



### **Središnja medicinska knjižnica**

Ćorić, Marijana (2005) *Intratumorska heterogenost ekspresije katepsina D, ciklina D1, nm23 i nm23 H1 gena u planocelularnom karcinomu grkljana [ Intratumoral heterogeneity of cathepsin D, cyclin D1, nm23 and nm23H1 gene expression in laryngeal squamous cell carcinoma ]*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

<http://medlib.mef.hr/189>

University of Zagreb Medical School Repository

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

**Sveučilište u Zagrebu  
Medicinski fakultet**

**Marijana Ćorić**

**INTRATUMORSKA HETEROGENOST  
EKSPRESIJE KATEPSINA D, CIKLINA D1,  
NM23 i NM23 H1 GENA U  
PLANOCELULARNOM KARCINOMU  
GRKLJANA**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**Zagreb, prosinac 2004. godine**

Ova doktorska disertacija izrađena je na Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta  
Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Svena Seiwerttha.

Redni broj:

Zagreb, prosinac 2004. g.

Mr.sc.dr Marijana Ćorić

Svom mentoru, prof. dr sc. Svenu Seiwerthu iskreno zahvaljujem na nesebičnoj podršci, strpljenju i pomoći tijekom izrade ovog rada.

Također od srca zahvaljujem mr.sc.dr Pašku Konjevodi na izradi statističke analize podataka te na stručnim savjetima.

Zahvaljujem se djelatnicima histokemijskog laboratorija, kao i laboratorija za molekularnu dijagnostiku na trudu pri izradi i obradi materijala.

Zahvaljujem svim studentima, kolegama i prijateljima koji su mi na bilo koji način pomogli da ovaj rad privedem kraju.

Zahvalna sam i svojoj obitelji bez čije podrške i razumijevanja ne bih završila ovaj rad.

I na kraju, zahvaljujem svojoj sestri na prijateljstvu i podršci te joj zato posvećujem ovaj rad.

## POPIS SKRAĆENICA

LOH – gubitak heterozigotnosti

DNK - deoksiribonukleinska kiselina

RNK - ribonukleinska kiselina

rDNK - ribosomska deoksiribonukleinska kiselina

WHO - Svjetska zdravstvena organizacija

TNM – tumor (T), limfni čvorovi (N), metastaze (M)

(p)TNM – patološki TNM

AJCC – American Joint Comity on Cancer

nm23 – tumor supresor gen

KM krivulje – Kaplan – Meierove krivulje

Ki-67 – proliferacijski marker

EFGR – receptor za epidermalni čimbenik rasta

AgNOR – argirofilna regija nukleolarnog organizatora

TRF – transferinski receptor

p53 – gen prigušivač tumora

PCNA – antigen jezgara proliferirajućih stanica

HER 2/neu (c-erb-2) - onkogen

## **SADRŽAJ**

1. UVOD .....	1
1.1. Grkljan .....	1
1.2. Tumori grkljana .....	2
1.2.1. Topografija.....	4
1.2.2. Histopatologija.....	6
1.3. Prognostički čimbenici karcinoma grkljana .....	7
1.3.1. Klasični prognostički čimbenici .....	8
1.3.1.1. Klinička TNM klasifikacija .....	8
1.3.1.2. Tipovi stanične diferencijacije .....	11
1.3.2. Značaj prognostičkih čimbenika .....	12
1.4. Noviji prognostički čimbenici .....	13
1.5. Tumorska heterogenost .....	14
1.5.1. Mogući mehanizmi tumorske heterogenosti .....	15
1.5.2. Heterogenost planocelularnog karcinoma grkljana .....	17
1.5.3. Mogući utjecaj na prognostičke parametre.....	17
1.6. Katepsin D .....	18
1.7. Ciklin D1 .....	21
1.8. Nm23 .....	21
1.9. Gubitak heterozigotnosti nm23 gena .....	22
2. CILJ RADA .....	23
3. BOLESNICI I METODE.....	24
3.1.Bolesnici .....	24

