

# Intratumorska heterogenost izraženosti citokina CXCR4 i CXCL12 i njihova prognostička vrijednost u planocelularnim karcinomima grkljana

---

**Kojić Katović, Sandra**

**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:105:573204>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-27**



*Repository / Repozitorij:*

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





## Središnja medicinska knjižnica

**Kojić Katović, Sandra (2011) *Intratumorska heterogenost izraženosti citokina CXCR4 i CXCL12 i njihova prognostička vrijednost u planocelularnim karcinomima grkljana [Intratumoral heterogeneity of CXCR4 and CXCL12 expression and their prognostical value in laryngeal squamous cell carcinoma]*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

<http://medlib.mef.hr/1303>

University of Zagreb Medical School Repository

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

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

**Sandra Kojić Katović**

**Intratumorska heterogenost izraženosti  
citokina CXCR4 i CXCL12 i njihova  
prognostička vrijednost u planocelularnim  
karcinomima grkljana**

**DISERTACIJA**



Zagreb, 2011.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Sandra Kojić Katović**

**Intratumorska heterogenost izraženosti  
citokina CXCR4 i CXCL12 i njihova  
prognostička vrijednost u planocelularnim  
karcinomima grkljana**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2011

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

Voditelj rada: prof. dr. sc. Sven Seiwert

Zahvaljujem mentoru prof.dr. Svenu Seiwertu na ideji i cjelokupnoj pomoći pri izradi ovog rada.

Dr.sc. Pašku Konjevodi, dr.med. zahvaljujem na statističkoj obradi podataka i stručnim savjetima, koje je nesebično dijelio.

Zahvaljujem djelatnicama histokemijskog laboratorija na vremenu i trudu uložnim u obradu analiziranog materijala.

Svojoj kolegici i prijateljici mr.sc. Ankici Vasilj, dr.med. zahvaljujem na prijateljstvu, savjetima i podršci na koje sam uvijek mogla računati.

Mr.sc. Silvi Ćurić Jurić, dr.med. i svim kolegicama, kolegama, prijateljicama i prijateljima koji su mi na bilo koji način pomagali tijekom izrade rada, također zahvaljujem.

Na kraju, ali ne najmanje važno, zahvaljujem svojoj obitelji na pomoći pri tehničkoj izradi rada, kao i na ljubavi, strpljenju i razumijevanju za vrijeme i pažnju koja im je bila oduzeta tijekom izrade rada.

Njima je ovaj rad i posvećen.

## POPIS SKRAĆENICA

(p)TNM - (patološki) tumor, status limfnih čvorova i udaljenih metastaza

PCNA – antigen jezgara proliferirajućih stanica

Ki-67 – proliferacijski marker

p53 – gen prigušivač

bcl-2/bax – regulatorna bjelančevina apoptoze

VEGF – vaskularno endotelni čimbenik rasta

AgNO<sub>3</sub> – argirofilna regija nukleolarnog organizatora

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija

EGFR – receptor za epidermalni čimbenik rasta

HPV – humani papiloma virus

CXCR4 – CXC kemokinski receptor 4

CXCL12 – CXC kemokinski ligand 12

SDF-1 – čimbenik stromalnih stanica-1

HIV – virus humane imunodeficijencije

ABC – avidin biotin kompleks

HE – hemalaun eozin

RP – rekurzivno particioniranje

TZ – transformacijska zona tumora

C – centar tumora

IR – invazivni rub tumora

RNA – ribonukleinska kiselina

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Grkljan.....	1
1.2. Tumori grkljana.....	3
1.2.1. Topografija karcinoma grkljana.....	4
1.2.2. Histopatologija karcinoma grkljana.....	7
1.3. Prognostički čimbenici karcinoma grkljana.....	8
1.3.1. Klasični prognostički čimbenici.....	9
1.3.1.1. TNM klasifikacija karcinoma grkljana.....	9
1.3.1.2. Tipovi stanične diferencijacije karcinoma grkljana.....	13
1.3.2. „Suvremeni“ prognostički čimbenici.....	14
1.4. Intratumorska heterogenost.....	16
1.4.1. Heterogenost planocelularnog karcinoma grkljana.....	18
1.5. Kemokini.....	20
1.5.1. CXCR4 (CXC kemokinski receptor 4).....	22
1.5.2. CXCL12 (CXC kemokinski ligand 12).....	24
2. HIPOTEZA I CILJEVI RADA.....	27
2.1. Hipoteza.....	27
2.2. Ciljevi rada.....	27
3. BOLESNICI I METODE ISTRAŽIVANJA.....	28
3.1. Bolesnici.....	28
3.2. Materijal i metode istraživanja.....	31
3.3. Statistička analiza podataka.....	34

4. REZULTATI.....	39
5. RASPRAVA.....	71
6. ZAKLJUČCI.....	81
7. SAŽETAK.....	83
8. SUMMARY.....	85
9. LITERATURA.....	87
10.ŽIVOTOPIS.....	98



## **1. UVOD**

### **1.1. GRKLJAN**

Grkljan se nalazi u prednjem gornjem dijelu vrata u visini od trećeg do šestog vratnog kralješka. Skelet grkljana čine tiroidna, krikoidna i dvije aritenoidne hrskavice i fibrokartilaginozni epiglotis. Tiroidna hrskavica je najveća hrskavica grkljana, sastavljena od četiriju četverouglastih ploča naprijed spojenih pod tupim kutem. Pomoću gornjih i donjih rogova tiroidna hrskavica vezana je za hioidnu kost, odnosno krikoidnu hrskavicu. Krikoidna hrskavica ima oblik prstena pečatnjaka čija je široka ploča okrenuta straga. Svojom čvrstoćom gradi osnovicu hrskavičnog skeleta grkljana. Aritenoidi su parne hrskavice u obliku trostrane piramide postavljene na gornji rub ploče krikoidne hrskavice. Od dvaju izdanaka jedan je processus vocalis, okrenut medijalno i naprijed, te gradi stražnju trećinu glasnice. Drugi, processus muscularis, položen je lateralno i služi za inserciju mišića. Aritenoidne hrskavice artikuliraju s krikoidnom hrskavicom sinovijalnim zglobovima, čija očuvanost je presudna za normalnu funkciju glasnice. Epiglotis je elastična hrskavica u obliku lista. Pričvršćena je za štitnu hrskavicu, a njezin je gornji rub slobodan. Sve hrskavice grkljana međusobno su povezane zglobovima i ligamentima. Mišići grkljana vežu grkljan s okolnim strukturama vrata, omogućuju mu kretanje ili ga fiksiraju tijekom fonacije. Motorika grkljana inervirana je n. laryngeus inferiorom (recurrens) i nervus laryngeus superiorom. Grkljan ima izravnu komunikaciju sa ždrijelom preko aditus ad laryngem. Šupljina

grkljana anatomski se dijeli na tri etaže: 1. gornja etaža, vestibulum laryngis proteže se od ulaza do ruba plicae ventricularis, 2. srednja etaža, glottis, prostor je između plicae ventricularis i plicae vocalis (tom dijelu pripada i ventriculus laryngis) i 3. subglotidni prostor koji se nalazi ispod glasnice i prema dolje je omeđen donjim rubom krikoidne hrskavice. Klinički se grkljan također dijeli na tri anatomske regije: 1. supraglotis – lingvalna i laringealna ploha epiglotisa, ariepiglotidni nabori, aritenoidi i ventrikularni nabori, 2. glotis – vokalni nabori, prednja i stražnja komisura i 3. subglotis – od donje granice glotisa do donjeg ruba krikoidne hrskavice. Sluznica grkljana nastavak je one koja prekriva ždrijelo i nastavlja se u onu koja prekriva dušnik. Gornji dio grkljana prekriven je mnogoslojnim pločastim epitelom, dok su donji dio vestibuluma, te srednje i donja etaža prekriveni dišnim trepetljivim cilindričnim epitelom (1,2). Epitel grkljana je endodermalnog porijekla, a hrskavice i mišići potječu od mezenhima četvrtog i šestog ždrijelnog luka. Tijekom embrionalnog razvitka, u vrijeme stvaranja hrskavica i epitel grkljana brzo se umnaža tako da privremeno zatvori lumen. Kasnijom vakuolizacijom i rekanalizacijom nastaje par lateralnih izbočina lumena – grkljanskih ventrikula, koji su ograničeni naborima tkiva koji se diferenciraju u lažne i prave glasnice. Sve mišiće grkljana inerviraju ogranci n. vagusa (3).

Primarne i vitalne funkcije grkljana su dišna i zaštitna. Grkljan je dio tubularnog sustava za izmjenu zraka s plućima tijekom respiratornih pokreta. Zaštitna funkcija grkljana osniva se na mehanizmu sfinktera koji se tijekom evolucije razvio kako bi štitio dišne puteve od stranih tijela.

Fonacija, kao sekundarna uloga, razvila se iz refleksnog zatvaranja grkljana, razvojem središnjeg živčanog sustava i boljom diferencijacijom perifernih organa. Mišići pokreću grkljan u njegovim značajnim funkcijama gutanja, disanja i fonacije. Zaštitna akcija grkljana tijekom gutanja ostvaruje se nevoljnim refleksom inhibicije disanja, odnosno zatvaranjem glotidnog sfinktera i pomakom grkljana prema naprijed i gore, pod zaštitu osnovice jezika. Tijekom disanja glotis se otvara uzrokujući pomak processus vocalisa gore i lateralno. Pri govoru i pjevanju vanjski mišići grkljana fiksiraju grkljan u određenom položaju ili ga pomiču u kranijalnom ili kaudalnom smjeru, te tako daju aparatu rezonancije potrebnu veličinu, oblik i čvrstoću (1).

## **1.2. TUMORI GRKLJANA**

Zloćudni tumori grkljana čine oko 2% svih zloćudnih tumora u organizmu, mnogo su češći u muškaraca nego u žena, najčešće se pojavljuju nakon 50. godine života, a posljednjih godina su u trajnom porastu. U Hrvatskoj je 2007. godine otkriveno 327 karcinoma grkljana u muškaraca i 20 u žena, što je ukupno 347 novootkrivenih slučajeva (4). Više od 90% svih malignih tumora grkljana su planocelularni karcinomi. Etiološki je planocelularni karcinom grkljana nedvojbeno povezan s pušenjem, a važni su duljina pušačkog staža i količina popušanih cigareta. Osim djelovanja karcinogenih tvari iz duhana (katran, krom, nikel, arsen), pušenje bi moglo i posredno utjecati na razvoj zloćudnog tumora oštećenjem

obrambenih sposobnosti dišnog puta. Ostali etiološki čimbenici su konzumiranje alkoholnih pića, ionizacijsko zračenje, mehaničko i termičko oštećenje sluznice grkljana, kronične upale, infekcija humanim papiloma virusom, laringealna keratoza i leukoplakija, utjecaji radnog mjesta, hrana siromašna voćem i povrćem. Osim što izaziva oštećenje i upalu sluznice gornjih dišnih puteva, alkohol pogoduje nastanku gastroezofagealnog refluksa, što može posredno oštetiti i sluznicu grkljana. Alkohol također smanjuje resorpciju hranjivih tvari i vitamina, od kojih je posebno važan vitamin A, koji sudjeluje u regulaciji dijeljenja stanica. Bolesnici koji boluju od kroničnog laringitisa pod većim su rizikom oboljevanja od karcinoma grkljana, te ih treba pažljivo nadzirati.

U vrijeme dijagnosticiranja 60% tumora lokalizirano je u grkljanu, 25% ima regionalne, a 10% udaljene metastaze.

### **1.2.1. TOPOGRAFIJA KARCINOMA GRKLJANA**

Zloćudni tumori grkljana dijele se na supraglotičke, glotičke, subglotičke i transglotičke. Takva podjela postoji, jer se tumori tih lokalizacija razlikuju po simptomima, načinu širenja i prognozi.

#### Supraglotički tumori

zahvaćaju epiglotis, ariepiglotske nabore, ventrikularne nabore i aritenoidne, čine oko 35-40% svih karcinoma grkljana, često se dulje vrijeme očituju nekarakterističnim simptomima (smetnje u grlu, bol pri

gutanju, najčešće kao posljedica perihondritisa), učestalost regionalnih metastaza iznosi od 25-50%, a u 20% oboljelih vratne su metastaze bilateralne.

### Glotički tumori

smješteni su na glasnicama, vrlo rano uzrokuju promuklost, pa se obično rano i dijagnosticiraju, čine oko 55-60% svih karcinoma grkljana, regionalne metastaze pojavljuju se u oko 10% tumora.

### Subglotički tumori

Prvi simptom tumora tog područja obično je hripanje pri disanju, obzirom da je ovo najuži dio grkljana. Hripanje je osobito čujno pri udisaju, a praćeno je uvlačenjem juguluma, supraklavikularnih jama, interkostalnih prostora i epigastrija. Kad se lumen dišnog puta jako suzi, pojavi se i respiratorna insuficijencija. Čine oko 5% svih karcinoma grkljana, u pravilu su unilateralni i ulcerozni, regionalne se metastaze pojavljuju u oko 30% tumora.

Dijagnostika tumora grkljana obuhvaća laboratorijsku obradu, ORL status, palpaciju vrata, UZV vrata, citološku punkciju čvorova na vratu, panendoskopiju, ekscizijsku biopsiju tumora, RTG pluća i MSCT vrata.

Nakon što je postavljena dijagnoza bolesti, određuje se stadij bolesti. Međunarodno prihvatljiv kriterij za utvrđivanje stadija karcinoma je TNM sustav (5).

U liječenju tumora grkljana primjenjuju se kirurško liječenje (parcijalna ili totalna laringektomija), radioterapija, kemoterapija, kao palijativno liječenje ili kombinacija ovih vrsta liječenja.

Petogodišnje preživljenje kod karcinoma supraglotisa je oko 60%, zbog kasnog dijagnosticiranja i ranijeg i lakšeg metastaziranja u limfne čvorove vrata, ali i širenja izvan granica grkljana na korijen jezika i hipofarinks. Kod karcinoma glotisa preživljenje je oko 80%, zbog ranog dijagnosticiranja, ali i zbog toga što područje glasnica ima najoskudnije limfne i krvne žile, pa se tumori tog područja sporije šire u okolinu. Tumori subglotičkog prostora nemaju dobru prognozu, jer je tumor u vrijeme postavljanja dijagnoze obično velik, a ima tendenciju širenja u donje vratne i paratrahealne limfne čvorove. Metastaze tumora grkljana pojavljuju se najčešće u limfnim čvorovima koji su smješteni uz jugularnu venu, ali mogu se pojaviti i u ostalim limfnim čvorovima vrata. Zahvaćeni limfni čvorovi povećani su i tvrde konzistencije. Udaljene metastaze su rijetke, ali mogu se pojaviti u plućima, jetri, kostima, pa i u mozgu (1,6,7,8,9).

### **1.2.2. HISTOPATOLOGIJA KARCINOMA GRKLJANA**

Više od 90% svih malignih tumora grkljana su planocelularni karcinomi, a ostatak čine sekretorni tumori (neuroendokrini i tumori malih žlijezda slinovnica), tumori vezivnog tkiva (hondrosarkom, leiomiosarkom, rabdomiosarkom), limfoproliferativni tumori, melanom i metastatski tumori.

Postoje dva tipa karcinoma grkljana, od kojih jedan nastaje direktnim prijelazom od normalnog tkiva u invazivni karcinom, a drugi nastaje preko karcinoma in situ (10). Karcinoma in situ grkljana priznat je kao posebni entitet. U većini slučajeva, on se vidi kao periferni (vanjski) rub invazivnog karcinoma te se smatra da 75% invazivnih karcinoma ima in situ komponentu (11). Počinje u bazalnom sloju višeslojnog pločastog epitela i karakteriziran je staničnom atipijom, povećanim hiperkromatskim jezgrama, nezrelom keratinizacijom i atipičnim mitozama (12). Osim toga razvijena je i akantozna intrapapilarnih produžetaka epitela. Stanice proliferiraju s jedne strane prema površinskim slojevima, ali i u okolinu žarišta. Za razliku od invazivnog karcinoma, bitna osobina karcinoma in situ je što on ne probija bazalnu membranu, tj. ona ostaje intaktna (10). Planocelularni karcinom nastaje od površinskog višeslojnog pločastog epitela glasnice ili epiglotisa, ali i od respiratornog epitela nakon njegove metaplazije. Debljina zahvaćenog epitela obično je povećana (akantozna) kao posljedica hiperplazije bazalnog sloja ili češće stratuma spinozuma. Uz to stanice površinskog sloja 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 stanica održane poput malih tankih točkica u stanici. Relativni omjer akantozе i keratinizacije jako se razlikuju. Često bazalni sloj pokazuje rast u dubinu u subepitelijalni sloj zadržavajući pri tom bazalnu laminu intaktnu (11).

Makroskopski karcinom grkljana može imati tri oblika: proliferativni s papilarnim ili bradavičastim tvorevinama, infiltrativni, koji se širi najčešće na mjestu gdje je sluznica debela, pri čemu sluznica iznad tumora može dugo vremena biti bez ulceracije, te ulcerativni koji može nastati na jednom od prethodnih ili takav može biti od samog početka (13). Većina karcinoma grkljana mjeri u promjeru 1 do 4 cm (11).

### **1.3. PROGNOŠTIČKI ČIMBENICI KARCINOMA GRKLJANA**

Prognoštički čimbenici dijele se na "klasične" (veličina tumora, zahvaćenost limfnih čvorova, udaljene metastaze (TNM), lokalizacija tumora i histološki stupanj diferencijacije), te "suvremene" u koje ubrajamo proliferacijske markere (PCNA, Ki-67), regulatorne bjelančevine staničnog ciklusa (p16, p21, ciklini), onkogene (p 53), regulatorne bjelančevine apoptoze (bcl-2/bax), proteinaze (katepsin D), čimbenike koji reguliraju angiogenezu (vaskularno-endotelni čimbenik rasta -VEGF), AgNOR, sadržaj DNK i druge (14). Iako, za sada, TNM klasifikacija i histološki gradus tumora imaju najveću vrijednost, sve se više rade



studije bioloških markera, kao dio „molekularne dijagnostike“ tumora. (15).

