotičkih planocelularnih karcinoma grkljana.
10. Različite vrijednosti ekspresije membranskog i citoplazmatskog E-kadherina u transformacijskom rubu, centru i invazivnom rubu tumora nisu pokazale neovisnu prognostičku vrijednost u planocelularnim karcinomima grkljana.
11. Različite vrijednosti ekspresije membranskog i citoplazmatskog beta-katenina u transformacijskom rubu, centru i invazivnom rubu tumora nisu pokazale neovisnu prognostičku vrijednost u planocelularnim karcinomima grkljana.
12. Veličina tumora u ovoj studiji bila je jedini signifikantan prognostički parametar, koji pokazuje dva i pol puta manji rizik od umiranja za skupinu bolesnika s veličinom tumora T1, T2 i T3 u odnosu prema bolesnicima s veličinom tumora T4.
13. Tri puta manji rizik umiranja u skupini bolesnika s veličinom tumora T1, T2 i T3 imaju bolesnici s niskom ekspresijom membranskog E-kadherina u centru tumora, koja je najvjerojatnije posljedica orožnjavanja u centru dobro diferenciranih planocelularnih karcinoma grkljana.
14. Rutinski određen gradus i u skupini bolesnika s veličinom tumora T4 pokazuje četiri puta manji rizik od umiranja ukoliko se radi

o dobro diferenciranim planocelularnim karcinomima grkljana, odnosno gradusu G1.

15. Bolesnici s veličinom tumora T4, te gradusom G2 i G3 pokazuje šest puta manji rizik od umiranja ukoliko imaju visoku razinu ekspresije membranskog beta-katenina u stanicama transformacijskog ruba tumora.

## 7. SAŽETAK

### PROGNOSTIČKA VRIJEDNOST INTRATUMORSKE HETEROGENOSTI BETA-KATENINA I E-KADHERINA U PLANOCELULARNIM KARCINOMIMA GRKLJANA

U studiju je uključeno 90 bolesnika operiranih u Klinici za bolesti uha, nosa i grla, KBC Zagreb u periodu od 2000.-2005. godine. Imunohistokemijskim protutijelima na E-kadherin i beta-katenin (DAKO) obojani su dobiveni preparati. Određen je TNM, gradus i lokalizacija tumora, a imunohistokemijska reakcija je procjenjena semikvantitativno na membrani i u citoplazmi u tri područja tumora; transformacijskom rubu, centru i invazivnom rubu.

Ekspresija membranskog i citoplazmatskog E-kadherina, te citoplazmatskog i membranskog beta-katenina značajno se razlikovala unutar tumorskih regija. Invazivni rub pokazao je znatno slabiju ekspresiju ovog membranskog kompleksa.

Jaka ekspresija citoplazmatskog beta-katenina u centru tumora češća je kod slabo diferenciranih karcinoma grkljana.

Rekurzivnim particioniranjem veličina tumora je izdvojena kao jedini signifikantan prognostički parametar, pri čemu tumori veličine T1, T2 i T3 imaju bolje preživljenje u odnosu na tumore veličine T4.

Tumori veličine T1, T2 i T3 ukoliko imaju visoku razinu ekspresije membranskog E-kadherina u centru tumora, imaju tri puta manji rizik od umiranja. S druge strane, tumori veličine T4 imaju četiri puta manji rizik od umiranja ukoliko su dobro diferencirani odnosno gradusa G1.

Tumori veličine T4, umjereno i slabo diferencirani odnosno gradusa G2 i G3 imaju šest puta manji rizik umiranja ukoliko imaju visoku ekspresiju membranskog beta-katenina u transformacijskom rubu.



## **8. SUMMARY**

### PROGNOSTIC VALUE OF INTRATUMORAL HETEROGENEITY OF BETA-CATENIN AND E-KADHERIN IN THE SQUAMOUS CELL LARYNGEAL CARCINOMA

The study included 90 patients with laryngeal squamous cell carcinoma. Immunohistochemical reaction with anti E-kadherin and beta-catenin antibodies was assessed using a scoring system (0-3), estimating membranous and cytoplasmic immunopositivity at three separate locations; transformational zone, tumor center and invasive margin of the tumor.