3.2. Metode .....	28
3.2.1. Imunohistokemija .....	28
3.2.2. Gubitak heterozigotnosti nm23 gena .....	34
3.3. Statistička analiza .....	35
4. REZULTATI .....	36
4.1. Katepsin D .....	36
4.2. Ciklin D1 i nm23 .....	38
4.3. Gubitak heterozigotnosti nm23 gena .....	40
4.4. Usporedba tumorskih zona .....	41
4.5. Kaplan – Meierove krivulje preživljenja .....	43
4.5.1. KM za katepsin D .....	47
4.5.2. KM za ciklin D1 i nm23 .....	54
4.6. Korelacija parametara s klasičnim prognostičkim čimbenicima .....	61
4.7. Rezultati algoritamske analize .....	71
5. RASPRAVA.....	74
6. ZAKLJUČCI.....	82
7. SAŽETAK .....	84
8. SUMMARY .....	86
9. LITERATURA.....	88
10. ŽIVOTOPIS .....	99

# 1. UVOD

## 1.1. Grkljan

Grkljan je cjevasti organ čija je primarna funkcija respiracija, a sekundarna fonacija. Anatomski je građen za svoju prvotnu ulogu, a tek je naknadno prilagođen, tijekom evolucije, za fonaciju (1). Funkcija grkljana je i zaštita respiratornih putova od stranih tijela, a omogućena je postojanjem triju sfinktera. Fonacija, kao sekundarna uloga, razvila se iz refleksnog zatvaranja grkljana, razvojem središnjeg živčanog sustava, a i boljom diferencijacijom perifernih organa, što je omogućilo prilagodbu svih organa koji sudjeluju u funkciji fonacije (2).

Osnova grkljana nastaje u četvrtom tjednu embrionalnog života na ventralnoj strani kaudalnog dijela škržnog crijeva, dušnika i pluća u obliku divertikuloidnog izbočenja. Izduženjem tog izbočenja u kaudalnom smjeru nastane laringotrahealna cijev. Kranijalni kraj te cijevi otvara se u ždrijelo pomoću uskog otvora (primitivni *aditus laryngis*), dok kaudalni kraj završava slijepo. Od kranijalnog dijela laringotrahealne cijevi razvijaju se grkljan i dušnik, a od kaudalnog dijela kad se podijeli na dvije grane, bronhi i pluća (3).

Histološki, s unutrašnje strane grkljana nalazi se sluznica prekrivena višerednim cilindričnim epitelom s trepetiljkama u koji su uklopljene vrčaste stanice i tubuloalveolarne žlijezde (1). U lamini propriji smještene su grkljanske hrskavice, od kojih su veće hrskavice hijaline (tiroidna, krikoidna i najveći dio aritenoidnih), a manje elastične (epiglotis, kuneiformna, kornikulata i vrhovi aritenoidnih). Epiglotis ima dvije plohe: jezičnu i grkljansku. Cijela jezična strana i dio grkljanske strane uz vršak, obloženi



su višeslojnim pločastim epitelom. Prema bazi grkljanske strane epiglotisa taj epitel prelazi u višeredni cilindrični s trepetljikama. Ispod epitela nalaze se mješovite seromukozne žlijezde (4). Ispod epiglotisa, sluznica stvara dva parna nabora koji strše u lumen grkljana. Gornji par čine lažne glasnice (vestibularni nabori), obložene tipičnim respiracijskim epitelom, ispod kojega se u lamini propriji nalaze brojne serozne žlijezde (4). Donji par nabora čine prave glasnice, gdje se u lamini propriji nalaze veliki snopovi usporednih elastičnih vlakana, koji su obloženi višeslojnim pločastim epitelom, otpornijim na mehanička oštećenja od višerednog cilindričnog epitela (1).