### **1.3.1. KLASIČNI PROGNOŠTIČKI ČIMBENICI**

#### **1.3.1.1 TNM KLASIFIKACIJA KARCINOMA GRKLJANA**

TNM sustav predstavlja jedinstveni kriterij za procjenu uznapredovalosti većine karcinoma. On podrazumijeva lokalnu proširenost tumora, prisustvo ili odsustvo metastaza u regionalnim limfnim čvorovima, odnosno udaljenih metastaza. Klinički TNM sustav nije tako precizan kao patološki, te služi za usporedbu rezultata radioterapije i kemoterapije. Nasuprot tome, patološki (p)TNM sustav je znatno korisniji u predviđanju prognoze maligne bolesti (4). Karcinom larinksa je podijeljen u odnosu na veličinu primarnog tumora (T), proširenost karcinomskih stanica u regionalne limfne čvorove (N) i udaljene metastaze (M) (16).

Primarni tumor (T)

TX Primarni tumor se ne može odrediti

TO Nema znakova primarnog tumora

Tis Carcinoma in situ

#### Klasifikacija supraglotičkih tumora:

T1 tumor zahvaća jednu podregiju supraglotisa

T2 tumor zahvaća sluznicu više od jedne podregije supraglotisa ili glotisa, ili regiju izvan supraglotisa (npr. sluznicu baze jezika, valekulu, medijalnu stijenu piriformnog sinusa), bez fiksacije grkljana

T3 tumor ograničen na grkljan s fiksacijom hemilarinksa i/ili zahvaća i neku od regija: postkrikoidna regija, preepiglotski prostor, paraglotski prostor, i/ili minimalno štitastu hrskavicu

T4a tumor prodire kroz štitastu hrskavicu ili zahvaća tkivo izvan grkljana (npr. traheju, meke strukture vrata, uključujući duboke vanjske jezične mišiće, prelaringealnu muskulaturu, štitastu žlijezdu ili jednjak)

T4b tumor zahvaća prevertebralni prostor, obuhvaća karotidnu arteriju ili medijastinalne strukture

#### Klasifikacija glotičkih tumora:

T1 tumor ograničen na glasnici/ama, može zahvaćati prednju ili stražnju komisuru uz normalnu pokretljivost

T1a tumor zahvaća jednu glasnicu

T1b tumor zahvaća obje glasnice

T2 tumor se širi na supraglotis i/ili subglotis ili sa smanjenom pokretljivošću glasnica

T3 tumor ograničen na larinks s fiksacijom glasnica

T4a tumor prodire kroz štitastu ili krikoidnu hrskavicu i/ili zahvaća tkivo izvan grkljana (npr. treheju, meke vratne strukture, uključujući duboke vanjske jezične mišiće, prelaringealnu muskulaturu, štitastu žlijezdu ili jednjak)

T4b tumor zahvaća prevertebralni prostor, obuhvaća karotidnu arteriju ili medijastinalne strukture

Klasifikacija subglotičkih tumora:

T1 tumor ograničen na subglotis

T2 tumor se širi na glasnicu(e) s normalnom ili smanjenom pokretljivošću glasnica

T3 tumor ograničen na larinks s fiksacijom glasnica

T4a tumor prodire kroz štitastu ili krikoidnu hrskavicu i/ili zahvaća tkivo izvan grkljana (npr. traheju, meke vratne strukture, uključujući duboke vanjske jezične mišiće, prelaringealnu muskulaturu, štitastu žlijezdu ili jednjak)

T4b tumor zahvaća prevertebralni prostor, obuhvaća karotidnu arteriju ili medijastinalne strukture

Transglotički tumori vrlo su rijetki (oko 5%), a protežu se kroz sve navedene prostore i ispod ventrikula

Regionalni limfni čvorovi na vratu (N)

NX Regionalni limfni čvorovi se ne mogu odrediti

NO Nema znakova zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova

N1 Metastaza je u 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 čvoru većem od 3 cm, ali ne većem od 6 cm u najvećem promjeru

N2b Metastaze su u više ipsilateralnih čvorova ne većih od 6 cm u najvećem promjeru

N2c Metastaze su bilateralne ili kontralateralne promjera ne većih od 6 cm

N3 Metastaze su u limfnom čvoru promjera većeg od 6 cm

Udaljene metastaze (M)

MX Udaljene metastaze se ne mogu odrediti

MO Nema znakova udaljenih metastaza

M1 Postoje znakovi udaljenih metastaza

### **1.3.1.2. TIPOVI STANIČNE DIFERENCIJACIJE KARCINOMA GRKLJANA**

Postoje tri glavna tipa planocelularnog karcinoma grkljana koji su određeni stupnjem stanične diferenciranosti. Ova podjela prihvaćena je od Svjetske zdravstvene organizacije, WHO (17).

Gradus 1 (Dobro diferencirani planocelularni karcinom)

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

## Gradus 2 (Umjereno diferencirani planocelularni karcinom)

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

## Gradus 3 (Slabo diferencirani planocelularni karcinom)

Karakteriziran je malobrojnim epitelnim perlama, gotovo da nema keratinizacije i intercelularnih mostića. Brojne su atipične mitoze, uz izrazitu polimorfiju stanica i jezgara.

### **1.3.2. „SUVREMENI“ PROGNOСТИČKI ČIMBENICI**

Suvremeni prognostički čimbenici daju nam informacije o tumoru koje se ne mogu dobiti rutinskim pregledom histopatološkog materijala. Odnose se na DNK ploidnost, proliferativnu aktivnost i amplifikaciju onkogeni. DNK ploidnost označava sadržaj DNK i određuje se „flow“ citometrijom ili image analizom. Proliferativna aktivnost odražava biološki potencijal i mogući odgovor tumora na terapiju. Može se mjeriti mitotskim indeksom, „flow“ citometrijom, image analizom, imunohistokemijski dokazom proliferacijskih markera, npr. PCNA (proliferating cell nuclear antigen) ili Ki67. Proto-onkogeni su geni koji normalno potiču stanični rast. Promjene u njihovoj strukturi pretvaraju ih u onkogene koji kodiraju proteine

promjenjene strukture ili količine. U planocelularnom karcinomu larinksa opažene su razne kromosomske alteracije (npr. gubitak 9p21, 11q13, 17p13, 3p itd.). Neke od tih promjena povezane su s premalignim lezijama, dok se druge otkrivaju u uznapredovaloj fazi bolesti. Najčešće i najvažnije promjene u karcinogenezi karcinoma larinksa obuhvaćaju p53, ciklin D1, p16 i EGFR. Prekomjerna ekspresija p53 proteina, koji ima biološku ulogu u apoptozi, smatra se neovisnim prediktivnim faktorom za pojavu relapsa bolesti, ali i odgovora na radioterapiju (18,19). U planocelularnim karcinomima larinksa, ekspresija p53 je sličnija onoj kod karcinoma pluća, nego kod ostalih planocelularnih karcinoma glave i vrata (20). Ekspresija ciklina D1 često se nađe rano u tijeku bolesti, kao marker agresivnosti s utjecajem na ukupno preživljenje. U tumorskim stanicama često se detektiraju metaloproteaze, hijaluronidaze i katepsin D, kao molekule odgovorne za degradaciju ekstracelularnog matriksa i povezano s tim, invazijom i stvaranjem metastaza. Humani papilloma virus (HPV) može biti uključen u karcinogenezu inhibiranjem onkosupresorskih gena, npr. p53 i pRb/RB1. Postoje istraživanja o djelovanju S100A2 onkosupresora, ciklo-oksigenaze tipa 2 i galektina-3 u staničnim interakcijama i povezano s time utjecaja na rast i metastaziranje tumora. Za sada se ekspresija EGFR smatra najpouzdanijim prognostičkim molekularnim markerom za procjenu preživljenja bez relapsa bolesti i metastaza, zbog njegove neovisnosti o poduzetoj terapiji (operacija, radio- ili kemoterapija) (21-26).

#### **1.4. INTRATUMORSKA HETEROGENOST**

Intratumorska heterogenost definira se kao postojanje višestrukih abnormalnih staničnih linija ili postojanje diploidnog i aneuploidnog sadržaja DNK u različitim dijelovima jednog tumora (14). Iako je intratumorska heterogenost višestruko potvrđena (za karcinome pluća, dojke, jajnika, prostate i bubrežni karcinom), u većini istraživanja tumor se promatra kao homogen model (27-40). Brojni citogenetski dokazi ukazuju da je karcinom genetska bolest, da je većina karcinoma monoklonalna na početku razvoja i da su tumorske stanice genetski nestabilnije od zdravih stanica, a ta nestabilnost može biti nasljedna, stečena ili kombinirana tijekom razvoja tumora. Maligni tumori genetski su heterogeni i sadrže multiple subpopulacije stanica koje se razlikuju po biološkom potencijalu i karakteristikama, koje mogu biti izražene u kariotipu, produkciji hormona, broju i izraženosti receptora na površini stanične membrane, osjetljivosti na citotoksične lijekove, brzini rasta in vitro, invazivnosti i sposobnosti metastaziranja. Neoplastička transformacija stanica i tumorska progresija je proces koji se događa u više koraka, a pod utjecajem je nasljednih ili stečenih genetskih defekata, u prvom redu translokacija, delecija i inverzija koje dovode do aktivacije proto-onkogeni, odnosno do funkcionalnog gubitka određenih tumor-supresorskih gena. Monoklonalnost je karakteristična za ranu fazu karcinoma, a u daljnjem razvoju, većina tumora postaje heterogena, što dovodi do tumorske progresije. Ona se definira kao prijelaz primarno



homogene populacije tumorskih stanica u heterogeni maligni tumor. U ovom procesu mogu se prepoznati dva osnovna tipa kromosomskih anomalija. Primarni defekt kromosoma, koji se obično manifestira kroz strukturne promjene gena, odgovoran je za neoplastičku transformaciju, dok je sekundarni, koji obuhvaća strukturne i numeričke promjene gena, odgovoran za tumorsku heterogenost, odnosno tumorsku progresiju i metastaziranje (41-43). Ovakav je model možda najbolje istražen na primjeru kronične mijeloične leukemije, kod koje primarni genetski defekt predstavlja translokacija između kromosoma 9 i 22. Tijekom blastne krize, javljaju se dodatni citogenetski defekti, kao npr. ekstra kopija Philadelphia kromosoma, plus kromosom 8 ili izokromosom 17 (44). Isto tako, kod Burkittovog limfoma primarni citogenetski defekt je recipročna translokacija između kromosoma 8 i 14. Sekundarni kromosomski defekti uključuju dodatne kopije kromosoma 8 i 9, deleciju dugog kraka kromosoma 6, izokromosom 17q i multiple kopije kromosoma 7. Ovakve primarne kromosomske aberacije do sada su bile poznate za ograničen broj solidnih tumora, međutim, u novije se vrijeme broj tumora kod kojih su poznate, značajno povećao. Tako je sada poznato da su kod renalnog karcinoma nađene anomalije na 3. kromosomu, kod Wilmsovog tumora zahvaćen je kromosom 11, kod retinoblastoma kromosom 13, kao dio konstitucionalnih kromosomskih anomalija.

Kao mogući mehanizam tumorske heterogenosti spominje se genetska nestabilnost, u povećanom stupnju prisutna kod nekih sindroma (Bloomov sindrom, Fanconijeva anemija, ataxia teleangiectasia, xeroderma

pigmentosum). Genetsku nestabilnost, osim nasljednih, mogu izazvati i stečeni defekti, te ekstracelularni čimbenici. Stečeni defekti kromosoma nastaju pod utjecajem toksičnih tvari koje se oslobađaju iz nekrotičnih tumorskih stanica, slobodnih radikala koje proizvode makrofazi ili radikala kisika iz NK stanica. Ekstracelularni čimbenici obuhvaćaju različite biološke, fizikalne i kemijske agense, npr. onkogene viruse, rentgensko i UV zračenje, te kemoterapeutike (45). Tumorska heterogenost važna je, jer može biti jedan od čimbenika rezistencije tumora na liječenje, te i zbog toga predstavlja istraživački izazov.

#### **1.4.1. HETEROGENOST PLANOCELULARNOG KARCINOMA GRKLJANA**

Istraživanja heterogenosti planocelularnog karcinoma grkljana nisu česta. Ona koja su rađena (41-49) koristila su kvantitativna mjerenja DNK temeljena na image analizi i imunohistokemijskoj evaluaciji proliferacijskih markera (Ki67, PCNA-proliferating cell nuclear antigen) i pokazuju značajne razlike u proliferaciji i staničnoj diferencijaciji u različitim dijelovima tumora. Vjerojatno je da tumorske regije s povećanim stupnjem proliferacije određuju mjesto tumorskog recidiva. Isto tako, aktivnost stanične proliferacije pokazala je statistički značajnu povezanost s prognozom u 2077 slučajeva karcinoma grkljana (47), na način da je prognoza bila lošija u tumora visoke proliferativne aktivnosti, iako je

visoki scor Ki67 bio povezan s dobrim odgovorom na radioterapiju. Niska DNK-SPF (S-phase fraction) predviđjela je relaps bolesti u 23 glotička karcinoma koja su imala postignutu kompletnu lokalnu remisiju nakon kurativne radioterapije (48). Istraživanje Ladike-Davidović i sur. (50) proučavalo je heterogenost sadržaja DNK, mjenog „flow“ citometrijom u 92 slučaja planocelularnog karcinoma larinksa, koji je podijeljen na 3 zone: centar tumora, transformacijska zona i invazivni rub. Multivarijatnom analizom je pokazano da su dob bolesnika, status limfnih čvorova, proliferativni indeks u transformacijskom rubu i DNK indeks u centru tumora značajni prediktori preživljenja. Podjelom tumora na navedena područja reduciran je utjecaj intratumorske heterogenosti na prognostičke faktore.

Ovakva, relativno rijetka istraživanja, pokazuju da intratumorska heterogenost karcinoma larinksa očito postoji, međutim nedovoljni su zaključci njene povezanosti s prognostičkim parametrima. Jedan od razloga za tu činjenicu je da se postojanje različitih staničnih populacija u jednom tumoru teško može odrediti rutinskim morfološkim pregledom, odnosno za tu analizu potrebne su naprednije dijagnostičke tehnike. Ono što se na rutinskim materijalima može vidjeti je da se tumor sastoji od područja dobro diferenciranih stanica s niskom mitotskom aktivnošću i područja sa stanicama koje imaju visoku proliferativnu aktivnost i slabu diferencijaciju. Pretpostavlja se da upravo ta područja određuju prognozu pacijenta, pojavom recidiva (41). Obzirom da istraživanja značajnosti prognostičkih parametara u literaturi daju različite rezultate, pretpostavka

je da bi intratumorska heterogenost tumora mogla dovesti do navedene prognostičke nekonzistentnosti. Iz navedenog proizlazi ideja podjele tumora na 3 različite zone (centar, transformacijska zona i invazivni rub), u cilju obrade područja sličnijih bioloških karakteristika.

## **1.5. KEMOKINI**

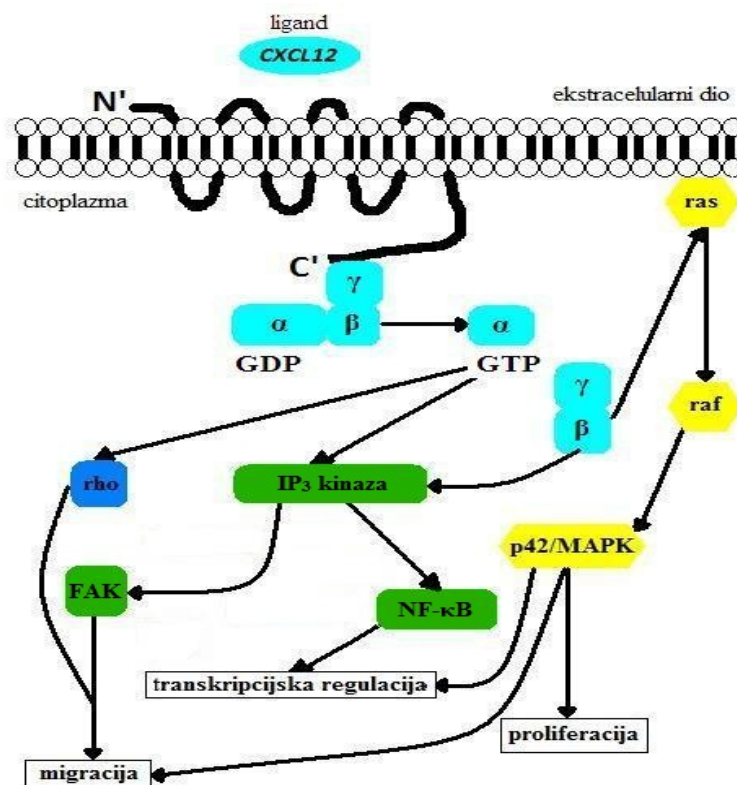
Kemokini ili kemotaktički citokini su obitelj proteina, koji se, prema smještaju cisteinske amonokiseline na NH<sub>2</sub> kraju lanca dijele u 3 skupine: CC, CXC i CX<sub>3</sub>. CXC razred kemokina regulira kretanje neutrofila i T stanica, CC grupa kemokina regulira T i B stanice, monocite i dendritičke stanice, dok CX<sub>3</sub> kemokini djeluju kao adhezijske molekule ili topivi kemoatraktanti (51). Za kemokine se dugo zna da su medijatori upalnog odgovora, ali i da reguliraju druge biološke procese, uključujući angiogenezu, embrionalnu implantaciju i migraciju matičnih stanica tijekom embrionalnog razvoja (52-55). Danas je jasno da kemokini ne reguliraju samo migraciju stanica imunološkog sustava, već i migraciju i proliferaciju ostalih tipova stanica. Najnovija in vitro i in vivo istraživanja pokazuju da neki upalni kemokini, uključujući CCL2, CCL5, CXCL1 i CXCL12 imaju važnu ulogu u progresiji malignih tumora. Kemokini djeluju preko sedam transmembranskih G receptora na N kraju, što rezultira fosforilacijom serin/treonin ostatka na C-kraju, konformacijskom promjenom receptora i aktivacijom heterotrimeričkog G kompleksa vezanog za receptorsku intracelularnu domenu, što u konačnici regulira

stanične procese kao što su proliferacija, pokretljivost i ekspresija gena za matriks metaloproteinazu i citokine. Također je poznato da kemokinski receptori aktiviraju signalne puteve nezavisne od G proteina, uključujući p38MAPK (56) i JAK/Stat (57), koji reguliraju stanične procese migracije i transkripcije gena. Sposobnost različitih kemokina da se vežu na isti receptor i sposobnost pojedinog kemokina da se veže na različite receptore stvara mogućnost redundancije signala. In vitro studije pokazuju da kemokini stimuliraju migraciju preko zajedničkih signalnih puteva, ali isto tako i preko, za receptor/ligand, jedinstveni put. Ligandi kemokina imaju različit afinitet vezanja na isti receptor. Na primjer, kemokini imaju veći afinitet za CXCR2, u odnosu na CXCR1 (58). Isto tako, različiti ligandi koji se vežu na isti receptor pokazuju različiti biološki učinak na ciljnim stanicama (59). Svrha multiplog ligand/receptor vezanja ostaje predmet istraživanja, a dosadašnji radovi pokazuju da jedinstvena uloga svakog kemokin/receptor para služi kao mehanizam regulacije staničnog odgovora na kemokinske signale. Kontinuirano kemokinsko signaliziranje dovodi do neosjetljivosti receptora, odnosno „down” regulacije kemokinskog signala. Isto tako, receptori D6 i Duffy koji vežu multiple ligande ne aktiviraju signalne puteve, već vjerojatno služe kao dodatni regulatorni mehanizam u „down” regulaciji kemokinskog signala. U organizmu su ti mehanizmi od vitalne važnosti za kontrolu imunološkog odgovora tijekom procesa upale i postizanja normalne tkivne homeostaze (60,61). Danas je poznato više od 50 kemokina i 18 kemokinskih receptora (62).