A significant difference of expression between tumor regions was found for both membranous and cytoplasmic E-kadherin and beta-catenin. The invasive segment showed the poorest membranous reaction. Correlation was found between the poorest expression for both membranous E-kadherin and beta-catenin in the invasive margin and good histological differentiation of the tumor.

RPART statistical program revealed tumor size as a single statistically significant prognostic parameter, in the way that tumor sizes T1, T2 and T3 have better survival than tumor size T4.

Tumor sizes T1, T2 and T3 with high expression of membranous E-kadherin in the tumor center have three times lower risk of death. On the other hand, tumor size T4 has four times lower risk of death if they are well differentiated i.e. grade G1.

Tumor sizes T4, moderate and poorly differentiated (grade 2 i 3) have six times lower risk of death if they have high expression of membranous beta-catenin in the transformational zone of the tumor.

Ankica Vasilj, 2011.

## 9. LITERATURA

1. Padovan I. Otorinolaringologija. Zagreb: Školska knjiga; 1991: str. 280-315.
2. Bumber Ž, Katić V, Nikšić-Ivančić M, Pegan B, Petric V, Šprem N. Otorinolaringologija. Zagreb: Naklada Ljevak; 2004: str. 272-75.
3. Katić V, Prgomet D. I sur. Otorinolaringologija. Zagreb: Naklada Ljevak; 2009: str. 293-99.
4. Krmpotić-Nemanjić J. Anatomija čovjeka. Zagreb: Medicinska naklada; 1993: str. 653-65.
5. Larsen WJ. Human embryology. Philadelphia, Pennsylvania: Churchill Livingstone; 2001: str.362-63.
6. Sadler TW. Langmanova medicinska embriologija. 10. izd. Zagreb: Školska knjiga; 2008: str. 197-99.
7. Krajina Z. Otorinolaringologija i cervikofacijalna kirurgija I. Zagreb: Školska knjiga; 1983: str. 419-35.
8. Junqueira LC, Carneiro J. Osnove histologije. Zagreb: Školska knjiga; 2005: str. 253-54.
9. Stevens A, Lowe J. Human histology. Toronto: Elsevier Mosby; 2005: str. 170-74.
10. Robins KC. Osnove patologije. 2. izd. Zagreb: Školska knjiga; 2000: str. 435-36.
11. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Raymond and Young J, ur. Cancer Incidence in 5 Continents Vol. VII. Lyon: IARC Scientific publications (No.143); 1997.
12. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Registar za rak. Incidencija raka u Hrvatskoj 2006. Bilten br. 31 Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2008, str. 18-25.
13. Turić M, Kolarić K, Eljuga D. Klinička onkologija. Zagreb; Nakladni zavod Globus; 1996: str. 419-23.

14. Koufman JA, Burke AJ. The etiology and pathogenesis of laryngeal carcinoma. *Otolaryngol Clin North Am.* 1997; 30 (1):1-19.
15. Myers EN, Suen JY. Cancer of the larynx. *Cancer of the head and neck: Mosby Co; 1996: str.403-406.*
16. Green FL, Page DL, Fleming ID i sur. ur. *AJCC. Cancer Staging Manual.* New York: Springer-Verlag; 2003.
17. Wittekind C, Green FL, Hutter RVP i sur, ur. *TNM Atlas.* Berlin: Springer; 2004: str 5-50.
18. Damjanov I, Jukić S, Nola M. *Patologija.* Zagreb: Medicinska naklada; 2008: str. 352-53.
19. Padovan I. *Otorinolarongologija 3, kirurgija usne šupljine, ždrijela, grla i vrata.* Zagreb: Školska knjiga; 1987: str.287-91.
20. 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.
21. Rosai J, ur. *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology.* St. Louis: Mosby; 2004: str.223-338.
22. Garas J, Mc Guirt WE. Squamous cell carcinoma of the subglottis. *Otolaryngol.* 2006; 27(1):1-4.
23. 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.
24. Spafford MF, Koeppe J, Pan Z. Correlation of tumor markers p53, bcl-2, CD34, CD 44H, CD44v6 and Ki-67 with survival and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Susr* 2000;122:627-632.
25. Pignatato L, Cappacio P, Pruneri G i sur. The predictive value of p53, MDM-2, cyclin D1 and Ki67 in the progression from low grade dysplasia towards carcinoma of the larynx. *J Laryngol Otol* 1998; 112: 455-9.
26. Cappacio P, Pruneri G, Carboni N i sur. Cyclin D1 protein expression in related to clinical progression in laryngeal squamous cell carcinoma. *J Laryngol Otolog* 1997; 111: 622-6.