## **1.2. Tumori grkljana**

Među malignim tumorima grkljana najčešći je klasični oblik planocelularnog karcinoma. Rjeđe se pojavljuju: verukozni planocelularni karcinom, planocelularni karcinom vretenastih stanica, bazaloidni planocelularni karcinom, adenokarcinom, adenoidni cistični karcinom, neuroendokrini karcinomi (tipični karcinoid, atipični karcinoid i karcinom sitnih stanica) te maligni tumori vezivnog tkiva koji su vrlo rijetko lokalizirani u grkljanu (5,6). Prepoznavanje ovih malignih neoplazmi važno je jer se njihovo biološko ponašanje često razlikuje od klasičnog planocelularnog karcinoma (7).

Uzrok karcinoma grkljana nije poznat, ali na njegov nastanak utječu različiti vanjski čimbenici kojima je izložena sluznica grkljana, a uz to i neki unutrašnji čimbenici. Gornji aerodigestivni trakt u izravnom je dodiru s brojnim mogućim kancerogenim tvarima (dim, pare, tekućine, hrana, prašine) (8). Etiološki se karcinomi grkljana dovode u svezu s pet različitih čimbenika: pušenje, kiseline, sepsa, začini i sifilis (9). Udisanje dima cigareta izaziva preneoplastične, neinvazivne lezije, ali i invazivne karcinome grkljana. Cigarete i alkohol zajedno su vrlo snažni kancerogeni činitelji u

nastanku ovih karcinoma (10). Rizik je razmjerno proporcionalan s količinom koja se unosi. Svaki od navedenih agenasa može pridonijeti dvostrukom, odnosno trostrukom povećanju rizika; ako se udruže, rizik se može povećati za više od petnaest puta (11). Sam alkohol je u direktnoj korelaciji sa supraglotičkim, ali ne i glotičkim karcinomom. Osim toga, radnici izloženi azbestu, niklu, ili oni koji rade u drvnoj industriji imaju također veću incidenciju nastanka karcinoma grkljana (9). Pacijenti s karcinomom grkljana imaju povećani rizik za nastanak sekundarnog tumora u gornjem aerodigestivnom traktu ili plućima (12).

Također se sumnja i na genetsku podlogu bolesti, jer je primjećena veća incidencija bolesti kod pojedinih obitelji (11).

Karcinom grkljana češći je u muškaraca nego u žena (13). Učestalost u muškog spola iznosi oko 97 %, a u ženskog najviše 2 do 3%. Udio karcinoma grkljana u ukupnom broju malignih neoplazmi koje se pojavljuju u muškaraca iznosi 2,3 %, a u žena 0,4 % (9). S obzirom na životnu dob u kojoj se karcinom grkljana najčešće pojavljuje, u 70% slučajeva to su bolesnici između pedesete i sedamdesete godine života, oko 12% između četrdesete i pedesete, a 4% između tridesete i četrdesete godine života. Vrlo su rijetki bolesnici mlađi od trideset godina. U dobi između desete i tridesete godine otkriveno je 1 do 2% slučajeva (5).

Prvi klinički simptomi su blagi. Tumor na glasnicama rano uzrokuje promuklost koja se postupno pojačava. Pravilo je da je svaka promuklost koja traje duže od mjesec dana i koja ne reagira na protuupalno liječenje, sumnjiva na karcinom grkljana, pogotovu ako je bolesnik pušač (4). Svojom rastom tumor glasnica može suziti rimu pa će se javiti i smetnje disanja. Daljnji simptom karcinoma ove regije je kašalj i obilna ekspektoracija, nekad uz nešto krvi (11). Bol se obično kasno javi, kao i simptomi fonatorne disfunkcije. Nelagoda ili bol u grlu ili uhu, kašalj, otežano gutanje, dispneja, hemoptiza, povećani

cervikalni čvorovi i gubitak tjelesne težine dodatni su simptomi koji su znak napredovanja bolesti (5). Prodorom kroz kostur grkljana, tumor će se širiti u okolinu. Pri tom se vidi otečeno područje oko grkljana, a ako je tumor probio do kože, ona će biti prožeta tumorom, fiksirana, a zbog popratnih upalnih promjena crvena i otečena (11).