### **1.5.1. CXCR4 (CXC kemokinski receptor 4)**

Ovaj kemokinski receptor za sada je jedini receptor liganda CXCL12. Prve studije o njemu bile su usmjerene na njegovu povezanost s HIV infekcijom. Otkriće da CXCR4 funkcionira kao koreceptor za ulazak T-tropičkog HIV virusa u CD4+ T stanice potaklo je istraživanja funkcije ovog kemokina. Danas se zna da stanice barem 23 različite vrste humanih tumora epitelnog, mezenhimalnog i hematopoetskog ishodišta izražavaju CXCR4, premda nisu sve stanice primarnog tumora pozitivne (63). U karcinomu ovarija i karcinomu pluća tipa ne-malih stanica, samo subpopulacija tumorskih stanica izražava ovaj receptor (64,65). Isto tako, ekspresija ovog kemokina niska je ili odsutna u normalnom epitelu dojke, ovarija ili prostate (64,66,67), dok je prisutna u normalnom epitelu crijeva (68). Smatra se da vascular endothelial growth factor (VEGF) ima ulogu autokrine aktivacije ekspresije CXCR4 u karcinomu dojke (69). U karcinomu bubrega mehanizam regulacije CXCR4 uključuje mutaciju von Hippel-Lindau tumor supresorskog gena (70), a može biti i pod utjecajem faktora potaknutog hipoksijom (HIF-Hypoxia inducible factor). Isto tako, fuzija gena može biti odgovorna za ekspresiju ovog kemokina, što se događa kod embrionalnog rabdomiosarkoma (71). Osim kod navedenih tumora, ekspresija CXCR4 je dokazana u kolorektalnom karcinomu, karcinomu prostate, melanomu, tumorima mozga, hematološkim malignim bolestima, npr. kroničnoj limfatičnoj leukemiji, multiplom

mijelomu i akutnim leukemijama (72). Rijetka su istraživanja o izražaju CXCR4 u karcinomima larinksa. Za sada se čini da je on pozitivan u karcinomskim stanicama i da njegova povećana ekspresija korelira s udaljenim i metastazama u limfne čvorove (73).



**Slika 1: Signalna transdukcija ovisna o G proteinu preko kemoreceptora: model CXCR4 signaliziranja.**

### **1.5.2. CXCL12 (kemokinski ligand 12)**

CXCL12, zvan još i stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) za sada je jedini poznati ligand kemokina CXCR4. CXCL12 u organizmu normalno izlučuju stromalne stanice srži, koje stvaraju celularne niše u kojima se zadržavaju hematopoetske matične stanice tijekom rasta i diferencijacije. CXCL12 je neophodan za normalan razvoj B stanica, zadržavajući ih u uskom kontaktu sa zaštitnim stromalnim stanicama u hematopoetskom mikrookolišu (74). Osim toga, CXCL12 djeluje i kao parakrini čimbenik za B limfocite i ostale stanične tipove. Najnovije studije su pokazale da CXCL12 podržava preživljavanje i rast različitih normalnih i malignih staničnih tipova, uključujući hematopoetske progenitorske stanice, zametne stanice, stanice leukemije i karcinoma dojke. Važna funkcija osovine CXCR4/CXCL12 je povezana sa cijeljenjem tkiva i upalnim odgovorom. Navedeni kemokini sudjeluju u transportu limfocita između krvi i sekundarnih limfatičnih organa. U interakciji su s vaskularnim endotelom preko adhezijskih molekula, selektina i integrina. Kemokini na endotelu aktiviraju kemokinske receptore na stanicama, što potiče aktivaciju integrina. To dovodi do adhezije stanica i transendotelijalne migracije u tkiva gdje kemokinski gradijent zadržava dotične stanice. Ovaj proces je neophodan za normalan razvoj organizma, odnosno organizaciju i funkciju imonološkog sustava. Istraživanja su pokazala da na kemokinski gradijent ne odgovaraju samo leukociti, već, na sličan način, i tumorske



stanice. Donedavno se smatralo da se metastatske stanice koje izražavaju CXCR4 mogu širiti na mnoga mjesta u tijelu, ali se nastavljaju razvijati samo na mjestima s visokom ekspresijom CXCL12. Međutim, sada se zna da se CXCL12 može detektirati i u primarnom tumoru, što je dovelo u sumnju gore navedenu hipotezu. Tumori s potvrđenom ekspresijom CXCL12 su folikularni limfom, karcinom pankreasa, karcinom ovarija, gliom i astroцитom. Prema analogiji uloge CXCL12 u koštanoj srži, visoka koncentracija CXCL12 u primarnom tumoru, mogla bi zadržavati tumorske stanice in situ, odnosno ograničiti im diseminaciju (75,76). Geminder i sur. (77) proučavali su interakciju CXCR4/CXCL12 u slučaju neuroblastoma. Stanice neuroblastoma ne izražavaju samo CXCR4, već i CXCL12, koji djeluje kao „down“ regulator za CXCR4, autokrino (ako stanice koje ga izlučuju izražavaju i njegov receptor) ili parakrino (preko susjednih stanica). Smanjenje ekspresije CXCR4 pod utjecajem CXCL12 može značiti da se i u koštanoj srži događa sličan proces. Koštana srž je ključno mjesto proizvodnje CXCL12 i njegova koncentracija je u tom području visoka. Prema tome, kad tumorske stanice stignu do srži, visoka koncentracija CXCL12 smanjuje produkciju CXCR4, time prevenirajući migraciju tumorskih stanica na neko drugo mjesto. Očito je kemokinski gradijent vrlo važan za proces metastaziranja. To se odnosi na gradijent u primarnom tumoru, kao i na mjestu metastaziranja. CXCL12 je, kao i CXCR4 slabo istražen u karcinomima larinksa. U jednom istraživanju (73), na 30 tkivnih uzoraka, pokazao se pozitivnim u 40% stanica primarnog tumora, ali bez korelacije sa metastazama u limfne čvorove i udaljenim

metastazama. Pozitivnost tumorskih stanica potvrđuje autokrini efekt opažen i kod nekih drugih tipova karcinoma, a u suprotnosti je s negativnim tumorskim stanicama u oralnom planocelularnom karcinomu.

## **2. HIPOTEZA I CILJEVI RADA**

### **2.1. HIPOTEZA**

Obzirom da su se citokin CXCR4 i njegov ligand CXCL12 pokazali kao prognostički pokazatelji za različite vrste karcinoma, a njihov značaj kod karcinoma grkljana još nije dovoljno istražen, pretpostavka je da i u ovom karcinomu mogu imati prognostički značaj. Također je pretpostavka da je tumor heterogen model koji u različitim zonama pokazuje različite biološke karakteristike, te je sukladno tome i ekspresija navedenih citokina različita u tri različite tumorske regije (transformacijska zona, centar tumora i invazivni rub).

### **2.2. CILJEVI RADA**

1. Utvrditi postoji li ekspresija citokina CXCR4 i CXCL12 u planocelularnim karcinomima larinksa i ako postoji, da li je heterogena u tri različite regije tumora (centar tumora, transformacijska zona i invazivni rub)
2. Odrediti postoji li prognostička vrijednost ekspresije citokina CXCR4 i CXCL12 i njihov međudnos u planocelularnim karcinomima grkljana
3. Odrediti da li intratumorska heterogenost navedenih citokina korelira s klasičnim prognostičkim čimbenicima (TNM klasifikacija, histološki gradus i lokalizacija tumora)

## **3. BOLESNICI I METODE ISTRAŽIVANJA**

### 3.1. BOLESNICI

Istraživanje je obuhvatilo 90 bolesnika, u dobi od 23 do 88 godina, srednje dobi 57 godina (tablica 1).

**Tablica 1. Prikaz dobi bolesnika.**

	N	Aritmetička sredina	SD	medijan	minimum	maksimum
Dob	90	56	9,38	58	23	88

Većina pacijenata (92%) bila je muškog roda, dok je 7 bilo ženskog roda (8%) (tablica 2).

**Tablica 2. Prikaz spola bolesnika.**

Spol	N = 90	%
Muški	83	92
Ženski	7	8

Po lokalizaciji većina tumora bila je smještena u glotisu, a najmanje u subglotičnom području (tablica 3).

**Tablica 3. Prikaz tumora po lokalizaciji.**

Lokalizacija	N = 90	%
Subglotis	8	9
Glotis	32	35
Transglotis	28	31
Supraglotis	22	25

Tumori su bili podjednako raspoređeni po veličini, a u 8% slučajeva, veličina tumora nije bila poznata (tablica 4).

**Tablica 4. Prikaz tumora po veličini.**

T	N = 90	%
T1	26	29
T2	14	16
T3	20	22
T4	23	25
TX	7	8

U trenutku postavljanja dijagnoze 37 (41%) tumora nije metastaziralo u regionalne limfne čvorove, dok su kod 40 (43%) tumora bile dokazane regionalne metastaze. Za 13 (14%) bolesnika status limfnih čvorova nije bio poznat (tablica 5).

**Tablica 5. Prikaz statusa limfnih čvorova.**

N	N = 90	%
N0	37	41
N1	8	9
N2	30	33
N3	2	2
NX	13	15

Četiri bolesnika u trenutku postavljanja dijagnoze imalo je udaljene metastaze (tablica 6).

**Tablica 6. Prikaz bolesnika s udaljenim metastazama.**

M	N=90	%
MO	86	96
M1	4	4

Većina tumora (47%) bila je histološki gradus 2, zatim slijedi gradus 3 (34%) te gradus 1 (19%) (tablica 7).

**Tablica 7. Prikaz tumora prema gradusu.**

G	N = 90	%
G1	17	19
G2	42	47
G3	31	34

Bolesnici su bili operirani na Klinici za bolesti uha, nosa i grla i kirurgiju glave i vrata KBC Zagreb u periodu od 2000-2005., a patohistološka dijagnoza planocelularnog karcinoma larinksa postavljena je na Kliničkom zavodu za patologiju KBC-a Zagreb. Svi bolesnici podvrgnuti su totalnoj laringektomiji, a niti kod jednog nije provedena preoperativna terapija zračenjem ili citostaticima. 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 (51%), a cenzoriranih 28 (31%). Za 16 bolesnika (18%) podaci nisu bili poznati. Istraživanje i obrada podataka obavljali su se prema načelima medicinske etike prihvaćenim u Helsinškoj deklaraciji Svjetske zdravstvene organizacije 1964. godine.

### **3.2. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA**

U istraživanju su korišteni uzorci tumorskog tkiva planocelularnog karcinoma grkljana rutinski fiksirani u 10% formalinu, dehidrirani u uzlaznom nizu alkohola i uklopljeni u parafin. Za imunohistokemijsko bojanje, iz parafinskih blokova rezani su rezovi debljine 3-4 mikrometra. Imunohistokemijska tehnika je tehnika za određivanje staničnih ili sastavnih dijelova tkiva pomoću reakcije antigena i protutijela. Mjesto vezivanja protutijela se identificira ili direktnim vezivanjem protutijela ili se koristi metoda sekundarnog vezivanja. Antigeni su molekule proteina, ugljikohidrata ili lipida koje imaju jedno ili više veznih mjesta za protutijelo. Vezna mjesta su visoko specifične topografske 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 vežu se kombinacijom vodikovih, elektrostatskih i van der Waalsovih sila. Indirektna imunohistokemijska metoda podrazumijeva 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) 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 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. Bojanje 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 proteolitičkim enzimima 0,1% tnom pronazom, ali se može raditi i tripsinom i pepsinom. Izvodi se na temperaturi od 37°C. Iz parafinskih blokova rezani su rezovi debljine 3-4 mikrometra, 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 silanizirana stakla.

Za imunohistokemijsko bojanje koristila su se monoklonalna protutijela (MAB 172 i MAB 350) firme R&D systems, USA. Za detekciju ekspresije koristila se indirektna ABC tehnika (LSAB+, Dako, Glostrup, Danska). Na gotovim preparatima određivao se, semikvantitativnom metodom,



intenzitet reakcije (0-3, pri čemu je 0 bez reakcije, a 3 najjača reakcija) citokina CXCR4 i CXCL12 u tri različite tumorske regije: centar tumora, transformacijska zona i invazivni rub. Transformacijska zona tumora predstavlja područje tumora u kojem zdravi epitel prelazi u tumorski, a invazivni rub je rub infiltracije tumora. Imunohistokemijsko bojanje očitavalo se na povećanju 40x, a dijelovi tumora u kojem se očitavanje obavljalo bili su udaljeni najmanje jedno vidno polje na povećanju 40x. Reakcija za CXCR4 očitavala se posebno za jezgru, a posebno za citoplazmu. Kao unutarnja pozitivna kontrola koristila se pozitivnost bojanja makrofaga, a kao unutarnja negativna kontrola, negativnost bojanja normalnog epitela.

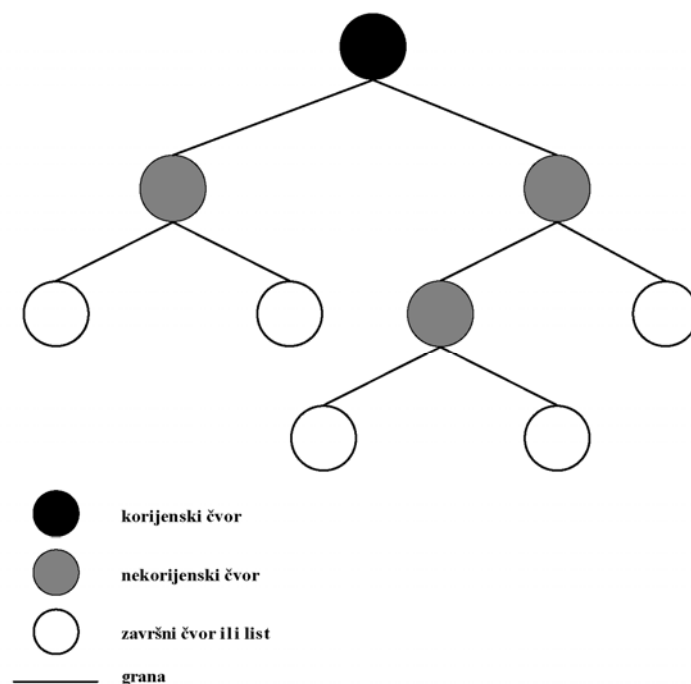
### **3.3. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA**

Deskriptivna statistika obavljena je uporabom programa GraphPad Prism for Windows verzija 5.03. Podaci dobiveni prebrojavanjem prikazani su

kao brojevi, odnosno postotci, a analizirani su uporabom  $\chi^2$ -testa. Podaci dobiveni mjerenjem prikazani su kao aritmetička sredina, standardna devijacija, minimum, medijan i maksimum. Svi primjenjeni statistički testovi bili su dvosmjerni. P vrijednosti manje ili jednake 0,05 smatrane su statistički signifikantnim. Multivarijatna analiza međuodnosa imunohistokemijskih parametara s preživljenjem obavljena je uporabom rpart programa unutar analitičkog sustava R.

Rekurzivno particioniranje (RP) je metoda umjetne inteligencije koja se koristi za izgradnju klasifikacijskih i regresijskih modela. Može se koristiti u eksploratorne, deskriptivne i prediktivne svrhe. RP je koristan postupak za rješavanje cijelog niza problema, ponajviše zbog sposobnosti opisa kompleksnih i nelinearnih interakcija. Zbog toga se sve više koristi u genetskim, epidemiološkim i medicinskim istraživanjima. 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 log-normal regresije. RP generira skup pravila i konstruira stablo odluke. Stablo odluke posjeduje korijenski čvor (eng. root node), nekorijenske čvorove (eng. non-root nodes) i završne čvorove ili listove (eng. leaf nodes). Čvorovi su međusobno povezani granama (eng. branches). Stabla odluke konstruirana uporabom RP-a nazivaju se i binarna stabla odluke jer od svakog korijenskog i nekorijenskog čvora polaze dvije grane koje vode do dva različita čvora. Završni čvorovi

predstavljaju izdvojene podskupine, dok svaki nekorijenski čvor sadrži pravilo za razdvajanje zvano i pravilo odluke (eng. splitting or decision rule). Stablo odluke se izgrađuje rekurzivnim (ponavljanim) postupkom razdvajanja podataka, počevši od viših razina prema nižim razinama stabla. Pravila razdvajanja u svakom čvoru definiraju detalje razdvajanja. Pravilo se sastoji od iskaza koji evaluira svaki primjer i uspoređuje ga s граниčnom vrijednošću. 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.



Kod konstrukcije stabla odluke moguće je nastaviti s razdvajanjem sve dok se ne dobije vrlo kompleksno stablo koje savršeno klasificira inicijalni skup podataka (zvan još i trenirajući skup). Takva stabla u pravilu nisu optimalna, jer su mnoga od pravila razdvajanja specifična samo za

trenirajući skup i ne mogu se generalizirati na druge skupove podataka. Ova je pojava poznata kao pretjerana uvježbanost (eng. over-fitting), i obično se rješava korištenjem manje kompleksnih stabala koja se dobivaju postupkom zvanim podrezivanje (eng. pruning). Podrezivanje uključuje različite postupke, uključivši korištenje parametra kompleksnosti koji kontrolira, kao što mu i samo ime kaže, kompleksnost stabla odluke.