27. 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.
28. 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: 66-7.
29. Sun PC, el-Mofty SK, Haughey BH, Scholnik SB. Allelic loss in squamous cell carcinomas of the larynx: discordance between primary and metastatic tumors. *Genes Chrom cancer* 1995; 14: 145-8.
30. Mittari E, Charalabopoulos A, Batistatou A, Charalabopoulos K. The role of E-cadherin/catenin complex in laryngeal cancer. *Exp Oncol* 2005;27(4):257-261.
31. Becciolini A, Balzi M, Faraoni P, Biggeri A, Potten CS. 3H-thymidine labeling index (TLI) as a marker of tumor growth heterogeneity: evaluation in human solid carcinomas. *Cell Prolif* 1997; 30:117-26.
32. Goldsmith MM, Pillsbury HC. Pathologic and cytometric indicators of biologic behavior in laryngeal cancer. *Laryngeal cancer*. Silver C.E. izd. Thieme Medical Publisher, New York, str. 27-32.
33. Šerman LJ, Šerman A. The role of glycoproteins in the processes of implantation and placentation. *Gynaecol Perinatol* 2006; 15(2):82-88.
34. Šimundić AM. Struktura i funkcija adhezijskih molekula. *Biochem Medica* 2001; 11(1-2):1-12.
35. Yap AS, Briehner WM, Gumbiner BM. Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Ann Rev Cell Res* 1997;13:119-46.
36. Maxwell P. Carcinoembryonic antigen: cell adhesion molecule and useful diagnostic marker. *Br J Biomed Sci* 1999;56(3):209-14.
37. Petruzzelli L, Takami M, Humes HD. Structure and function of cell adhesion molecules. 1999;106:467-76.
38. Takeichi M. Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Ann Rev Biochem* 1990;59:237-52.

39. Takeichi M. Morphogenic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:619-27.
40. Lewis JE, Jensen PJ, Johnson KR, Wheelock MJ. E-cadherin mediates adherens junction organisation through protein kinase C. *J Cell Sci* 1995;108:3615-3621.
41. Overduin M, Hervey TS, Bagby S i sur. Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion. *Science* 1995;267:386-389.
42. Shapiro L, Fannon AM, Kwong PD i sur. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* 1995;374:327-337.
43. Beavon IRG. The E-cadherin-catenin complex in tumour metastasis: structure, function and regulation. *Eur J Cancer* 2000;36:1607-1620.
44. Juliano RL, Varner JA. Adhesion molecules in cancer: the role of integrins. *Curr Opin Cell Biol* 1993;5:812-818.
45. Berx G, Staes K, Van Hengel J i sur. Cloning and characterisation of the human invasion suppressor gene E-cadherin (CDH1). *Genomics* 1995;26:281-289.
46. Šlaus-Pecina N. Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *Cancer Cell International* 2003;3:1-7.
47. Hirohashi S, Kanai Y. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci* 2003;94(7):575-581.
48. Barth AI, Nathke IS, Nelson W. Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:683-690.
49. Willert K, Nusse R. Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Curr Opin Genet Dev* 1998;8:95-102.
50. Hayashida Y, Honda K, Idogawa M, Ino Y, Ono M, Tsuchida A, Aoki T, Hirohashi S, Yamada T. E-cadherin regulates the association between beta-catenin and actinin-4. *Cancer Res* 2005;65(19):8836-8845.