Dijagnoza karcinoma grkljana postavlja se na osnovi kliničke slike, bimanualne palpacije vrata, laringoskopije, laringograma i tomograma grkljana, pokusne ekscizije odnosno patohistološke slike. Za precizno utvrđivanje lokalizacije i proširenosti potrebna je laringomikroskopija, koja je ujedno i najpouzdanija za uzimanje probatorne biopsije. Negativan patohistološki nalaz uz pozitivnu kliničku sliku ne isključuje karcinom te biopsiju treba ponoviti (2).

Nakon što je dijagnoza karcinoma postavljena, određuje se stadij bolesti koji nam govori o prognozi bolesti. Međunarodno prihvatljiv kriterij za utvrđivanje stadija karcinoma je TNM sustav (8). Karcinom grkljana daje limfogene metastaze, ali može rijetko praviti i udaljene hematogene metastaze. One se pojavljuju na plućima, pleuri i vrlo rijetko u kostima (5).

U liječenju karcinoma grkljana dolazi u obzir kirurška terapija, zračenje, citostatici te palijacija. Izbor terapije ovisi o lokalizaciji i proširenosti tumora, patohistološkoj slici i o općem stanju bolesnika (11).

### **1.2.1. Topografija karcinoma grkljana**

Topografski, tumori grkljana dijele se na četiri velike skupine: glotički, supraglotički, subglotički (infraglotički) i transglotički (5).

Glotični prostor uključuje glasnice i prednju komisuru (2) i to je najčešća lokalizacija karcinoma grkljana, s učestalošću oko 60%. Češće se pojavljuju na prednjem

dijelu glasnica. Većinom su to dobro diferencirani planocelularni karcinomi, ali su glasnice ujedno i najčešća lokalizacija *carcinoma in situ* koji se obično pojavi na prednjem kraju glasnica, a mogu se proširiti preko prednje komisure na drugu glasnicu. Za razliku od invazivnog karcinoma grkljana, *carcinoma in situ* grkljana češće nastaje kod muškaraca srednje dobi u obliku diskretnih promjena (13). Ovaj prostor oskudjeva limfnom drenažom te karcinom glotične regije dugo ostaje lokaliziran i bez metastaza. Glotični karcinomi imaju tendenciju širenja po vertikali, ali može invadirati i okolnu unutrašnju laringealnu muskulaturu. Metastaze se pojavljuju kasno, tek kada se tumor proširi izvan glasnica i zahvati duboke limfne čvorove uz velike krvne žile vrata (14).

Supraglotički prostor obuhvaća laringealnu površinu glotisa uključivo s njegovim vrhom, ariepiglotične nabore i mukozu Morgagnijeva ventrikla (12). Učestalost karcinoma ove regije kreće se oko 30% svih karcinoma grkljana. Najčešća lokalizacija karcinoma ove regije je ventrikularni nabor, zatim epiglotis (laringealna strana), a najrjeđe Morgagnijev ventrikul. U praksi se često kasno otkrije te je teško odrediti ishodište tumora. Iz ove regije tumor se može proširiti u glotični i subglotični prostor te izvan grkljana bilo da zahvati i probije štitnu hrskavicu, bilo da se preko glotisa proširi na njegovu faringealnu stranu, u valemule i bazu jezika ili preko ariepiglotičnih nabora u sinus piriformis. Karcinom ventrikularnog nabora može se širiti i prema natrag te zahvatiti i aritenoid. Limfnim žilicama karcinom supraglotične regije metastazira u limfne čvorove vrata, ponajčešće na onu stranu vrata na kojoj je primarni tumor, ali može se proširiti i na drugu stranu. Najčešće budu zahvaćeni limfni čvorovi oko račvišta karotida, rjeđe područje mandibularnog kuta ili supraklavikularne jame (5).

Subglotički (infraglotički) prostor obuhvaća područje ispod glasnica do razine prve trahealne hrskavice (14) i predstavlja rjeđu lokalizaciju karcinoma grkljana s učestalošću oko 5%. Tumor ove regije može se proširiti na glotičku regiju, zahvatiti

dušnik ili prema natrag jednjak. Nerijetko se širi prema naprijed te zahvati štitnjaču. Metastaze se pojavljuju u prelaringealnom i paratrahealnom prostoru te u dubokim limfnim čvorovima vrata. Karcinomi ove lokalizacije imaju najlošiju prognozu (5).