Iz navedenog proizlaze dva osnovna problema kod svih algoritama RP-a:

1. odabir najboljeg pravila za razdvajanje u čvorovima koji nisu završni čvorovi (listovi)
2. upravljanje kompleksnošću stabla odluke, što obuhvaća odluku kada prestati s razdvajanjem, te kako odlučiti da li je konstruirano stablo odluke ujedno i najbolje stablo odluke.

Postoji više algoritama rekurzivnog particioniranja, a razlikuju se u metodologiji kojom određuju najbolju varijablu za razdvajanje, točku razdvajanja i najbolje stablo odluke. Za analizu u izloženoj studiji odabran je rpart algoritam koji se izrađuje dvostupanjskim postupkom:

1. U prvom koraku koriste se sve instance (ispitanici). Algoritam testira sve moguće točke razdvajanja za sve moguće varijable, te se potom pronade varijabla koja najbolje razdvaja ispitanike u dvije podskupine. Kriterij razdvajanja je pronaći podskupine koje su unutar sebe što homogenije, pri čemu rpart koristi takozvani Gini indeks kao mjeru homogenosti. Podskupine se razdvoje, a potom se postupak ponavlja odvojeno za svaku podskupinu sve dok nove podskupine ne dosegnu minimalnu veličinu, ili kada nema daljnjeg unapređenja modela. Ovakav

korak u izgradnji stabla zove se opetovano razdvajanje ili rekurzivno particioniranje, a rpart je skraćenica ovog naziva.

2. Drugi korak je postupak zvan ukrižana validacija (cross-validation) koji smanjuje kompleksnost modela.

Specifičnost rpart algoritma je 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. Vrijednosti prikazane u završnim čvorovima (lišću) jest omjer hazarda (eng. hazard ratio) koji proizlazi iz Coxove regresije.

Krivulja preživljenja prikazuje kumulativno preživljenje kao funkciju vremena. Nagib ili derivativ krivulje preživljenja jest učestalost umiranja ili recidiva bolesti u kratkom vremenskom intervalu. Učestalost umiranja ili recidiva nazivamo još i hazard. Na primjer, ako 10% oboljelih od određene vrste maligne neoplazme umre tijekom godine, tada je hazard 10% po godini. Kad uspoređuju dvije krivulje preživljenja statističari često polaze od pretpostavke da je omjer hazard funkcija konstantan tijekom vremena. Na primjer, hazard kod bolesnika koji primaju novu antitumorsku terapiju može biti svega polovica hazarda u odnosu na kontrolne bolesnike koji primaju klasičnu terapiju. Učestalost umiranja može se mijenjati tijekom studije, ali u svakom pojedinačnom trenutku rizik umiranja kod skupine koja prima novu terapiju je svega polovica rizika kod kontrolnih bolesnika. Drugi način da iskažemo ovu činjenicu jest

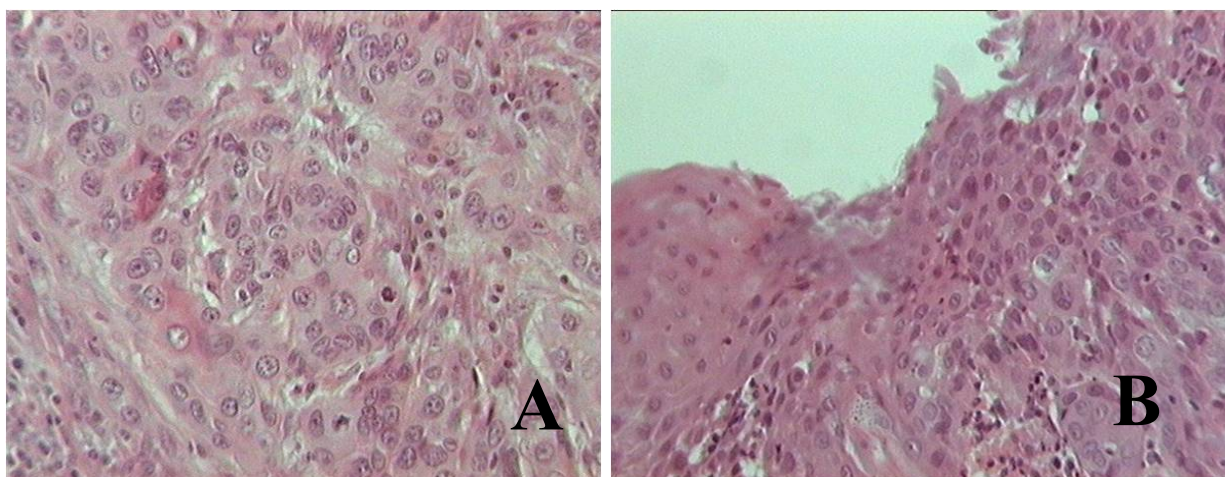
da su dvije hazard funkcije proporcionalne jedna prema drugoj. U većini kliničkih studija ova je pretpostavka ispunjiva.

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.

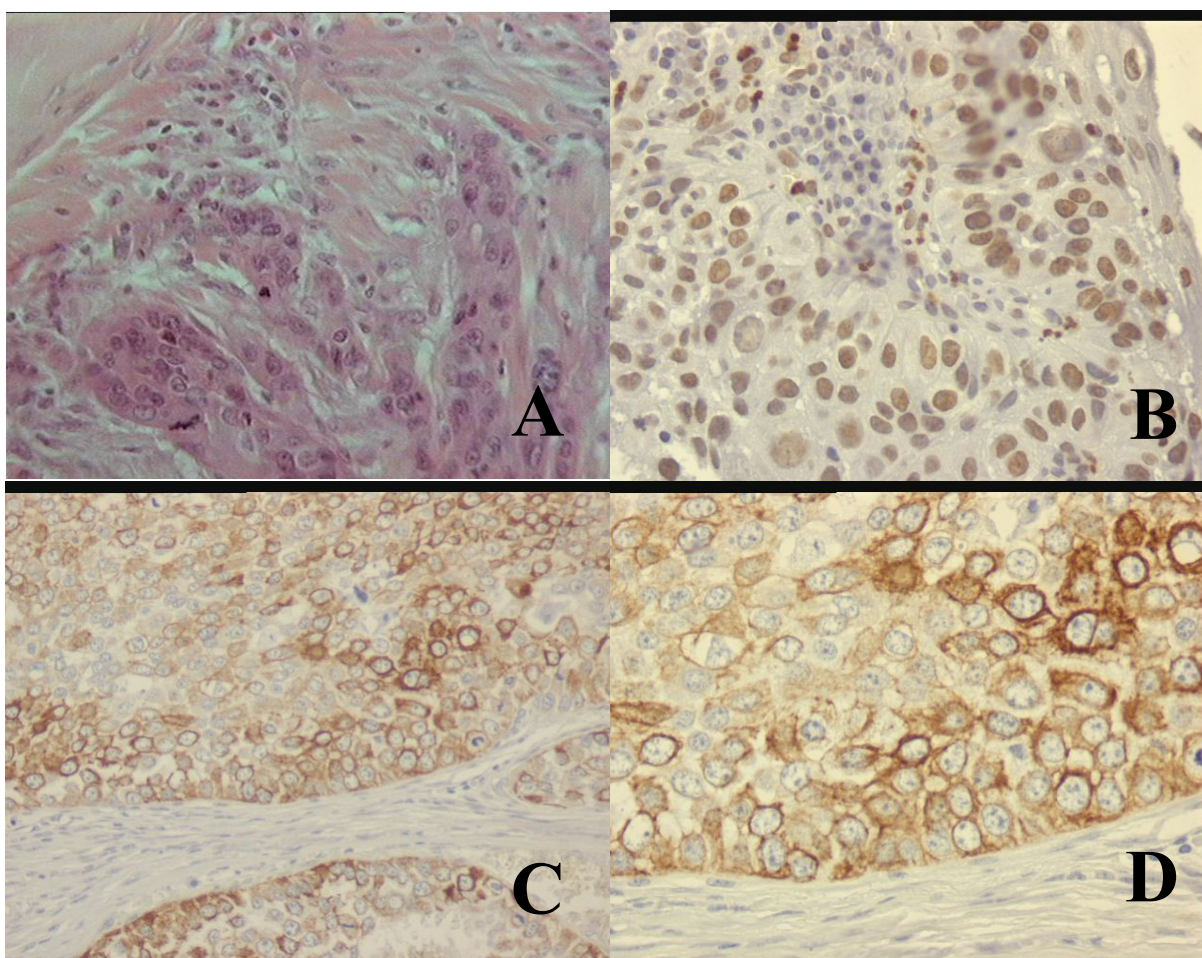
Pretpostavka o proporcionalnom hazardu nije uvijek ispunjena. Na primjer, kod kirurških zahvata hazard je najveći u početku, to jest tijekom i neposredno poslije kirurškog zahvata, a potom se smanjuje. Coxova regresija je robusna metoda, pa kad uvjet proporcionalnosti nije ispunjen izračunati relativni rizik može se smatrati prosjekom za proučavani period. Kada rpart koristi Coxovu regresiju tada se u završnim čvorovima konstruiranog stabla odluke prikazuje omjer hazarda (relativni rizik) za izdvojenu podskupinu u odnosu na ulazni čvor koji ima hazard u iznosu 1 (78,79,80).

#### **4. REZULTATI**

Uvidom u rezultate bojanja protutijelima za citokine, vidljivo je da je većina tumora pokazala pozitivnost bojanja na CXCR4, ekspresijom u jezgri tumorskih stanica i citokina CXCL12, u citoplazmi tumorskih stanica (slike 2 i 3), u transformacijskoj zoni tumora. Ekspresija citokina CXCL12 prisutna u citoplazmi tumorskih stanica u transformacijskoj zoni tumora bila je u najvećem broju slučajeva negativna (tablice 8,9 i 10).



**Slika 2: Uzorci preparata karcinoma grkljana: A. centar tumora (HE, objektiv x20); B. transformacijska zona (HE, objektiv x10).**



**Slika 3: Uzorci preparata karcinoma grkljana: A. invazivni rub (HE, objektiv x10); B. pozitivno bojanje na nuklearni CXCR4 (objektiv**

**x20); C. CXCL12 bojanje (objektiv x10); D. CXCL12 bojanje (objektiv x20).**

**Tablica 8. Distribucija ekspresije citokina CXCR4 prisutnog u jezgri tumorskih stanica u transformacijskoj zoni tumora.**

CXCR4 u jezgri	N	%
0	23	28
1	21	25
2	23	28
3	16	19
nedostaje	7	
UKUPNO	90	100



**Tablica 9. Distribucija ekspresije citokina CXCR4 prisutnog u citoplazmi tumorskih stanica u transformacijskoj zoni tumora.**

CXCR4 u citoplazmi	N	%
0	64	77
1	14	7
2	5	6
3	0	0
nedostaje	7	
UKUPNO	90	100

**Tablica 10. Distribucija ekspresije citokina CXCL12 prisutnog u citoplazmi tumorskih stanica u transformacijskoj zoni tumora.**

CXCL12	N	%
0	15	19
1	31	38
2	22	27
3	13	16
nedostaje	9	
UKUPNO	90	100

Tablice 11,12 i 13 prikazuju distribuciju ekspresije citokina CXCR4 prisutnog u jezgri i citoplazmi, te citokina CXCL12 prisutnog u citoplazmi

tumorskih stanica, u centru tumora. Vidljivo je da je ekspresija citokina CXCR4 u jezgri i citoplazmi tumorskih stanica u najvećem broju slučajeva negativna, dok ekspresija citokina CXCL12 ostaje pozitivna u 83% slučajeva.

**Tablica 11. Distribucija ekspresije citokina CXCR4 prisutnog u jezgri tumorskih stanica u centru tumora.**

CXCR4 u jezgri	N	%
0	52	59
1	25	28
2	10	11
3	2	2
nedostaje	1	
UKUPNO	90	100

**Tablica 12. Distribucija ekspresije citokina CXCR4 prisutnog u citoplazmi tumorskih stanica u centru tumora.**

CXCR4(cp)	N	%
0	65	73
1	23	26
2	1	1
3	0	0
nedostaje	1	
UKUPNO	90	100

**Tablica 13. Distribucija ekspresije citokina CXCL12 prisutnog u citoplazmi tumorskih stanica u centru tumora.**

CXCL12	N	%
0	15	17
1	30	34
2	28	32
3	15	17
nedostaje	2	
UKUPNO	90	100

Tablice 14,15 i 16. prikazuju distribuciju ekspresije citokina CXCR4 prisutnog u jezgri i citoplazmi tumorskih stanica i citokina CXCL12 prisutnog u citoplazmi tumorskih stanica u invazivnom rubu tumora.

Vidljivo je da je u većini slučajeva ekspresija za jezgrin CXCR4, kao i za CXCL12 pozitivna i to u visokoj razini ekspresije (2 i 3), dok citoplazmatski CXCR4 ostaje u većini slučajeva negativan.

**Tablica 14. Distribucija ekspresije citokina CXCR4 prisutnog u jezgri tumorskih stanica u invazivnom rubu tumora.**

CXCR4 u jezgri	N	%
0	21	24
1	18	20
2	30	34
3	19	22
nedostaje	2	
UKUPNO	90	100

**Tablica 15. Distribucija ekspresije citokina CXCR4 prisutnog u citoplazmi tumorskih stanica u invazivnom rubu tumora.**

CXCR4 u citoplazmi	N	%
0	54	61
1	27	31
2	5	6
3	2	2
nedostaje	2	
UKUPNO	90	100

**Tablica 16. Distribucija ekspresije citokina CXCL12 prisutnog u citoplazmi tumorskih stanica u invazivnom rubu tumora.**

CXCL12	N	%
0	8	9
1	14	16
2	44	50
3	22	25
nedostaje	2	
UKUPNO	90	100

Radi jednostavnije statističke obrade podataka, vrijednosti ekspresije citokina 0 i 1 spojene su u podskupinu niske ekspresije, a vrijednosti ekspresije 2 i 3 u podskupinu visoke ekspresije. Analizom ekspresije po tumorskim zonama (transformacijska zona, centar tumora i invazivni rub) dobivena je statistički značajna razlika između ekspresije citokina CXCR4 u jezgri tumorskih stanica transformacijske zone tumora i centra tumora, tako da je najniža koncentracija navedenog citokina bila u centru tumora, dok su transformacijska zona i invazivni rub imali podjednaku ekspresiju navedenog citokina ( $\chi^2=37,036$ ,  $df=2$ ,  $p<0,001$ ) (tablica 17).

Ekspresija citoplazmatskog citokina CXCR4 nije dala statistički značajnu razliku u 3 različite tumorske zone ( $\chi^2 =4,616$ ,  $df=2$ ,  $p=0,10$ ), dok je ekspresija citokina CXCL12 također bila statistički značajno različita

pokazujući visoke vrijednosti u invazivnom rubu tumora ( $\chi^2=20,092$ ,  $df=2$ ,  $p<0,001$ ), u odnosu na centar tumora i transformacijsku zonu.

**Tablica 17. Distribucija ekspresije citokina CXCR4 prisutnog u jezgri i citoplazmi tumorskih stanica i citokina CXCL12 prisutnog u citoplazmi tumorskih stanica u 3 tumorske zone (transformacijska zona, centar tumora i invazivni rub).**

citokin	ekspresija	TZ	C	IR
CXCR4(n)	niska	44(53%)	77(86%)	39(44%)
	visoka	39(47%)	12(14%)	49(56%)
CXCR4(cp)	niska	78(94%)	88(99%)	81(92%)
	visoka	5(6%)	1(1%)	7(8%)
CXCL12	niska	46(57%)	45(51%)	22(25%)
	visoka	35(43%)	43(49%)	66(75%)

Ekspresija citokina CXCR4, prisutnog u jezgri i citoplazmi tumorskih stanica i citokina CXCL12, prisutnog u citoplazmi tumorskih stanica u sve tri tumorske zone korelirana je s veličinom tumora, prisutnosti metastaza u regionalne limfne čvorove, gradusom tumora i lokalizacijom.

**Tablica 18. Prikaz međudnosa citokina CXCR4 u jezgri u transformacijskoj zoni tumora i veličine tumora.**

Veličina tumora	visoka ekspresija	niska ekspresija	UKUPNO
T1	12 (52%)	11(48%)	23
T2	6 (46%)	7 (54%)	13
T3	6 (32%)	13 (68%)	19
T4	13 (57%)	10 (43%)	23
TX	2 (40%)	3 (60%)	5
UKUPNO	39	44	83

Analizom međudnosa citokina CXCR4 prisutnog u jezgri tumorskih stanica u transformacijskoj zoni tumora i veličine tumora nije dobivena statistički značajna razlika ( $\chi^2=3$ ,  $df=4$ ,  $p=0,558$ ).

**Tablica 19. Prikaz međudnosa citokina CXCR4 u jezgri u transformacijskoj zoni tumora i metastaza u regionalne limfne čvorove.**

Limfni čvorovi	visoka ekspresija	niska ekspresija	UKUPNO
N0	17 (46%)	20 (54%)	37
N1	4 (50%)	4 (50%)	8
N2	13 (46%)	15 (54%)	28
N3	1 (50%)	1 (50%)	2
NX	4 (50%)	4 (50%)	8
UKUPNO	39	44	83

Razlika nije statistički značajna ( $\chi^2=0,085$ ,  $df=4$ ,  $p=0,999$ ).



**Tablica 20. Prikaz međuodnosa citokina CXCR4 u jezgri u transformacijskoj zoni tumora i gradusa tumora.**

Gradus tumora	visoka ekspresija	niska ekspresija	UKUPNO
G1	8 (53%)	7 (47%)	15
G2	19 (48%)	21 (52%)	40
G3	12 (43%)	16 (57%)	28
UKUPNO	39	44	83

Razlika nije statistički značajna ( $\chi^2=0,438$ ,  $df=2$ ,  $p=0,803$ ).

**Tablica 21. Prikaz međuodnosa citokina CXCR4 u jezgri u transformacijskoj zoni tumora i lokalizacije tumora.**

Lokalizacija	visoka ekspresija	niska ekspresija	UKUPNO
glotis	15 (56%)	12 (44%)	27
subglotis	1 (14%)	6 (86%)	7
supraglotis	10 (45%)	12 (55%)	22
transglotis	13 (48%)	14 (52%)	27
UKUPNO	39	44	83

Razlika nije statistički značajna ( $\chi^2=3,836$ ,  $df=3$ ,  $p=0,28$ ).