51. Hulsken J, Birchmeier W, Behrens J. E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. *J Cell Biol* 1994;127:2061-2069.
52. Orsulic S, Huber O, Aberle H, Arnold S, Kemler R. E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localisation and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation. *J Cell Sci* 1999;112:1237-1245.
53. Huber AH, Weis WI. The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell* 2001;105:391-402.
54. Van der Wurff AM, Vermeulen SJT, Van der Linden EPM, Mareel MM, Bosman FT, Ardens JW. Patterns of alfa and beta-catenin and E-cadherin expression in colorectal adenomas and carcinomas. *J Pathol* 1997;182:325-330.
55. Ghadimi BM, Behrens J, Hoffmann I, Haensch W, Birchmeier W, Schlag PM. Immunohistological analysis of E-cadherin, alpha, beta i gamma-catenin expression in colorectal cancer: implications for cell adhesion and signaling. *Eur J Cancer* 1999;35(1):60-65.
56. Elzagheid A, Algars A, Bendardaf R, Lamlun H, Ristamaki R, Collan Y, Syrjanen K, Pyrhonen S. E-cadherin expression pattern in primary colorectal carcinomas and their metastases reflects disease outcome. *World J Gastroenterol* 2006;12(27):4304-4309.
57. El-Bahrawy MA, Poulson R, Jeffery R, Talbot I, Alison MR. The expression of E-cadherin and catenins in sporadic colorectal carcinoma. *Hum Pathol* 2001;32:1216-1224.
58. Khoursheed MA, Mathew TC, Makar RR, Louis S, Asfar SK, Al-Sayer HM, Dashti HM, Al-Bader A. Expression of E-cadherin in human colorectal cancer. *Surgeon* 2003;1:86-91.
59. Wei Y, Van Hhieu TJ, Prigent S, Srivatanakul P, Tiollais P, Buendia MA. Altered expression of E-cadherin in hepatocellularcarcinoma: correlations with genetic alterations, beta-catenin expression, and clinical features. *Hepatology* 2002;36(3)692-700.

60. Endo K, Ueda T, Ueyama J, Ohta T, Terada T. Immunoreactive E-cadherin, alpha-catenin, beta-catenin and gamma-catenin proteins in hepatocellular carcinoma: relationships with tumor grade, clinicopathologic parameters and patients survival. *Hum Pathol* 2000;31(5):558-565.
61. Li YJ, Ji XR. Relationship between expression of E-cadherin-catenin complex and clinicopathologic characteristics of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9(2):368-372.
62. Giulianotti PC, Boggi U, Fornaciari G, Prognostic value of histological grading in ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Int J Pancreatol* 1995;17:279-289.
63. Richmond PJM, Karayiannakis AJ, Nagafuchi A, Kaisary AV, Pignatelli M. Aberrant E-cadherin and alpha-catenin expression in prostate cancer: correlation with patient survival. *Cancer Res* 1997;57:3189-3193.
64. Berx G, Van Roy F. The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. *Breast Cancer Res* 2001;3:289-293.
65. Bukholm IK, Nesland JM, Borresen-Dale A-L. Re-expression of E-cadherin, alpha-catenin and beta-catenin, but not of gamma-catenin, in metastatic tissue from breast cancer patients. *J Pathol* 2000;190:15-19.
66. Bukholm IK, Nesland JM, Karesen R, Jacobsen U, Borresen-Dale A-L. E-cadherin and alpha, beta and gamma-catenin protein expression in relation to metastasis in human breast carcinoma. *J Pathol* 1998;185:262-266.
67. Kowalski PJ, Rubin M, Klier CG. E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases. *Breast Cancer RES* 2003;5:217-222.
68. Elzagheid A, Kuopio T, Ilmen M, Collan Y. Prognostication of invasive breast cancer by quantification of E-cadherin immunostaining: the methodology and clinical relevance. *Histopathology* 2002;41:127-133.
69. Gamallo C, Palacios J, Suarez A, Pizarro A, Navarro P, Quintanilla, Cano A. Correlation of E-cadherin expression with differentiation grade and histological type in breast carcinoma. *Am J Pathol* 1993;142:987-993.