Transglotički karcinomi su također rijetki i čine svega 5% svih karcinoma, a protežu se kroz sve navedene prostore i ispod ventrikula (12).

### **1.2.2. Histopatologija tumora grkljana**

Najčešći histološki tip karcinoma grkljana je planocelularni karcinom, uključujući *carcinoma in situ* i čini oko 90% svih karcinoma. Manje od 10% čine verukozni planocelularni karcinom, planocelularni karcinom vretenastih stanica, anaplastični sitnostanični karcinom, adenokarcinom, adenoidni cistični karcinom, mukoepidermoidni karcinom, melanom i druge nekeratinizirajuće neoplazme (9). Primarni sarkomi čine 0,3-1% svih zloćudnih tumora grkljana. Najčešći je hondrosarkom, koji čini 48% svih sarkoma, dok se rjeđe pojavljuju fibrosarkom, rabdomiosarkom, maligni fibrozni histiocitom, leiomiosarkom, osteogeni sarkom, liposarkom, angiosarkom, hemangiopericitom te sinovijalni sarkom.

Postoje dva tipa karcinoma grkljana, od kojih jedan nastaje direktnim prijelazom iz normalnog tkiva u invazivni karcinom, a drugi nastaje preko *carcinoma in situ* (6).

*Carcinoma 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 (15). Počinje u bazalnom sloju višeslojnog pločastog epitela i karakteriziran je staničnom atipijom, povećanim hiperkromatskim jezgrama, nezrelom keratinizacijom i atipičnim mitozama (16). Osim toga razvijena je i akantoza intrapapilarnih produžetaka epitela. Stanice proliferiraju s jedne strane prema

površinskim slojevima ali i u okolinu žarišta. Za razliku od invazivnog karcinoma, bitna osobina *carcinoma in situ* je što on ne probija bazalnu membranu, tj. ona ostaje intaktna (6).

Planocelularni karcinom nastaje od površinskog višeslojnog pločastog epitela glasnice ili epiglotisa, ali i od respiratornog epitela nakon njegove pločaste metaplazije. Debljina zahvaćenog epitela obično je povećana (akantoza) 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 akantoze i keratinizacije jako se razlikuju. Često bazalni sloj pokazuje rast u dubinu u subepitelijalni sloj zadržavajući pri tom bazalnu laminu intaktnu (15).

Makroskopski karcinom grkljana može imati tri oblika: proliferativni s papilarnim, bradavičastim ili kvrgavim tvorevinama, zatim infiltrativni oblik karcinoma koji se širi najčešće na mjestu gdje je sluznica debela, pri čemu sluznica iznad tumora može dugo vremena biti bez ulceracije te ulcerativna forma koja može nastati na jednoj od predhodnih ili takva može biti od samog početka (5). Većina karcinoma grkljana mjeri u promjeru 1 do 4 cm (15).

### **1.3. Prognostički čimbenici karcinoma grkljana**

Prognostički 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 (primjerice PCNA, Ki-67), regulatorne bjelančevine staničnog ciklusa (primjerice p16, p21, ciklini),

onkogene (pr. p 53), regulatorne bjelančevine apoptoze (primjerice bcl-2/bax) proteinaze (pr. katepsin D), čimbenike koji reguliraju angiogenezu (primjerice vaskularno-endotelni čimbenik rasta - VEGF), AgNOR, sadržaj DNK i druge.