**Tablica 22. Prikaz međuodnosa CXCR4 u citoplazmi u transformacijskoj zoni tumora i veličine tumora.**

Veličina tumora	visoka ekspresija	niska ekspresija	UKUPNO
T1	1 (4%)	22 (96%)	23
T2	0 (0%)	13 (100%)	13
T3	2 (11%)	17 (89%)	19
T4	1 (4%)	22 (96%)	23
TX	1 (20%)	4 (80%)	5
UKUPNO	5	78	83

Razlika nije statistički značajna ( $\chi^2=3,467$ ,  $df=4$ ,  $p=0,483$ ).

**Tablica 23. Prikaz međuodnosa CXCR4 u citoplazmi u transformacijskoj zoni tumora i metastaza u regionalne limfne čvorove.**

Limfni čvorovi	visoka ekspresija	niska ekspresija	UKUPNO
N0	0 (0%)	37 (100%)	37
N1	2 (25%)	6 (75%)	8
N2	3 (11%)	25 (89%)	28
N3	0 (0%)	2 (100%)	2
NX	0 (0%)	8 (100%)	8
UKUPNO	5	78	83

Razlika nije statistički značajna ( $\chi^2=9,189$ ,  $df=4$ ,  $p=0,057$ ).

**Tablica 24. Prikaz međuodnosa citokina CXCR4 u citoplazmi u transformacijskoj zoni tumora i gradusa tumora.**

Gradus tumora	visoka ekspresija	niska ekspresija	UKUPNO
G1	0 (0%)	15 (100%)	15
G2	2 (5%)	38 (95%)	40
G3	3 (11%)	25 (89%)	28
UKUPNO	5	78	83

Razlika nije statistički značajna ( $\chi^2=2,124$ ,  $df=2$ ,  $p=0,346$ ).

**Tablica 25. Prikaz međuodnosa citokina CXCR4 u citoplazmi u transformacijskoj zoni tumora i lokalizacije tumora.**

Lokalizacija	visoka ekspresija	niska ekspresija	UKUPNO
glotis	1 (4%)	26 (96%)	27
subglotis	2 (29%)	5 (71%)	7
supraglotis	0 (0%)	22 (100%)	22
transglotis	2 (7%)	25 (93%)	27
UKUPNO	5	78	83

Razlika nije statistički značajna ( $\chi^2=8,044$ ,  $df=3$ ,  $p=0,45$ ).

**Tablica 26. Prikaz međuodnosa citokina CXCL12 u transformacijskoj zoni tumora i veličine tumora.**

Veličina tumora	visoka ekspresija	niska ekspresija	UKUPNO
T1	15 (58%)	11 (42%)	26
T2	4 (30%)	9 (70%)	13
T3	4 (22%)	14 (78%)	18
T4	10 (53%)	9 (47%)	19
TX	2 (40%)	3 (60%)	5
UKUPNO	35	46	81

Razlika nije statistički značajna ( $\chi^2=6,982$ ,  $df=4$ ,  $p=0,137$ ).

**Tablica 27. Prikaz međuodnosa citokina CXCL12 u transformacijskoj zoni tumora i metastaza u regionalne limfne čvorove.**

Limfni čvorovi	visoka ekspresija	niska ekspresija	UKUPNO
N0	17 (52%)	16 (48%)	33
N1	2 (29%)	5 (71%)	7
N2	12 (41%)	17 (59%)	29
N3	0 (0%)	2 (100%)	2
NX	4 (40%)	6 (60%)	10
UKUPNO	35	46	81

Razlika nije statistički značajna ( $\chi^2=3,142$ ,  $df=4$ ,  $p=0,532$ ).

**Tablica 28. Prikaz međuodnosa citokina CXCL12 u transformacijskoj zoni tumora i gradusa tumora.**

Gradus tumora	visoka ekspresija	niska ekspresija	UKUPNO
G1	6 (40%)	9 (60%)	15
G2	18 (47%)	20 (53%)	38
G3	11 (39%)	17 (61%)	28
UKUPNO	35	46	81

Razlika nije statistički značajna ( $\chi^2=0,506$ ,  $df=2$ ,  $p=0,776$ ).

**Tablica 29. Prikaz međuodnosa citokina CXCL12 u transformacijskoj zoni tumora i tumorske lokalizacije.**

Lokalizacija	visoka ekspresija	niska ekspresija	UKUPNO
glotis	12 (43%)	16 (57%)	28
subglotis	4 (57%)	3 (43%)	7
supraglotis	9 (41%)	13 (59%)	22
transglotis	10 (42%)	14 (58%)	24
UKUPNO	35	46	81

Razlika nije statistički značajna ( $\chi^2=0,626$ ,  $df=3$ ,  $p=0,890$ ).

**Tablica 30. Prikaz međudnosa citokina CXCR4 u jezgri u centru tumora i veličine tumora.**

Veličina tumora	visoka ekspresija	niska ekspresija	UKUPNO
T1	5 (19%)	21 (81%)	26
T2	1 (7%)	13 (93%)	14
T3	1 (5%)	18 (95%)	19
T4	4 (17%)	19 (83%)	23
TX	1 (13%)	6 (87%)	7
UKUPNO	12	77	89

Razlika nije statistički značajna ( $\chi^2=2,624$ ,  $df=4$ ,  $p=0,623$ ).

**Tablica 31. Međudnos citokina CXCR4 u jezgri u centru tumora i metastaza u regionalne limfne čvorove.**

Limfni čvorovi	visoka ekspresija	niska ekspresija	UKUPNO
N0	6 (16%)	31 (84%)	37
N1	1 (13%)	7 (87%)	8
N2	4 (13%)	26 (87%)	30
N3	0 (0%)	2 (100%)	2
NX	1 (8%)	11 (92%)	12
UKUPNO	12	77	89

Razlika nije statistički značajna ( $\chi^2=0,829$ ,  $df=4$ ,  $p=0,935$ ).

**Tablica 32. Međuodnos citokina CXCR4 u jezgri u centru tumora i gradusa tumora.**

Gradus tumora	visoka ekspresija	niska ekspresija	UKUPNO
G1	1 (6%)	16 (94%)	17
G2	9 (21%)	33 (79%)	42
G3	2 (7%)	27 (93%)	29
UKUPNO	12	77	89

Razlika nije statistički značajna ( $\chi^2=4,310$ ,  $df=2$ ,  $p=0,116$ ).

**Tablica 33. Međuodnos citokina CXCR4 u jezgri u centru tumora i tumorske lokalizacije.**

Lokalizacija	visoka ekspresija	niska ekspresija	UKUPNO
glotis	0 (0%)	32 (100%)	32
subglotis	0 (0%)	7 (100%)	7
supraglotis	0 (0%)	22 (100%)	22
transglotis	1 (4%)	27 (96%)	28
UKUPNO	1	88	89

Razlika nije statistički značajna ( $\chi^2=2,040$ ,  $df=3$ ,  $p=0,564$ ).

**Tablica 34. Međudnos citokina CXCR4 u citoplazmi u centru tumora i veličine tumora.**

Veličina tumora	visoka ekspresija	niska ekspresija	UKUPNO
T1	0 (0%)	26 (100%)	26
T2	0 (0%)	14 (100%)	14
T3	1 (5%)	18 (95%)	19
T4	0 (0%)	23 (100%)	23
TX	0 (0%)	7 (100%)	7
UKUPNO	1	88	89

Razlika nije statistički značajna ( $\chi^2=3,726$ ,  $df=4$ ,  $p=0,444$ ).

**Tablica 35. Međudnos citokina CXCR4 u citoplazmi u centru tumora i metastaza u regionalne limfne čvorove.**

Limfni čvorovi	visoka ekspresija	niska ekspresija	UKUPNO
N0	1 (3%)	36 (97%)	37
N1	0 (0%)	8 (100%)	8
N2	0 (0%)	30 (100%)	30
N3	0 (0%)	2 (100%)	2
NX	0 (0%)	12 (100%)	12
UKUPNO	1	88	89



Razlika nije statistički značajna ( $\chi^2=1,421$ ,  $df=4$ ,  $p=0,840$ ).

**Tablica 36. Međudnos citokina CXCR4 u citoplazmi u centru tumora i gradusa tumora.**

Gradus tumora	visoka ekspresija	niska ekspresija	UKUPNO
G1	1 (6%)	16 (94%)	17
G2	0 (0%)	42 (100%)	42
G3	0 (0%)	30 (100%)	30
UKUPNO	1	88	89

Razlika nije statistički značajna ( $\chi^2=4,283$ ,  $df=2$ ,  $p=0,117$ ).

**Tablica 37. Međudnos citokina CXCR4 u citoplazmi u centru tumora i tumorske lokalizacije.**

Lokalizacija	visoka ekspresija	niska ekspresija	UKUPNO
glotis	0 (0%)	32 (100%)	32
subglotis	0 (0%)	7 (100%)	7
supraglotis	0 (0%)	22 (100%)	22
transglotis	1 (4%)	27 (96%)	28
UKUPNO	1	88	89

Razlika nije statistički značajna ( $\chi^2=2,203$ ,  $df=3$ ,  $p=0,531$ ).

**Tablica 38. Međudnos citokina CXCL12 u centru tumora i veličine tumora.**

Veličina tumora	visoka ekspresija	niska ekspresija	UKUPNO
T1	13 (50%)	13 (50%)	26
T2	7 (50%)	7 (50%)	14
T3	8 (42%)	11 (58%)	19
T4	13 (59%)	9 (41%)	22
TX	2 (29%)	5 (71%)	7
UKUPNO	43	45	88

Razlika nije statistički značajna ( $\chi^2=2,442$ ,  $df=4$ ,  $p=0,655$ ).

**Tablica 39. Međudnos citokina CXCL12 u centru tumora i metastaza u regionalne limfne čvorove.**

Limfni čvorovi	visoka ekspresija	niska ekspresija	UKUPNO
N0	17 (46%)	20 (54%)	37
N1	4 (57%)	3 (43%)	7
N2	18 (60%)	12 (40%)	30
N3	0 (0%)	2 (100%)	2
NX	4 (33%)	8 (67%)	12
UKUPNO	43	45	88

Razlika nije statistički značajna ( $\chi^2=4,876$ ,  $df=4$ ,  $p=3,00$ ).

**Tablica 40. Međudnos citokina CXCL12 u centru tumora i gradusa tumora.**

Gradus tumora	visoka ekspresija	niska ekspresija	UKUPNO
G1	2 (12%)	15 (88%)	17
G2	23 (56%)	18 (44%)	41
G3	18 (60%)	12 (40%)	30
UKUPNO	43	45	88

**Razlika je statistički značajna ( $\chi^2=11,712$ ,  $df=2$ ,  $p=0,003$ ).**

**Tablica 41. Međudnos citokina CXCL12 u centru tumora i tumorske lokalizacije.**

Lokalizacija	visoka ekspresija	niska ekspresija	UKUPNO
glotis	13 (41%)	19 (59%)	32
subglotis	4 (57%)	3 (43%)	7
supraglotis	12 (55%)	10 (45%)	22
transglotis	14 (52%)	13 (48%)	27
UKUPNO	43	45	88

Razlika nije statistički značajna ( $\chi^2=1,442$ ,  $df=3$ ,  $p=0,696$ ).

**Tablica 42. Međudnos citokina CXCR4 u jezgri u invazivnom rubu tumora i veličine tumora.**

Veličina tumora	visoka ekspresija	niska ekspresija	UKUPNO
T1	16 (62%)	10 (38%)	26
T2	8 (57%)	6 (43%)	14
T3	7 (39%)	11 (61%)	18
T4	14 (61%)	9 (39%)	23
TX	4 (57%)	3 (43%)	7
UKUPNO	49	39	88

Razlika nije statistički značajna ( $\chi^2=2,687$ ,  $df=4$ ,  $p=0,611$ ).

**Tablica 43. Međudnos citokina CXCR4 u jezgri u invazivnom rubu tumora i metastaza u regionalne limfne čvorove.**

Limfni čvorovi	visoka ekspresija	niska ekspresija	UKUPNO
N0	18 (49%)	19 (51%)	37
N1	7 (88%)	1 (12%)	8
N2	15 (52%)	14 (48%)	29
N3	1 (50%)	1 (50%)	2
NX	8 (67%)	4 (33%)	12
UKUPNO	49	39	88

Razlika nije statistički značajna ( $\chi^2=4,821$ ,  $df=4$ ,  $p=0,306$ ).

**Tablica 44. Međudnos citokina CXCR4 u jezgri u invazivnom rubu tumora i tumorskog gradusa.**

Gradus tumora	visoka ekspresija	niska ekspresija	UKUPNO
G1	10 (59%)	7 (41%)	17
G2	22 (54%)	19 (46%)	41
G3	17 (57%)	13 (43%)	30
UKUPNO	49	39	88

Razlika nije statistički značajna ( $\chi^2=0,148$ ,  $df=2$ ,  $p=0,929$ ).

**Tablica 45. Međudnos citokina CXCR4 u jezgri u invazivnom rubu tumora i tumorske lokalizacije.**

Lokalizacija	visoka ekspresija	niska ekspresija	UKUPNO
glotis	2 (6%)	30 (94%)	32
subglotis	2 (29%)	5 (71%)	7
supraglotis	0 (0%)	21 (100%)	21
transglotis	3 (11%)	25 (89%)	28
UKUPNO	7	81	88

Razlika nije statistički značajna ( $\chi^2=1,213$ ,  $df=3$ ,  $p=0,750$ ).

**Tablica 46. Međudnos citokina CXCR4 u citoplazmi u invazivnom rubu tumora i veličine tumora.**

Veličina tumora	visoka ekspresija	niska ekspresija	UKUPNO
T1	1 (4%)	25 (96%)	26
T2	0 (0%)	14 (100%)	14
T3	3 (17%)	15 (83%)	18
T4	2 (9%)	21 (91%)	23
TX	1 (14%)	6 (86%)	7
UKUPNO	7	81	88

Razlika nije statistički značajna ( $\chi^2=4,076$ ,  $df=4$ ,  $p=0,396$ ).

**Tablica 47. Međudnos citokina CXCR4 u citoplazmi u invazivnom rubu tumora i metastaza u regionalne limfne čvorove.**

Limfni čvorovi	visoka ekspresija	niska ekspresija	UKUPNO
N0	1 (3%)	36 (97%)	37
N1	2 (25%)	6 (75%)	8
N2	3 (10%)	26 (90%)	29
N3	0 (0%)	2 (100%)	2
NX	1 (8%)	11 (92%)	12
UKUPNO	7	81	88

Razlika nije statistički značajna ( $\chi^2=4,970$ ,  $df=4$ ,  $p=0,290$ ).

**Tablica 48. Međudnos citokina CXCR4 u citoplazmi u invazivnom rubu tumora i tumorskog gradusa.**

Gradus tumora	visoka ekspresija	niska ekspresija	UKUPNO
G1	10 (59%)	7 (41%)	17
G2	22 (54%)	19 (46%)	41
G3	17(57%)	13 (43%)	30
UKUPNO	49	39	88

Razlika nije statistički značajna ( $\chi^2=4,056$ ,  $df=2$ ,  $p=0,132$ ).

**Tablica 49. Međudnos citokina CXCR4 u citoplazmi u invazivnom rubu tumora i tumorske lokalizacije.**

Lokalizacija	visoka ekspresija	niska ekspresija	UKUPNO
glotis	2 (6%)	30 (94%)	32
subglotis	2 (29%)	5 (71%)	7
supraglotis	0 (0%)	21 (100%)	21
transglotis	3 (11%)	25 (89%)	28
UKUPNO	7	81	88

Razlika nije statistički značajna ( $\chi^2=6,297$ ,  $df=3$ ,  $p=0,098$ ).

**Tablica 50. Međudnos citokina CXCL12 u invazivnom rubu tumora i veličine tumora.**

Veličina tumora	visoka ekspresija	niska ekspresija	UKUPNO
T1	22 (85%)	4 (15%)	26
T2	8 (57%)	6 (43%)	14
T3	14 (74%)	5 (26%)	19
T4	19 (86%)	3 (14%)	22
TX	3 (43%)	4 (57%)	7
UKUPNO	66	22	88

Razlika nije statistički značajna ( $\chi^2=9,053$ ,  $df=4$ ,  $p=0,06$ ).

**Tablica 51. Međudnos citokina CXCL12 u invazivnom rubu tumora i metastaza u regionalne limfne čvorove.**

Limfni čvorovi	visoka ekspresija	niska ekspresija	UKUPNO
N0	28 (76%)	9 (24%)	37
N1	5 (71%)	2 (29%)	7
N2	22 (73%)	8 (27%)	30
N3	1 (50%)	1 (50%)	2
NX	10 (83%)	2 (17%)	12
UKUPNO	66	22	88

Razlika nije statistički značajna ( $\chi^2=1,212$ ,  $df=4$ ,  $p=0,876$ ).



**Tablica 52. Međudnos citokina CXCL12 u invazivnom rubu tumora i tumorskog gradusa.**

Gradus tumora	visoka ekspresija	niska ekspresija	UKUPNO
G1	13 (76%)	4 (24%)	17
G2	28 (68%)	13 (32%)	41
G3	25 (83%)	5 (17%)	30
UKUPNO	66	22	88

Razlika nije statistički značajna ( $\chi^2=2,114$ ,  $df=2$ ,  $p=0,347$ ).