70. Querzoli P, Coradini D, Pedriali M, Boracchi P, Ambrogi F, Raimondi E, La Sorda R, Lattanzio R, Rinaldi R, Lunardi M, Frasson C, Modesti F, Ferretti S, Piantelli M, Iacobelli S, Biganzoli E, Nenci I, Alberti S. An immunohistochemically positive E-cadherin status is not always predictive for a good prognosis in human breast cancer. *Br J Cancer* 2010;103(12):1835-9.
71. Žigmund M, Pećina-Šlaus N, Kušec V, Nikuševa-Martić T, Čačić M, Šlaus M, Bulić-Jakuš F. Beta-catenin expression in malignant melanoma. *Acta Clin Croat* 2006;45:133-139.
72. Melandsmo GM, Holm R, Nesland JM, Fodstad O, Florenes VA. Reduced beta-catenin expression in the cytoplasm of advanced-stage superficial spreading malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 2003;9:3383-8.
73. Kageshita T, Hamby CV, Ishihara T, Matsumoto K, Saida T, Ono t. Loss of beta-catenin expression associated with disease progression in malignant melanoma. *Br J Dermatol* 2001;145:210-6.
74. Rodrigo JP, Dominguez F, Alvarez C, Manrique C, Herrero A, Suarez C. Expression of E-cadherin in squamous cell carcinomas of the supraglottic larynx with correlations to clinicopathological features. *Eur J Cancer* 2002;38:1059-1064.
75. Tapia R, Iglesias D, Marcos A, Meana G, Pedrero G, Nieto S. Prognostic significance of the expression of adhesion molecules E-cadherin, CD44s and CD44v6 in supraglottic squamous cell carcinomas. *Acta Otorrinolazngol Esp* 2002;53(10):745-751.
76. 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(6):384-389.
77. Liu M, Lawson G, Delos M, Jamart J, Chatelanin B, Remacle M, Marbaix E. 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.



78. Larizadeh MH, Damghani MA, Tabrizchi H, Mirshekari TR. Expression of E-cadherin in squamous cell carcinoma of the larynx and correlation with clinicopathological features. *J Med Sci* 2009;9(1):41-45.
79. Rodrigo JP, Dominguez F, Suarez V, Canel M, Secades P, Chiara MD. Focal adhesion kinase and E-cadherin as marker for nodal metastasis in laryngeal cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2007;133:145-150.
80. Massarelli E, Brown E, Tran NK, Liu D.D., Izzo JG, Lee JJ, El Naggar AK, Hong WK, Papadimitrakopoulou VA. Loss of E-cadherin and p27 expression is associated with head and neck squamous tumorigenesis. *Cancer* 2005;103(5):952-959.
81. Schipper JH, Frixen UH, Behrens J, Unger A, Jahnke K, Birchmeier W. E-cadherin expression in squamous cell carcinomas of the head and neck: inverse correlation with tumor dedifferentiation and lymph node metastasis. *Cancer Res* 1991;51:6328-6337.
82. Mattijssen V, Peters HM, Schalkwijk L. E-cadherin expression in head and neck squamous cell carcinoma is associated with clinical outcome. *Int J Cancer* 1993;55:580-585.
83. Yu Z, Weinberger PM, Provost E, Haffty BG, Sasaki C, Joe J, Camp RL, Rimm DL, Psyrri A. Beta-catenin functions mainly as an adhesion molecule in patients with squamous cell cancer of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2005;11(7):2471-2477.
84. Kurtz KA, Henry T, Hoffman MD, Zimmerman MB, Robinson RA. Decreased E-cadherin but not beta-catenin expression is associated with vascular invasion and decreased survival in head and neck squamous carcinomas. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;134:142-146.
85. Mizushima T, Nakagawa H, Kamberov YG, Wilder EL, Klein PS, Rustgi AK. Wnt-1 but not epidermal growth factor induces beta-catenin/ T-cell factor-dependent transcription in esophageal cancer cell. *Cancer Res* 2002;62:277-282.