### **1.3.1. Klasični prognostički čimbenici**

#### **1.3.1.1. Klinička TNM klasifikacija karcinoma grkljana**

TNM sustav predstavlja jedinstveni kriterij za procjenu uznapredovalosti većine karcinoma. On podrazumjeva 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 (8). Klinička podjela karcinoma grkljana nastala je kao rezultat kliničkog pregleda bolesnika. 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*

## **Supraglotis**

**T1** Tumor ograničen na područje supraglotisa uz urednu pokretljivost glasnica

**T2** Tumor zahvaća više od jednog područja supraglotisa ili glotisa uz urednu pokretljivost glasnica

**T3** Tumor ograničen na područje grkljana s fiksacijom glasnice i/ili širi se na postkrikoidno područje, medijalni zid piriformnog sinusa ili preepiglотиčni prostor

**T4** Tumor se širi kroz tireoidnu hrskavicu i/ili na druga tkiva oko grkljana, pr. orofarinks, meka tkiva vrata

## **Glottis**

**T1** Tumor ograničen na glasnicu(e) / može se širiti na prednju ili stražnju komisuru s normalnom pokretljivošću

**T1a** Tumor ograničen na jednu glasnicu

**T1b** Tumor zahvaća obje glasnice

**T2** Tumor se širi na supraglotis i/ili glottis, s normalnom ili poremećenom pokretljivošću glasnica

**T3** Tumor ograničen na grkljan s fiksacijom jedne ili obje glasnice

**T4** Tumor se širi kroz tireoidnu hrskavicu i/ili na druga tkiva oko grkljana, pr. orofarinks, meka tkiva vrata

## **Subglottis**

**T1** Tumor ograničen na subglottičnu regiju

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



**T3** Tumor je ograničen na grkljan s fiksacijom jedne ili obje glasnice

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

### **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 većim od 6 cm u najvećem promjeru

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

**N3** Metastaze su u limfnom čvoru većeg promjera od 6 cm

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

**MX** Udaljene metastaze se ne mogu odrediti

**MO** Nema znakova udaljenih metastaza

**M1** Postoje znakovi udaljenih metastaza

Stadij bolesti znači stvarnu rasprostranjenost u njezinom predterapijskom stanju. PTNM, tj. postoperativna histopatološka klasifikacija u skladu s kliničkom klasifikacijom karcinoma grkljana.

### **1.3.1.2. Tipovi stanične diferencijacije karcinoma grkljana**

Postoje tri glavna tipa planocelularnog karcinoma grkljana koji su određeni stupnjem stanične diferenciranosti. Vrijednost ove podjele izdržala je test vremena i brojna istraživanja i 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 perla. 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. Značaj prognostičkih čimbenika

Iako je klinički ishod ovisan o stadiju bolesti, klinički TNM sustav je nesavršen prognostički pokazatelj. Rutinsko histopatološko stupnjevanje također ima određenu prognostičku vrijednost, iako ne može biti glavna odrednica na kojoj se temelji terapija. Unatoč širokoj uporabi klasičnih prognostičkih parametara za karcinom pločastih stanica grkljana, kao što su TNM klasifikacija i histopatološko stupnjevanje, ovdje imaju samo ograničenu vrijednost u predviđanju biološkog ponašanja tog tipa tumora (18).

Za sljedeće čimbenike u raznim je radovima utvrđeno da imaju prognostičko značenje kod karcinoma grkljana:

1. Klinički stadij i lokalizacija tumora djelomično određuje vjerojatnost diseminacije.

Petogodišnje preživljenje je: za glotičke karcinome 80%.

(G I-90%, G II-85%, GIII-60 %, G IV <5%).

- za supraglotičke 65%

(G I-85%, G II-75%, G III-45%, G IV <5%)

- za transglotičke 50%

- za subglotičke 40%.

Između svih supraglotičkih karcinoma oni lokalizirani u ariepiglotičkom naboru imaju najlošiju prognozu.

2. Stupanj diferencijacije tumorskih stanica je neovisan prognostički čimbenik, a razlikujemo; G1 dobro diferencirani, G2 srednje diferencirani i G3 slabo diferencirani karcinom.

3. Veličina tumora je bitan prognostički čimbenik. Tako veći tumori u T1 skupini nakon zračenja češće lokalno recidiviraju.