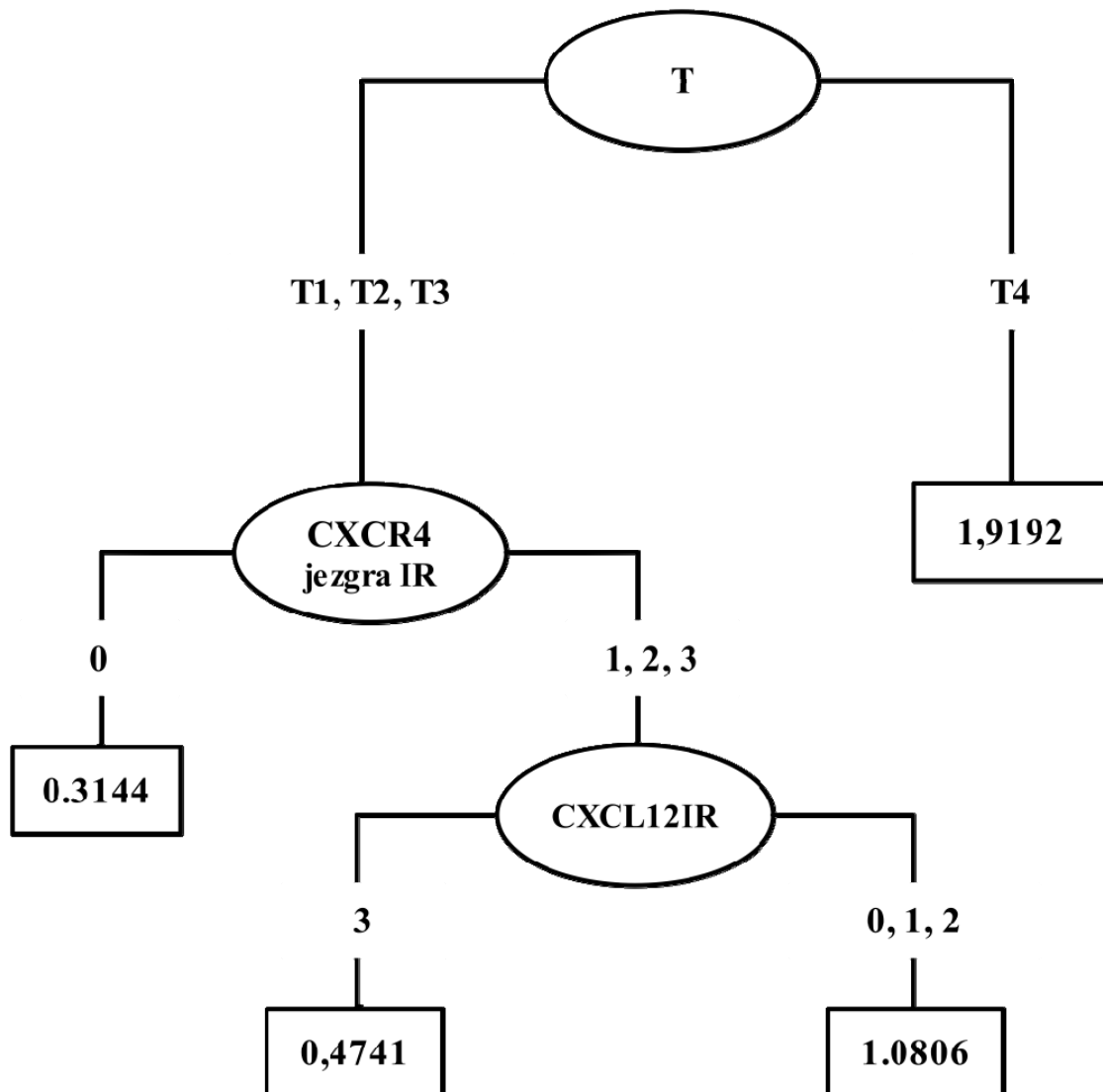
**Tablica 53. Međudnos citokina CXCL12 u invazivnom rubu tumora i tumorske lokalizacije.**

Lokalizacija	visoka ekspresija	niska ekspresija	UKUPNO
glotis	22	10	32
subglotis	6	1	7
supraglotis	16	6	22
transglotis	22	5	27
UKUPNO	66	22	88

Razlika nije statistički značajna ( $\chi^2=1,761$ ,  $df=3$ ,  $p=0,624$ ).

## Analiza prognostičkog značaja uporabom rpart-a

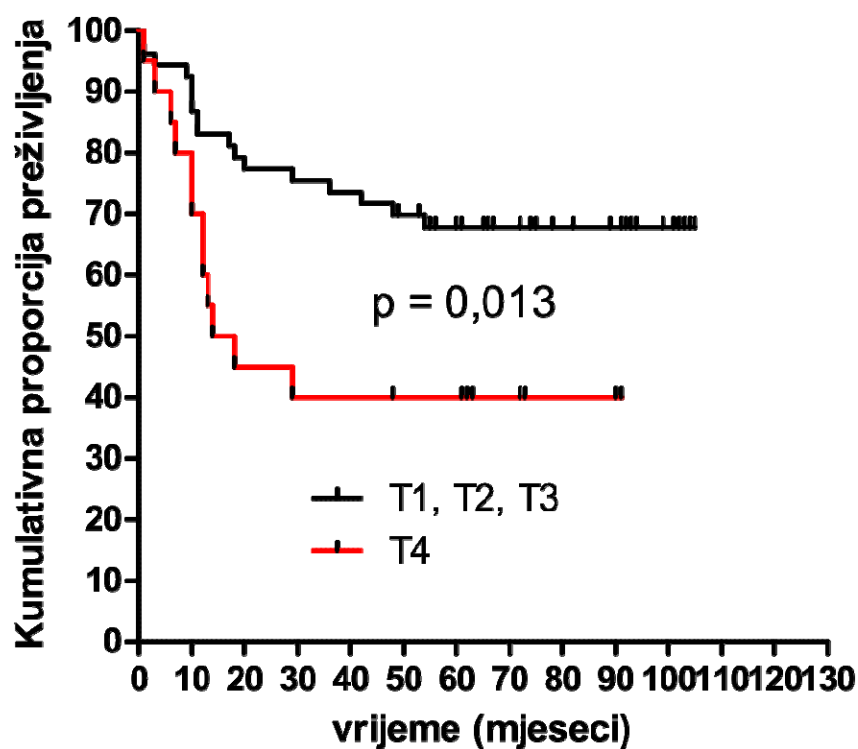
Uporabom rpart-a dobiveno je stablo odluke s tri čvora odluke, koje je prikazano na slici 4.



**Slika 4. Stablo odluke s tri čvora.**

Stablo odluke treba tumačiti na slijedeći način:

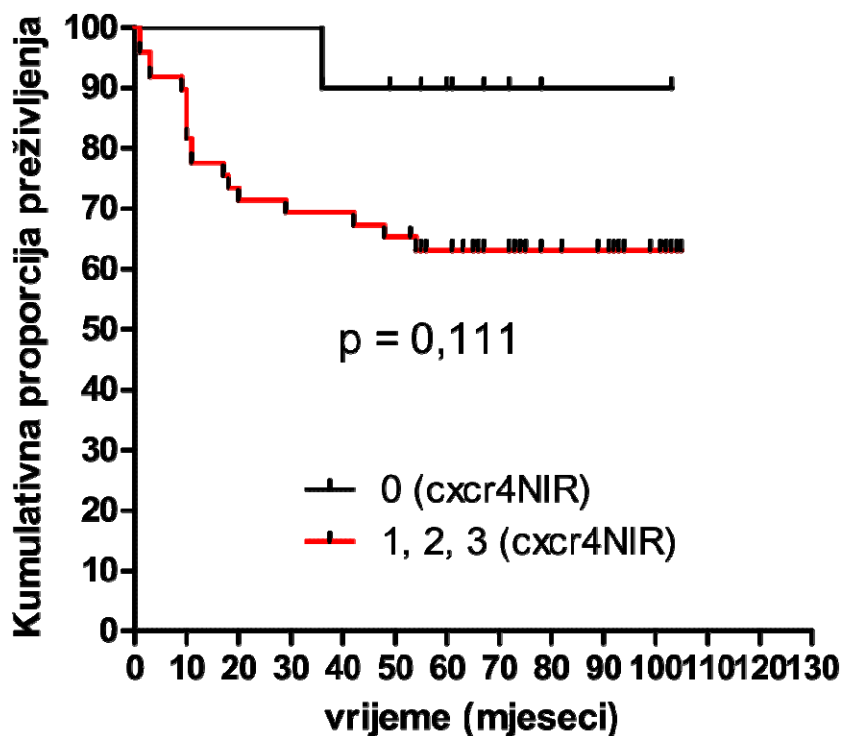
1. U prvom čvoru odluke bolesnici su podijeljeni u dvije podskupine:  
(a) bolesnici s veličinom primarne neoplazme T1; (b) bolesnici s veličinom neoplazme T2, T3, T4. Ako se hazard u svih bolesnika označi s 1, tada relativni rizik umiranja kod bolesnika s T1 iznosi 0.79, dok je kod bolesnika s T2, T3 i T4 taj broj 1,92. Razlika među skupinama je statistički signifikantna po kriteriju log-rank testa ( $p = 0,013$ ). Procjena preživljenja za izdvojene podskupine je prikazana na slici 5.



**Slika 5. Procjena preživljenja za izdvojene skupine bolesnika ovisno o veličini tumora.**

2. U drugom čvoru odluke bolesnici s T1, T2 i T3 podijeljeni su prema vrijednosti citokina CXCR4 u jezgri tumorskih stanica u invazivom

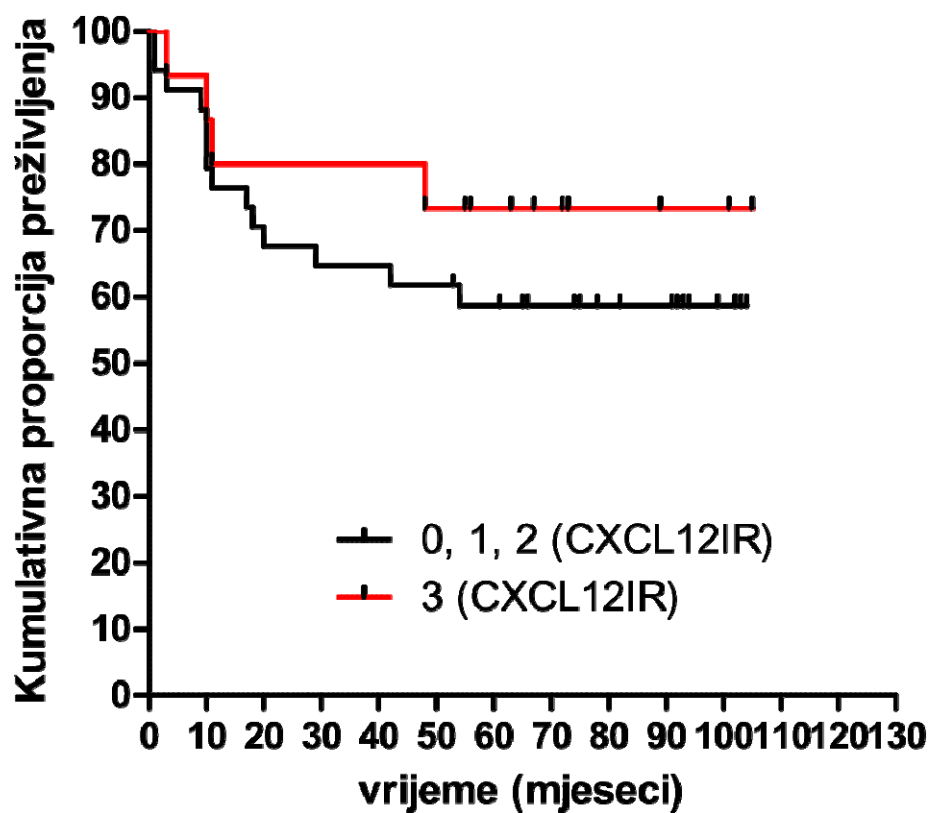
rubu tumora u dvije podskupine : (a) izraženost CXCR4 u jezgri 0 i (b) izraženost CXCR4 u jezgri 1, 2 i 3. Relativni rizik umiranja kod izraženosti CXCR4 u jezgri razine 0 je 0.31, a kod izraženosti CXCR4 u jezgri razine 1, 2 i 3, 0,950. Razlika među skupinama nije signifikantna po kriteriju log-rank testa ( $p = 0,111$ ). Procjena preživljenja za izdvojene podskupine prikazana je na slici 6.



**Slika 6. Procjena preživljenja za izdvojene skupine bolesnika ovisno o izraženosti jezgrinog CXCR4 u invazivnom rubu tumora.**

- U trećem čvoru su bolesnici s razinom aktivnosti CXCR4 (jezgra) 1, 2 i 3 podijeljeni u dvije podskupine prema razini CXCL12 u invazivnom rubu tumora: (a) izraženost CXCL12 3 i (b) izraženost

CXCL12 0, 1 i 2. Relativni rizik umiranja kod izraženosti CXCL12 razine 3 je 0.47, a kod izraženosti CXCL12 razine 0, 1 i 2 je 1,08. Razlika među skupinama nije signifikantna po kriteriju log-rank testa ( $p = 0,346$ ). Procjena preživljenja za izdvojene podskupine prikazana je na slici 7.



**Slika 7. Procjena preživljenja za izdvojene podskupine bolesnika ovisno o izraženosti CXCL12 u invazivnom rubu tumora.**

**Tablica 54. Spearmanova korelacija međuodnosa jezgrinog i citoplazmatskog CXCR4 i CXCL12 u tri različite tumorske zone (transformacijska zona, centar tumora i invazivni rub).**

<i>varijabla</i>	<i>cxcr4NT</i> Z	<i>cxcr4CT</i> Z	<i>CXCR4n</i> C	<i>CXCR4c</i> R	<i>cxcr4NI</i> R	<i>CXCR4CI</i> Z	<i>CXCL12T</i> C	<i>CXCL12</i> R	<i>CXCL12I</i> R
<b>cxcr4NTZ</b>	1,00	-0,05	0,66	0,26	0,84	-0,10	-0,19	-0,12	-0,084
<b>cxcr4CTZ</b>	-0,05	1,00	0,01	0,23	0,18	0,42	-0,04	0,19	0,15
<b>CXCR4nC</b>	0,66	0,01	1,00	0,23	0,66	-0,11	0,04	-0,18	-0,017
<b>CXCR4cR</b>	0,26	0,23	0,23	1,00	0,21	0,33	-0,14	-0,22	-0,14
<b>cxcr4NIR</b>	0,84	0,18	0,64	0,21	1,00	-0,14	-0,14	-0,09	-0,10
<b>CXCR4CI</b>	-0,098	0,42	-0,11	0,33	-0,14	1,00	-0,06	-0,02	0,04
<b>CXCL12TZ</b>	-0,19	-0,045	0,04	-0,14	-0,14	-0,05	1,00	0,16	0,31
<b>CXCL12C</b>	-0,12	0,19	-0,18	-0,219	-0,09	-0,02	0,16	1,00	0,44
<b>CXCL12IR</b>	-0,08	0,15	-0,02	-0,14	-0,10	0,04	0,31	0,44	1,00

Tablica pokazuje da između citokina CXCR4, bilo u jezgri, bilo u citoplazmi, i citokina CXCL12 ne postoji značajna korelacija niti u jednoj od tri navedene tumorske zone. Korelacije su većinom negativne, što znači da viša ekspresija jednog citokina odgovara nižoj ekspresiji drugog citokina.

## 5. RASPRAVA

Iako zloćudni tumori grkljana nisu česti (čine oko 2% zloćudnih tumora u organizmu), njihova učestalost je u trajnom porastu. U vrijeme dijagnosticanja, 60% tumora lokalizirano je u grkljanu, 25% ima regionalne, a do 10% udaljene metastaze. Lokalizacija igra značajnu ulogu kod karcinoma grkljana zbog različitih simptoma, načina širenja, liječenja i prognoze (1,6,7,8,9). Danas poznati prognostički čimbenici za karcinom larinksa dijele se na „klasične“ u koje ubrajamo veličinu tumora, zahvaćenost limfnih čvorova, udaljene metastaze, lokalizaciju tumora i histološki stupanj diferencijacije (gradus) i „suvremene“ u koje ubrajamo proliferacijske markere (PCNA, Ki-67), regulatorne bjelančevine staničnog ciklusa (p16, p21, ciklini), onkogene (p53), regulatorne bjelančevine apoptoze (bcl-2/bax), proteinaze (katepsin D), čimbenike koji reguliraju angiogenezu (vaskularno-endotelni čimbenik rasta-VEGF), AgNOR, sadržaj DNK i druge (14). Iako, za sada, TNM klasifikacija i histološki gradus tumora imaju najveću vrijednost, sve se više rade studije bioloških markera, kao dio „molekularne“ dijagnostike tumora (15). Na tragu tih istraživanja počela se proučavati uloga kemokina u regulaciji bioloških procesa, uključujući migraciju i proliferaciju stanica upalnog odgovora, matičnih stanica tijekom embrionalnog razvoja, ali i u migraciji i proliferaciji ostalih tipova stanica, uključujući tumorske (52-55). Najnovija in vitro i in vivo istraživanja pokazuju da neki kemokini, uključujući CCL2, CCL5, CXCL1 i CXCL12 imaju važnu ulogu u progresiji malignih tumora. In vitro studije pokazuju da kemokini stimuliraju migraciju preko različitih signalnih puteva, ali isto tako i preko za receptor/ligand jedinstveni put. Kemokin CXCR4 je, za

sada, jedini kemokinski receptor liganda CXCL12, koji je dokazan kod barem 23 različite vrste humanih tumora epitelnog, mezenhimalnog i hematopoetskog ishodišta, premda nisu sve stanice primarnog tumora pozitivne (63). U karcinomu ovarija i karcinomu pluća tipa ne-malih stanica, samo subpopulacija tumorskih stanica izražava ovaj receptor (64,65). Ekspresija ovog kemokina niska je ili odsutna u normalnom epitelu dojke, ovarija ili prostate (64,66,67), dok je prisutna u normalnom epitelu crijeva (68). Osim kod navedenih tumora, ekspresija CXCR4 je dokazana u kolorektalnom karcinomu, karcinomu prostate, melanomu, tumorima mozga, hematološkim malignim bolestima, npr. kroničnoj limfatičnoj leukemiji, multiplom mijelomu i kod nekih akutnih leukemija (72). Postoji malo istraživanja o ekspresiji CXCR4 u karcinomima larinksa. Jedno od njih pokazuje da karcinomi larinksa izražavaju ekspresiju CXCR4 i CXCL12, da je ekspresija CXCR4 povezana s metastaziranjem u regionalne limfne čvorove, kao i s udaljenim metastaziranjem, dok se i za citokin CXCL12 ta povezanost može naći, ali nije statistički značajna (73). Imunohistokemijski citokin CXCR4 pokazuje i nuklearni i citoplazmatski izražaj, te je promatran posebno za jezgru i za citoplazmu. CXCL12 bojanje pokazuje samo citoplazmatski izražaj, te je promatrano samo u citoplazmi tumorskih stanica. Obzirom na pretpostavku da je neoplazma heterogena struktura koja se sastoji od različitih klonova stanica raspoređenih jednoliko unutar tumora ili predominantno u njegovim dijelovima, rezultati su promatrani u tri različite tumorske regije (transformacijska zona, centar tumora i invazivni rub). Većina tumora pokazuje pozitivnost na CXCR4, mjenog u jezgri tumorskih stanica (41% u centru tumora, 66% u invazivnom rubu tumora i 72% u transformacijskoj zoni tumora), dok je citoplazmatska pozitivnost bila slabije



izražena (13% u transformacijskoj zoni, 27% u centru tumora i 39% u invazivnom rubu tumora). Izraženost bojanja citokina CXCL12 bila je jako pozitivna (81% u transformacijskoj zoni, 83% u centru tumora i 91% u invazivnom rubu tumora). Navedeni rezultati se po mjestu ekspresije razlikuju od podataka Kodame i sur. koji su proučavali CXCR4 u karcinomima cerviksa i dobili uglavnom citoplazmatsku ekspresiju navedenog citokina (81). Radi jednostavnije statističke obrade podataka, vrijednosti ekspresije citokina 0 i 1 spojene su u podskupinu niske ekspresije, a vrijednosti ekspresije 2 i 3 u podskupinu visoke ekspresije. Analizom ekspresije po tumorskim zonama (transformacijska zona, centar tumora i invazivni rub) dobivena je statistički značajna razlika između ekspresije citokina CXCR4 u jezgri tumorskih stanica transformacijske zone tumora i centra tumora, tako da je najniža koncentracija navedenog citokina bila u centru tumora, dok su transformacijska zona i invazivni rub imali podjednaku ekspresiju navedenog citokina ( $\chi^2=37,036$ ,  $df=2$ ,  $p<0,001$ ) (tablica 17).