86. Morin PJ, Sparks AB, Korined V. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 1997;275:1787-1790.
87. Lopez-Gonzalez JS, Cristerna-Sanchez L, Vazquez-Manriquez ME, Jimenez-Orci G, Aguilar-Cazares D. Localizacion and level of expression of beta-catenin in human laryngeal squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;130:89-93.
88. Pietruszewska W, Kobos J, Gryczynski M. Expression of beta-catenin protein in laryngeal squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Pol* 2004;58(5):949-956.
89. Shackney SE, Shankey TV. Genetic and phenotypic heterogeneity of human malignancies: finding order in chaos. *Cytometry* 1995;21:2-5.
90. Hill RP. Tumor progression: Potential role of unstable genomic changes. *Cancer Metastasis Rev* 1990;9:137-147.
91. Klein G, Klein E. Evolution of tumors and the impact of molecular oncology. *Nature* 1985;315:190-195.
92. Heppner GH, Miller FR. The cellular basis of tumor progresision. *Int Rev Oncology* 1997;177:1-56.
93. Nicolson GL, Poste G. Tumor implantation and invasion at metastatic sites. *Int Rev Exp Pathol* 1983;25:77-181.
94. Nowell PC. Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res* 1986;46:2203-2207.
95. El-Naggar AK, Lopez-Varela V, Luna MA et al. Intratumoral DNA content heterogeinity in laryngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1992;118(2):169-173.
96. Jacob R, Welkoborsky HJ, Mann WJ. Heterogeneity of squamous cell carcinoma of the head and neck-analysis of tumor biologic factors and proliferation rates. *Laryngoscope* 1996;106:1170-1175.
97. Ćorić M. Intratumorska heterogenost ekspresije katepsina D, Ciklina D1, nm23 i nm23H1 gena u planocelularnom karcinomu grkljana. Doktorska disertacija. Zagreb, 2004.

98. Therneau TM, Grambsch PM. Modeling Survival data: Extending the Cox Model. Springer, New York, 2000, str. 7-38.
99. Therneau TM, Atkinson EJ. An Introduction to Recursive Partitioning: Using the RPART Routines. Mayo Foundation, Stanford, 1997.
100. Jonkman A, Kaanders JHA, Terhaard CHJ, Hoebbers FJP et al. Multicenter validation of recursive partitioning analysis classification for patients with squamous cell head and neck carcinoma treated with surgery and postoperative radiotherapy. Int J Radiation Oncology Biol Phys 2007;68(1):119-125.

## 10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Mostaru, 01. kolovoza 1968. godine, gdje sam završila osnovnu i srednju školu. Medicinski fakultet sam upisala 1987. na Univerzitetu u Tuzli, a diplomirala sam u lipnju 1994. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Dvogodišnji pripravnički staž od 1995.-1997. godine, obavila sam u Infektivnoj klinici «Fran Mihaljević» u Zagrebu. Državni ispit za doktore medicine položila sam u veljači 1997. godine.

U veljači 1997. primljena sam na mjesto sekundarca u Citološkom laboratoriju Zavoda za hematologiju Interne klinike KB «Sestre Milosrdnice», a 1998. godine započela sam specijalizaciju iz kliničke citologije. Specijalistički ispit položila sam u studenom 2001. godine, od kada radim kao specijalist kliničke citologije u Kliničkoj jedinici za citologiju KBC «Sestre Milosrdnice».

Poslijediplomski studij iz citologije na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 1994. godine, magistrirala sam u travnju 1998. godine s temom «Prognostička vrijednost katepsina D u karcinomima larinksa», pod vodstvom mentora prof.sc. S. Seiwertha.

Objavila sam više znanstvenih i stručnih radova te aktivno sudjelovala na više domaćih i međunarodnih stručnih i znanstvenih skupova.