4. U nekim radovima DNK ploidnost ima prognostički značaj, jer se pokazalo da aneuploidni tumori imaju slabiju prognozu od diploidnih.
5. Zahvaćenost limfnih čvorova također ima prognostički značaj; ako su pozitivni, prognoza ovisi o broju zahvaćenih čvorova, njihovoj veličini i prisustvu ili odsustvu ektranodalnog širenja.
6. U nekim radovima ističe se i reakcija domaćina, jer se smatra da je prisustnost Langerhansovih stanica predstavlja povoljan prognostički čimbenik (12).

Unatoč najširoj uporabi klasičnih prognostičkih parametara (kao TNM i histopatološko stupnjevanje) za karcinom pločastih stanica grkljana i ovdje se nastoji pronaći parametre koji će što je moguće bolje pokazati očekivano ponašanje tumora (18).

#### **1.4. Noviji prognostički čimbenici**

Postoje brojne studije koje istražuju različite novije prognostičke čimbenike koji bi pomogli u predviđanju biološkog ponašanja tumora, na različitim lokalizacijama. U području karcinoma grkljana ispitivane su proteinaze (katepsini B, L i D), zatim proliferacijski markeri (PCNA, Ki-67, EGFR, TFR), onkogeni (p53, c-erbB-2, nm23, ciklin D1) te AgNOR-i i sadržaj DNK. Do sada su različiti noviji čimbenici pokazali određenu prognostičku vrijednost. Primjerice proliferacijski markeri kao što je Ki 67, sadržaj DNK, AgNOR te proteaze, kao primjerice katepsin D (19-23). Također i aktivacija nekih protoonkogeni (primjerice ras), smanjena ekspresija antionkogeni (primjerice p53) (19), kao i poremećaj regulacije regulatornih gena koji kodiraju regulatorne bjelančevine (primjerice ciklina D1) imaju određenu prognostičku vrijednost (24). U nekim radovima naglašena je i uloga nm23H1 gena (25,26). Rezultati navedenih studija većinom pokazuju korelaciju s klasičnim prognostičkim čimbenicima kao što su

veličina tumora, zahvaćenost limfnih čvorova i histološki gradus, a ne mogu se izdvojiti kao nezavisni prognostički čimbenici (27). Jedan od mogućih razloga je i činjenica da su tumori heterogeni što uzrokuje disperziju mjerenih vrijednosti koji su mjereni na histološkoj razini.

### **1.5. Tumorska heterogenost**

Intratumorska heterogenost definira se kao postojanje višestrukih abnormalnih staničnih linija u različitim djelovima jednog tumora ili postojanje diploidnog i aneuploidnog sadržaja DNA. Heterogenost tumorskih stanica razvija se kroz proces progresije ili napredovanja tumora te se može reći da se tumori sastoje od različitih staničnih subpopulacija s različitim biološkim karakteristikama. Već u vrijeme dijagnosticiranja većina tumora sadrži različite populacije stanica s nejednakim osobitostima. Razlike mogu biti izražene u kariotipu, proizvodnji hormona, broju i izraženosti receptora na površini stanične membrane, osjetljivosti na citotoksične lijekove, biokemijske produkte, brzini rasta *in vitro*, invazivnosti te sposobnosti metastaziranja.

Klasični prognostički čimbenici za karcinome grkljana (stadij bolesti, lokalizacija, veličina tumora, stupanj diferencijacije i tip tumorskog rasta) bazirani su na morfološkim i kliničkim osobinama tumora koji tumor obrađuju kao uniformnu masu. U novije vrijeme sve je više evidentno da su tumori heterogeni. Heterogenost sadržaja DNK utvrđena je kod nekih tumora kao što su pluća (28), karcinom dojke i jajnika (29), bubrežni karcinom (30) te karcinom prostate (31).

Maligna transformacija i tumorska progresija predstavljaju niz promjena u kojima više stečenih i konstitucionalnih genetskih defekata dovode do nekontroliranog rasta

tumorskog tkiva (32-35). Priroda i mehanizmi ovih genetskih promjena predmet su intenzivnih istraživanja već duže vrijeme (35,36). Mnoge citogenetske i izoenzimske studije ukazuju na činjenicu da je karcinom genetska bolest. Predpostavlja se da su kromosomske alteracije, posebice translokacija, delecija i inverzija, odgovorne za aktivaciju proto-onkogeni i funkcionalni gubitak nekih tumor supresorskih gena ili anti-onkogeni.