Ekspresija citoplazmatskog citokina CXCR4 nije dala statistički značajnu razliku u 3 različite tumorske zone ( $\chi^2 =4,616$ ,  $df=2$ ,  $p=0,10$ ), što se možda može povezati s općenito slabom ekspresijom navedenog citokina u citoplazmi. Ekspresija citokina CXCL12 također je bila statistički značajno različita pokazujući visoke vrijednosti u invazivnom rubu tumora ( $\chi^2=20,092$ ,  $df=2$ ,  $p<0,001$ ), u odnosu na centar tumora i transformacijsku zonu. Navedeni rezultati pokazuju da unutar tumora postoje područja različitih bioloških karakteristika, odnosno da je podržana početna hipoteza o heterogenosti tumora, te da se pomoću morfoloških kriterija mogu definirati 3 različite

tumorske regije. Značenje ovakve heterogenosti moglo bi u praktičnom smislu značiti da pojedini dijelovi tumora pokazuju drugačiju sposobnost invadiranja, metastaziranja ili otpornosti prema kemoterapiji/zračenju. Osim toga, postavlja se pitanje mogućnosti određivanja pojedinih prognostičkih čimbenika u heterogenoj tumorskoj populaciji. Uobičajen pristup promatra tumor kao skup izmiješanih stanica koje potječu od različitih klonova. Pod pretpostavkom da je tumor autonomna tvorba, za očekivati je da unutar nje postoji određeni prostorni raspored, te da bi se proučavanjem pojedinih dijelova tumora, mogli dobiti pouzdaniji podaci o njegovom ponašanju. Ovi rezultati, pokazujući intratumorsku heterogenost, u skladu su s nekim do sada objavljenim podacima za AgNOR, sadržaj nukleinskih kiselina, katepsin D i ciklin D1 (14,50). Pretpostavka je da je ekspresija CXCR4/CXCL12 citokinskog puta različita unutar tumorskih zona, uz ideju da je tumor „organizam unutar organizma“ s vlastitom organizacijom i karakteristikama stanica. Po istraživanju Schradera i sur (82), rađena na karcinomu bubrega, citokin CXCL12 bio je nizak u tumorskim stanicama primarnog tumora, dok je visoka ekspresija ovog citokina nađena na mjestima u organizmu koja su često sijelo metastaza, npr. limfni čvorovi, jetra, pluća i koštana srž (73). Geminder i sur. (77) proučavali su interakciju CXCR4/CXCL12 u slučaju neuroblastoma. Stanice neuroblastoma ne izražavaju samo CXCR4, već i CXCL12, koji djeluje kao „down“ regulator za CXCR4, autokrino (ako stanice koje ga izlučuju izražavaju i njegov receptor) ili parakrino (preko susjednih stanica). Smanjenje ekspresije CXCR4 pod utjecajem CXCL12 može značiti da se i u koštanoj srži događa sličan proces. Koštana srž je ključno mjesto proizvodnje CXCL12 i njegova koncentracija je u tom području visoka. Prema tome, kad tumorske stanice

stignu do srži, visoka koncentracija CXCL12 smanjuje produkciju CXCR4, time prevenirajući migraciju tumorskih stanica na neko drugo mjesto. Očito je kemokinski gradijent vrlo važan za proces metastaziranja. To se odnosi na gradijent u primarnom tumoru, kao i na mjestu metastaziranja. Visoka izražajnost navedenog kemokina u ovom radu, po rpart statističkom programu, iako nije statistički signifikantna, pokazuje bolju prognozu preživljenja za bolesnike s ekspresijom 3, u odnosu na one s ekspresijom 0, 1 i 2, mjerenih u invazivnom rubu tumora. Međuodnos citokina CXCR4 i CXCL12 nije jednostavan. Iako je, za sada, CXCR4 jedini receptor kemokinskog liganda CXCL12, očito je da postoji i autokrini učinak citokina CXCL12, dokazan produkcijom navedenog citokina od strane stanica primarnog tumora. Tumori s potvrđenom ekspresijom CXCL12 su folikularni limfom, karcinom pankreasa, karcinom ovarija, gliom i astroцитom. Prema analogiji uloge CXCL12 u koštanoj srži, visoka koncentracija CXCL12 u primarnom tumoru, mogla bi zadržavati tumorske stanice in situ, odnosno ograničiti im diseminaciju (75,76). Spearmanovim testom, u ovom radu, pokazana je niska korelacija navedenih citokina u sva tri ispitivana tumorska područja.

Oba ispitivana kemokina - CXCR4, (mjeren u jezgri i citoplazmi) i CXCL12 korelirana su s veličinom tumora, statusom limfnih čvorova, gradusom tumora i tumorskom lokalizacijom. Statističkom obradom podataka nije nađena statistički značajna razlika za navedene parametre, osim za međuodnos citokina CXCL12 mjerenog u centru tumora i gradusa tumora, u smislu značajno niske ekspresije kod niskog tumorskog gradusa. Nepostojanje korelacije s pozitivnim statusom limfnih čvorova u suprotnosti je s drugim

radovima koji povezuju ekspresiju kemokinskih receptora s metastazama u limfne čvorove. Visok nuklearni izražaj CXCR4 značajno korelira s N0, odnosno nemetastaziranjem u limfne čvorove. Pretpostavka je da drugačija lokalizacija istog kemokinskog receptora (nuklearni, citoplazmatski) ima drugačije biološko ponašanje za metastatski potencijal karcinomskih stanica (83). Veća nuklearna ekspresija CXCR4 kod manjeg tumora, znači manju invadiranost limfnih čvorova. Kod pacijenata s ranim ne-malim karcinomom pluća, pacijenti s jakim CXCR4 bojenjem u jezgri tumorskih stanica imaju bolji ishod (84). Dakle, izgleda da drugačija lokalizacija kemokinskih receptora, nuklearnog i citoplazmatskog, ima različito biološko značenje za metastatski potencijal karcinomskih stanica. Nepovezanost gradusa tumora i citokinske ekspresije možemo objasniti podjednakom raspodjelom gradusa. Od našeg uzorka gotovo polovica pacijenata (47%) imala je umjeren histološki gradus tumora (G2), dok je ostatna polovica imala podjednaku raspodjelu niskog i visokog tumorskog gradusa (G1 i G3). Navedeni rezultati ne-koreliranja mogu se tumačiti kroz relativno male skupine bolesnika, koje ostaju nakon podjele materijala u 3 podskupine (transformacijska zona, centar tumora i invazivni rub). Takve skupine su nehomogene po svom sastavu, odnosno obuhvaćaju bolesnike različitih veličina tumora, statusa limfnih čvorova, gradusa i lokalizacije. Možda bi narednim istraživanjem trebalo povećati ukupan broj ispitivanih pacijenata, kako bi i broj homogenih skupina bio veći, te bi time i rezultati bili pouzdaniji. Navedeni problem djelomično rješava uporaba rpart statističkog programa, koji se koristi za izgradnju klasifikacijskih i regresijskih modela, zbog sposobnosti opisa kompleksnih interakcija. Uporabom rparta dobiveno je stablo odluke s tri čvora odluke. Stablo odluke treba tumačiti na

slijedeći način: u prvom čvoru odluke bolesnici su podijeljeni u dvije podskupine: (a) bolesnici s veličinom primarne neoplazme T1; (b) bolesnici s veličinom neoplazme T2, T3, T4. Ako se hazard u svih bolesnika označi s 1, tada relativni rizik umiranja kod bolesnika s T1 iznosi 0.79, dok je kod bolesnika s T2, T3 i T4 taj broj 1,92. Razlika među skupinama je statistički signifikantna po kriteriju log-rank testa ( $p = 0,013$ ). U drugom čvoru odluke bolesnici s T1, T2 i T3 su podijeljeni prema vrijednosti citokina CXCR4 u jezgri tumorskih stanica u invazivom rubu tumora u dvije podskupine : (a) izraženost CXCR4 u jezgri 0 i (b) izraženost CXCR4 u jezgri 1, 2 i 3. Relativni rizik umiranja kod izraženosti CXCR4 u jezgri razine 0 je 0.31, a kod izraženosti CXCR4 u jezgri razine 1, 2 i 3 je 0,950. Razlika među skupinama nije signifikantna po kriteriju log-rank testa ( $p = 0,111$ ). U trećem čvoru su bolesnici s razinom aktivnosti jezgrinog CXCR4 1, 2 i 3 podijeljeni u dvije podskupine prema razini CXCL12 u invazivnom rubu tumora: (a) izraženost CXCL12 3 i (b) izraženost CXCL12 0, 1 i 2. Relativni rizik umiranja kod izraženosti CXCL12 razine 3 je 0.47, a kod izraženosti CXCL12 razine 0, 1 i 2 je 1,08. Razlika među skupinama nije signifikantna po kriteriju log-rank testa ( $p = 0,346$ ).

Ovo istraživanje implicira da bi pri određivanju suvremenih prognostičkih čimbenika moglo biti važno pomno birati dio tumora koji se obrađuje pri patohistološkoj dijagnostici jer naizgled uniforman tumor pokazuje znatnu heterogenost, te postoje različite zone koje se razlikuju po svojim metastatskim i invazivnim karakteristikama. Stoga bi dijagnoza, a pogotovo očekivano biološko ponašanje karcinoma moglo varirati ovisno o izabranom

dijelu tumora. To naročito dobiva na značenju ako bi, na temelju toga odlučivali o liječenju pacijenata novijim biološkim („pametnim“) agensima. Različita ekspresija ujedno implicira i različiti metastatski i invazivni potencijal zbog promjene u karakteristikama tumora, možda zbog utjecaja mikrookoliša. Metastaziranje je vodeći uzrok smrti među pacijentima oboljelima od karcinoma. Još nije jasno zašto određeni karcinomi preferiraju specifična mjesta, ali se zna da su kemokini uključeni u proces organ-specifičnog, a ne nasumičnog metastaziranja (65,66,82,85,86). Uloga citokina i njihovih receptora u ljudskim karcinomskim stanicama je kompleksna i tek djelomično razumljiva. Pojednostavljeno bi bilo govoriti o tome da kemokini sami određuju nastanak i mjesta metastaziranja. Molekule poput adhezijskih, proteaze, angiogenetski faktori i drugi činitelji tumorskog mikrookoliša također bi mogli imati utjecaj na proces metastaziranja. U tom svjetlu treba sagledati naše rezultate i razliku u ekspresiji među pojedinim zonama. Na razliku u zonama treba gledati kao polagano stvaranje, napredovanje i rast mikrookoliša tumora koji si stvara put za daljnje širenje. Lokalno nastali kemokini možda vode određene molekule preferirano prema ciljnom metastatskom mjestu, ali druge adhezijske molekule također utječu na mjesto njihovog konačnog odredišta. Tumorske stanice različito reagiraju na kemokine, te one i njihovi receptori zajedno sudjeluju u koordiniranom modelu s adhezijskim molekulama, određujući mogućnost tumorskih stanica da invadiraju i koloniziraju druga tkiva. Veza CXCR4/CXCL12 možda igra centralnu ulogu u širenju i progresiji mnogih tipova tumora. Neutralizacija interakcije CXCR4 i CXCL12 *in vivo* značajno ometa proces metastaziranja karcinoma dojke u regionalne limfne čvorove i pluća (66). O citokinu CXCR4 i njegovom značenju u karcinomskoj

metastazi još se raspravlja, jer se čini da nema razlike u ekspresiji CXCR4mRNK u karcinomu kolona, jednaka i gastričnim karcinomima u usporedbi s nekanceroznim tkivima (88,89). Aktivacija NF-κB povećava ekspresiju CXCR4 u karcinomu dojke, dakle, može promovirati staničnu migraciju i metastaziranje (90). Jača ekspresija CXCR4 korelira sa slabijom prognozom u ezofagealnom i nazofaringealnom karcinomu (91,92). Ekspresija CXCR4 značajno je veća u grupi pacijenata s metastazama u limfne čvorove nego u onih u kojima nema metastaza u karcinomu larinksa (93).

Daljnje studije su potrebne za definiranje razlike u prognozi kod nuklearne i citoplazmatske ekspresije CXCR4 u karcinomskim stanicama zbog teoretske mogućnosti antitumorskog liječenja koje bi za cilj postavilo normaliziranje razine citokina CXCR4 i ostalih dijelova kompleksa u cilju smanjivanja ili blokiranja invazivnosti tumora. Pri tome bi trebalo obratiti pažnju na intratumorsku heterogenost citokina. Moguće je da najjača ekspresija CXCR4 te CXCL12 u invazivnoj zoni olakšava tumoru infiltraciju i širenje. Potencijalno bi se na taj način mogli diferencirati tumori po njihovoj sposobnosti metastaziranja i invazije. To bi nam omogućilo predviđanje učinka terapije i prognozu liječenja određenog tumora što bi bio važan korak u izlječenju karcinoma larinksa.

Neslaganje dijela naših rezultata o citokinskoj ekspresiji i onih, drugih grupa, moguće je objasniti našim promatranjem intratumorske heterogenosti. Stoga bi bilo važno ove rezultate potvrditi na većem uzorku. Dodatna istraživanja su potrebna kako bi se zaključilo postoji li uistinu statistički značajna korelacija

između klasičnih prognostičkih čimbenika i ekspresije citokina CXCR4 i CXCL12, te njihova stvarna prognostička vrijednost.



## 6. ZAKLJUČCI

1. citokini CXCR4 i CXCL12 pokazuju ekspresiju u planocelularnim karcinomima grkljana
2. za citokin CXCR4 izraženija je jezgrina od citoplazmatske ekspresije
3. postoji statistički značajna razlika u ekspresiji jezgrinog CXCR4 u tumorskim stanicama transformacijske zone i centra tumora, tako da je najniža koncentracija prisutna u centru tumora
4. ekspresija citoplazmatskog CXCR4 nije dala statistički značajnu razliku u 3 različite tumorske zone
5. ekspresija CXCL12 statistički je značajno različita pokazujući visoke vrijednosti u invazivnom rubu tumora u odnosu na centar tumora i transformacijsku zonu
6. različitom ekspresijom citokina CXCR4 i CXCL12 u tri tumorske zone potvrđena je pretpostavka o tumoru kao heterogenom modelu
7. korelacija međuodnosa CXCR4 i CXCL12 nije se pokazala statistički značajnom
8. korelacija ekspresije navedenih citokina s klasičnim prognostičkim parametrima (TNM klasifikacija, status limfnih čvorova, gradus tumora i lokalizacija) nije statistički značajna, osim korelacije ekspresije citokina CXCL12 u centru tumora i gradusa tumora, na način da je niska ekspresija navedenog citokina češća kod tumora skupine G1
9. statističkom obradom podataka pomoću sustava rpart dobiven je 3x viši relativni rizik umiranja bolesnika s pozitivnom ekspresijom jezgrinog CXCR4 u invazivnom rubu tumora u odnosu na CXCR4 negativne tumore

10. relativni rizik umiranja bolesnika s CXCL12 visokom pozitivnošću (razine 3), u odnosu na one razine 0, 1 i 2 u invazivnom rubu tumora je dvostruko manji

## 7. SAŽETAK

Invazija tumorskih stanica regulirana je, između ostalog, specifičnim kemokinima koji pripadaju obitelji citokina. Transmembranski kemokinski receptor CXCR4 prisutan je u većini tipova karcinoma, s ekspresijom u jezgri i/ili citoplazmi tumorskih stanica. CXCL12 je dio obitelji kemokina, prisutan u citoplazmi tumorskih stanica, koji se veže na CXCR4, ali se, po novijim istraživanjima izlučuje i autonomno u tumoru, te je kombinacija djelovanja CXCR4 i CXCL12 uključena u stimulaciju metastatskog puta različitih neoplazmi. Većina istraživanja prognostičkih čimbenika polazi od pretpostavke da je tumor homogen model i da je ekspresija pojedinih biljega ista u svim njegovim dijelovima. Neka istraživanja uzela su u obzir intratumorsku heterogenost, odnosno postojanje višestrukih abnormalnih staničnih linija u različitim dijelovima jednog tumora. Heterogenost planocelularnog karcinoma larinksa slabo je poznata, kao i postojanje ekspresije kemokina CXCR4 i CXCL12. U ovo istraživanje bilo je uključeno 90 bolesnika operiranih na Klinici za bolesti uha, nosa i grla i kirurgiju glave i vrata KBC Zagreb u periodu od 2000. do 2005. godine. Patohistološka dijagnoza postavljena je na Kliničkom zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Svi bolesnici podvrgnuti su totalnoj laringektomiji, a niti kod jednog nije provedena preoperativna terapija zračenjem ili kemoterapijom. Rezultati rada pokazuju da planocelularni karcinom grkljana izražava citokine CXCR4 u jezgri i citoplazmi tumorskih stanica, te da je jače izražen jezgrin, u odnosu na citoplazmatski pozitivitet. Početna hipoteza o tumoru kao heterogenom modelu, potvrđena je na način da je u jezgri mjeren CXCR4, kao i CXCL12 statistički značajno

različit u tri različite tumorske regije (transformacijska zona, centar tumora i invazivni rub), s najnižom koncentracijom u centru tumora, a najvišom u transformacijskoj zoni za CXCR4, odnosno u invazivnom rubu za CXCL12. Citoplazmatski mjeren CXCR4 ne pokazuje statistički signifikantnu razliku u distribuciji između tri navedene zone. Korelacija ekspresije navedenih citokina s klasičnim prognostičkim parametrima (TNM klasifikacija, gradus tumora i lokalizacija) nije statistički značajna, osim korelacije ekspresije citokina CXCL12 u centru tumora i gradusa tumora, na način da je niska ekspresija navedenog citokina češća kod tumora skupine G1. Statističkom obradom podataka pomoću sustava rpart dobiven je trostruko viši relativni rizik umiranja bolesnika s pozitivnom ekspresijom jezgrinog CXCR4 u invazivnom rubu tumora u odnosu na CXCR4 negativne tumore. Relativni rizik umiranja bolesnika s CXCL12 visokom pozitivnošću (razine 3), u odnosu na one razine 0, 1 i 2 u invazivnom rubu tumora je dvostruko manji. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se zaključilo postoji li uistinu statistički značajna korelacija između klasičnih prognostičkih čimbenika i ekspresije citokina CXCR4 i CXCL12, te njihova stvarna prognostička vrijednost.

## **8. SUMMARY**

### **INTRATUMORAL HETEROGENEITY OF CXCR4 AND CXCL12 EXPRESSION AND THEIR PROGNOSTICAL VALUE IN LARYNGEAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA**

The study includes 90 patients operated on squamous cell laryngeal carcinoma, who all had total laryngectomy, without preoperative radiation or chemotherapy. The results show that laryngeal squamous cell carcinoma express nuclear and cytoplasmatic expression of CXCR4, but nuclear expression is more prominent. The nuclear CXCR4 and CXCL12 expression is different in three different tumoral zones (transformational region, center of the tumor and the invasive margin). The lowest expression of CXCR4 and CXCL12 was in the center of the tumor, and the highest in the transformational region and in the invasive margin for CXCR4 and CXCL12, respectively. The correlation of expression of CXCR4 and CXCL12 with classical prognostic parameters (TNM classification, histological gradus and localization) is not statistically significant, except the correlation between low CXCL12 expression in the center of the tumor and histological gradus 1. Rpart statistical system got three times higher relative risk of death in the patients with positive expression of nuclear CXCR4 in the invasive margin of the tumor, in relation to CXCR4 negative tumors. Relative risk of death in the patients with highest

CXCL12 positivity in the invasive margin of the tumor is two times decreased.

Additional investigations are needed to confirm this work.

Sandra Kojić Katović, 2011.

## 9. LITERATURA

1. Katić V, Kekić B, ur. Otorinolaringologija. Zagreb: Ljevak; 2004, str.251-253.
2. Junqueira LC, Carneiro J, ur. Osnove histologije. Zagreb: Školska knjiga; 2005, str. 353-354.
3. Sadler TW, ur. Medicinska embriologija. 10. Izd. Zagreb: Školska knjiga; 2008, str. 197-199.
4. Hrvatski zavod za javno zdravstvo: Incidencija raka u Hrvatskoj 2007. Bilten broj 32, Zagreb, 2009.
5. UICC. Priručnik kliničke onkologije. Zagreb: Karitas; 1992, str. 159-173.
6. Katić V, Prgomet D, ur. Otorinolaringologija i kirurgija glave i vrata. Zagreb: Ljevak; 2009, str. 293-297.
7. Garas J, McGuirt WF. Squamous cell carcinoma of the subglottis. Am J Otolaryngol. 2006;27(1):1-4.
8. Koufman JA, Bourke AJ. The etiology and pathogenesis of laryngeal carcinoma. Otolaryngol Clin North Am. 1997;30(1):1-19.
9. Myers EN, Suen JY. Cancer of the larynx. Cancer of the Head and Neck. 1996;403-406.
10. Robbins KC. Osnove patologije. 2. Izd. Zagreb: Školska knjiga; 1994, str. 435-436.

11. Silverberg SG. Principles and practise of surgical pathology. Edinburgh, London, Melbourne and New York: Churchill Livingstone; 1990, str. 627-647.
12. Kissane JM, Anderson WAD. Andersons pathology. Izd. St. Louis: Mosby Co.; 1990, str. 1084-1087.
13. Padovan I. Otorinolaringologija 3, Kirurgija usne šupljine, ždrijela, grla i vrata. Zagreb: Školska knjiga; 1987, str. 287-291.
14. Ćorić M. Intratumorska heterogenost ekspresije katepsina D, ciklina D1, NM23 i NM23H1 gena u planocelularnom karcinomu grkljana. Doktorska disertacija, Zagreb, 2004.
15. Almadori G, Galli J, Cadoni G and al. Prospects and therapeutic decisions in the light of biological findings in laryngeal cáncer. Acta Otorhinolaryngol Ital 2000;20:407-412.
16. 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;2005:107-208.
17. Beahrs OH, Myers MH. Manual for staging of cancer, American Joint Committee on Cancer. 2. Izd. Philadelphia: J.B. Lippincot Co.; 1983, str. 38-39.
18. Carey TE. Field cancerization: are multiple primary cancers monoclonal or polyclonal? Ann Med 1996;28:183-188.
19. Chung KY, Mukhopadhyay T, Kim J et al. Discordant p53 gene mutations in primary head and neck cancers and corresponding second primary cancers of the upper aerodigestive tract. Cancer Res 1993;53:1676-1683.



20. Bosch FX, Ritter D, Enders C et al. Head and neck tumor sites differ in prevalence and spectrum of p53 alterations but these have limited prognostic value. *Int J Cancer* 2004;111:530-538.
21. Maurizi M, Scambia G, Benedetti Panici P et al. EGF receptor expression in primary laryngeal cancer: correlation with clinicopathological features and prognostic significance. *Int J Cancer* 1992;52:862-866.
22. Maurizi M, Almadori G, Ferrandina G et al. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in laryngeal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 1996;74:1253-1257.
23. Almadori G, Cadoni G, Galli J et al. Epidermal growth factor receptor expression in primary laryngeal cancer; an independent prognostic factor of neck node relapse. *Int J Canc* 1999;84:188-191.
24. Rubin Grandis J, Melhem MF, Gooding WE et al. Levels of TGF-alpha and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:824-832.
25. Wen QH, Miwa T, Yoshizaki T et al. Prognostic value of EGFR and TGF-alpha in early laryngeal cancer treated with radiotherapy. *Laryngoscope* 1996;106:884-888.
26. Dassonville O, Formento JL, Francoual M et al. Expression of epidermal growth factor receptor and survival in upper aerodigestive tract cancer. *J Clin Oncol* 1993;11:1873-187
27. Almadori G, Bussu F, Cadoni G et al. Molecular markers in laryngeal squamous cell carcinoma: Towards an integrated clinicobiological approach. *European Journal of Cancer* 2005;41:683-693.

28. Dexter D, Leith J. Tumor heterogeneity and drug resistance. *J Clin Oncol* 1986;4:244-257.
29. Heppner G, Yamashina K, Miller B et al. Tumour heterogeneity in metastasis. *Prog Clin Biol Res* 1986;212:45-59.
30. Heppner G. Tumour heterogeneity. *Cancer Res* 1984;44:2259-2265.
31. Black D. The genetics of breast cancer. *Eur J Cancer* 1994;30(13):1957-1961.
32. Devilee P, Cornelisse C. Somatic genetic changes in human breast cancer. *Biochim Biophys Acta* 1994;1198(2-3):113-130.
33. El Ashry D, Lippman M. Molecular biology of breast carcinoma. *World j Surg* 1994;18:12-20.
34. Ford D, Easton D. The genetics of breast and ovarian cancer. *Br J Canc* 1995;72(4):805-812.
35. O'Connell P, Pekkeli V, Fuqua S et al. Molecular genetic studies of early breast cancer evolution. *Breast Cancer Res Treat* 1994;32:5-12.
36. Andersen CL, Wiuf C, Kruhoffer M et al. Frequent occurrence of uniparental disomy in colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2007;28:38-48.
37. Kai W, Jian L, Shengting L et al. Estimation of tumor heterogeneity using CGH array data. *BMC Bioinformatics* 2009;10:12.
38. Ćorić M, Ladika-Davidović B, Bumber Z et al. Prognostic significance of DNA cytometry in combination with AgNO<sub>3</sub> investigation. *Acta Otolaryngol* 2007;12:1332-1337.
39. Carey FA, Lamb D, Bird CC. Intratumoral heterogeneity of DNA content in lung cancer. *Cancer* 1990;65:2266-2269.

40. Kallioneni OP. Comparison of fresh and paraffin-embedded tissue as starting material for DNA flow cytometry and evaluation of intratumoral heterogeneity. *Cytometry* 1988;9:164-169.
41. Ljungberg B, Stenling R, Roos G. DNA content in renal cell carcinoma with reference of tumor heterogeneity. *Cancer* 1985;56:503-508.
42. Jacob R, Welkoborsky HJ, Mann WJ et al. Heterogeneity of squamous cell carcinoma of the head and neck – analysis of tumor biologic factors and proliferation rates. *Laryngoscope* 1996;106:1170-1175.
43. Pathak S. Cytogenetic abnormalities in cancer: with special emphasis on tumor heterogeneity. *Cancer and Metastasis Reviews* 1990;8:299-318.
44. Nowell PC. Mechanisms of tumor progression. *Cancer Research* 1986;46:2203-2207.
45. Sandberg AA. The chromosomes in human cancer and leukemia. Elsevier North Holland, New York, 1980.
46. Pathak S. Chromosome constitution of human solid tumors. *Cancer Bull* 1983;35:126-131.
47. El-Naggar AK, Lopez-Varela V, Luna MA et al. Intratumoral DNA content heterogeneity in laryngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1992;118(2):169-173.
48. Gandour-Edwards R, Donald PJ, Yu TLC et al. DNA content of head and neck squamous carcinoma by flow and image cytometry. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994;120(3):294-297.
49. Pick A, Chiusa L, Navone R. Prognostic relevance of cell proliferation in head and neck tumors. *Ann Oncol* 2004;15(9):1319-1329.

50. Ladika-Davidović B, Ćorić M, Bura M et al. Heterogeneity of DNA content in laryngeal squamous cell carcinoma in relation to histopathological variables. *Acta oto-laryngologica* 2009;129(7):768-773.
51. Laing KJ, Secombes CJ. Trout CC chemokines: comparison of their sequences and expression patterns. *Molec. Immunol* 2004;41:793-808.
52. Rostene W, Buckingham J. Chemokines as modulators of neuroendocrine functions. *Journal of Mol Endocrinol* 2007;38:351-353.
53. Salamonsen LA, Hannan NJ, Dimitriadis E. Cytokines and chemokines during human embryo implantation. *Semin Reprod Med* 2007;25(6):437-444.
54. Beider K, Abracham M. Chemokines and chemokine receptors in stem cell circulation. *Frontiers in Bioscience* 2008;13:6820-6833.
55. Li M, Ransohoff RM. The roles of chemokine CXCL12 in embryonic brain tumor angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 2009;19(2):111-115.
56. Goda C, Kanaji T, Kanaji S et al. Involvement of IL-32 in activation-induced cell death in T cells. *Int Immunol* 2006;18(2):233-240.
57. Vila-Coro AJ, Rodrigues-Frade JM, Martin de Ana A et al. The chemokine SDF-1 alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *FASEB J* 1999;13:1699.
58. Devalaraja MN, Richmond A. Multiple chemotactic factors: fine control or redundancy? *Trends Pharmacol Sci* 1999;20:151-156.
59. Taub D.D., Proost P, Murphy WJ et al. Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), -2 and -3 are chemotactic for human T lymphocytes. *J Clin Invest* 1995;95(3):1370-1376.

60. Locati M, Bonecchi R, Corsi MM. Chemokines and their receptors: roles in specific clinical conditions and measurement in the clinical laboratory. *Am J of Clin Pathol* 2005;123:82-95.
61. Comerford I, Litchfield W, Harata-Lee Y. Regulation of chemotaxis network by „atypical“ receptors. *BioEssays* 2007;29(3):237-247
62. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. [www.nature.com/reviews/cancer](http://www.nature.com/reviews/cancer)
63. Balkwill F. The significance of cancer cell expression of CXCR4. *Semin Cancer Biol* 2004;14:171-179.
64. Scotton CJ, Wilson JL, Milliken D, Stamp G and Balkwill FR. Epithelial cancer cell migration: a role of chemokine receptors? *Cancer Res* 2001;61:4961-4965.
65. Kijima T. Regulation of cellular proliferation, cytoskeletal function and signal transduction through CXCR4 and c-Kit in small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 2002;62:6304-6311.
66. Muller A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001;410:50-56.
67. Sun Y. Expression of CXCR4 and CXCL12 in human prostate cancers in vivo. *J Cell Biochem* 2003;89:462-473.
68. Jordan NJ. Expression of functional CXCR4 chemokine receptors on human colonic epithelial cells. *J Clin Invest* 1999;104:1061-1069.
69. Bachelder RE, Wendt MA, Mercurio AM. Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4. *Cancer Res* 2002;62:7203-7206.

70. Staller P. Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel Lindau tumor suppressor pVHL. *Nature* 2003;425:307-311.
71. Libura J. CXCR4-SDF-1 signaling is active in rhabdomyosarcoma cells and regulates locomotion, chemotaxis and adhesion. *Blood* 2002;100:2597-2606.
72. Burger JA, Kipps TJ. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their environment. *Blood* 2006;107:1761-1767.
73. Ching-Ting T, Chia-Yu C, Ying-Chang L et al. CXCL12/CXCR4 promotes laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinoma metastasis through MMP-13-dependent invasion via the ERK1/2/AP-1 pathway. *Carcinogenesis* 2008;29:1519-1527.
74. Tokoyoda K, Egawa T, Sugiyama T, Choi BI, Nagasawa T. Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity* 2004;20:707-718.
75. Omm A, Gupta PB, Sgroi DC et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 2005;121:335-348.
76. Lapidot T, Kollet O. The essential roles of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in human stem cells homing and repopulation of transplanted immune-deficient NOD/SCID and NOD/SCID/B2m mice. *Leukemia* 2002;16:1992-2003.
77. Geminder H, Sagi-Assif O, Goldberg L et al. A possible role for CXCR4 and its ligand, the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1 in the development of bone marrow metastases in neuroblastoma. *The J of Immunology* 2001;167:4747-4757.

78. Therneau TM, Grambsch PM. Modeling survival data: Extending the Cox model. Springer, New York, 2000, str. 7-38.
79. Therneau TM, Atkinson EJ- An Introduction to recursive partitioning: Using the RPART routines. Mayo Foundation, Stanford, 1997.
80. Jonkman A, Kaanders JHA, Terhaard CHJ et al. Multicenter validation of recursive partitioning analysis classification for patients with squamous cell head and neck carcinoma treated with surgery and preoperative radiotherapy. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 2007;68(1):119-125.
81. Kodama j, Hasengaowa Kusumoto T, Seki N et al. Association of CXCR4 and CCR7 chemokine receptor expression and lymph node metastasis in human cervical cancer. *Ann Oncol* 2007;18(1):70-76.
82. Schrader AJ, Lechner O, Templin M et al. CXCR4/CXCL12 expression and signalling in kidney cancer. *British Journal of Cancer* 2002;86:1250-1256.
83. Cabioglu OH, Yazici MS, Arun B et al. CCR7 and CXCR4 as novel biomarkers predicting axillary lymphnode metastasis in T1 breast cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11(6):5686-5693.
84. Spano JP, Andre F, Morat L et al. Chemokine receptor CXCR4 and early-stage non-small cell lung cancer: pattern of expression and correlation with outcome. *Ann Oncol* 2004;15(4):613-617.
85. Taichman RS, Cooper C, Keller ET et al. Use of the stromal cell-derived factor 1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer Res* 2002;62(6):1832-1837.

86. Kijima T, Maulik G, Ma PC et al. Regulation of cellular proliferation cytoskeletal function and signal transduction through CXCR4 and c-kit in small lung cancer cells. *Cancer Res* 2002;62(21):6304-11.
87. Hwang JH, Chung HK, Kim DW et al. CXCR4 chemokine receptor 4 expression and function in human anaplastic thyroid cancer cells. *J Clin Endocrinol Metabol* 2003;88:408-416.
88. Mitra P, Shibuta K, Mathai J et al. Impaired, B-lymphopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4 and SDF-1 deficient mice. *Proc Natl Sci USA* 1998;95:9448-9453.
89. Schimanski CC, Schwald S, Simiontonaki N et al. Effect of chemokine receptors CXCR4 and CCR7 on the metastatic behavior of human colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:1743-1750.
90. Helbig G, Christopherson KW 2nd, Bhat-Nakshatri P et al. NF-kappaB promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4. *J Biol Chem* 2003;278(24):2163-2168.
91. Kaifi JT, Yekebas EF, Schurr P et al. Tumor-cell homing to lymph nodes and bone marrow and CXCR4 expression in esophageal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2005;97(24):1840-1847.
92. Wang N, Wu QL, Fang Y. Expression of chemokine receptor CXCR4 in nasopharyngeal carcinoma: pattern of expression and correlation with clinical outcome. *J Trans Med* 2005;3:26.



93. Zhang L, Yang C, Li M. Expression of chemokine receptor CXCR4 and CCR7 in laryngeal carcinoma. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* 2005;19(21):985-7.

## 10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Zagrebu 12. prosinca 1969. godine, gdje sam završila Osnovnu školu Miroslava Krleže i Obrazovni centar za jezike. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 1988., a diplomirala u ožujku 1994. godine. Obavezni dvogodišnji pripravnički staž odradila sam u Općoj bolnici Sveti duh. Nakon položenog državnog ispita kraće vrijeme radim kao liječnik opće medicine u DZ Centar u Zagrebu, a zatim kao liječnik sekundarac na Zavodu za hematologiju KB „Sestre Milosrdnice“. U srpnju 1997. počinjem specijalizaciju kliničke citologije, te 2003. godine polažem specijalistički ispit. Od tada radim kao liječnik specijalist na Kliničkoj jedinici za citologiju KB „Sestre Milosrdnice“. Za vrijeme pripravničkog staža završavam poslijediplomski studij kliničke citologije, a 2000. godine branim magistarski rad „Vrijednost ultrazvučno vođene citološke punkcije u multinodoznoj strumi štitnjače“, pod vodstvom mentorice doc. dr. Mire Halbauer. Tijekom specijalističkog staža bavim se svim područjima citologije, uključujući hematološku, pulmološku, gastroenterološku, urološku, ginekološku, citologiju glave i vrata i dr. Autor sam više znanstvenih članaka i aktivno sudjelujem na domaćim, europskim i svjetskim citološkim kongresima, na nekima kao pozvani predavač.