U ranoj fazi bolesti tumor se sastoji od stanica s jednakom kromosomskom građom, što govori o monoklonalnom porijeklu. Primarno kromosomsko oštećenje odgovorno je za malignu transformaciju. Ono može biti uzrokovano translokacijom, delecijom, inverzijom ili točkastom mutacijom, koje su jedinstvene za određeni tip neoplazme. U kasnijoj fazi, tijekom progresije većinom tumori postaju heterogeni. Prijelaz primarno homogene tumorske populacije stanica u heterogenu tumorsku populaciju naziva se tumorska progresija. Sekundarno (ili tercijarno) kromosomsko oštećenje, koje uključuje poremećaj u broju i strukturi kromosoma odgovorno je za tumorsku progresiju, heterogenost tumora i sposobnost metastaziranja. S obzirom da tumorske stanice imaju nestabilnu genetsku strukturu i da su osjetljivi na brojne fizikalne i kemoterapeutske čimbenike ne iznenađuje činjenica da uznapredovali tumori gube monoklonalnost i stječu heterogenu kromosomsku strukturu (37).

### **1.5.1. Mogući mehanizmi tumorske heterogenosti**

Pretpostavlja se da je genetska nestabilnost tumora bitna osnova tumorske heterogenosti (37). Citogenetska istraživanja često otkrivaju istodobno postojanje multiple subpopulacije stanica unutar tumora u tijeku progresije. Ovaj fenomen je dobro

poznat kod kronične mijeloične leucemije, gdje postoji jedna ili više staničnih populacija s citogenetskim defektom uz Philadelphia kromosom u tijeku blastne krize.

Sekundarne kromosomske anomalije (kao one opisane kod kronične mijeloične leukemije) dijele se u dva tipa. Prvi tip je poremećaj broja kromosoma, primjerice trisomija kromosoma 8, nastala neodvajanjem u diobi stanice. Drugi tip su strukturne anomalije, primjerice formiranje izokromosoma 17, i(17Q), koji nastaje u tijeku loma zadanog kromosomskoj DNK.

Moguće je da višestruki mehanizmi utječu na tumorsku progresiju te za posljedicu imaju promjene kako u broju tako i u strukturi kromosoma. Dijele se na prirodene defekte kromosoma, stečene defekte te ekstracelularne čimbenike. Kod prirodnih defekata nestabilnost defektnih kromosoma dovodi do sklonosti određenom tipu karcinoma, što se vidi u nekim sindromima, primjerice ataxia teleangiectasia, Fanconijeva anemia, Bloom-ov sindrom i xeroderma pigmentosum (37). Stečeni defekti kromosoma nastaju pod utjecajem različitih čimbenika kao što su primjerice: toksične tvari koje se oslobađaju iz nekrotičnih tumorskih stanica, slobodni radikali koje proizvode makrofagi, radikali kisika iz NK stanica i drugo. Ekstracelularni čimbenici uključuju različite biološke, fizikalne i kemijske agense, kao što su onkogeni virusi, rentgensko i UV zračenje te kemoterapeutike (38,39). Višestruka izloženost nekim od ovih čimbenika dovest će do novih i ireverzibilnih genetskih promjena koje će tumorsku stanicu učiniti još agresivnijom u biološkom ponašanju.

### **1.5.2. Heterogenost planocelularnog karcinoma grkljana**

Tumorska heterogenost odgovorna je za različite biološke i histološke osobine tumora, kao i njegovo biološko ponašanje te može objasniti veliku varijabilnost u prognozi različitih tumora. Malo se zna o heterogenosti planocelularnog karcinoma glave i vrata. Poznato je da se u planocelularnom karcinomu može razlučiti područje dobro diferenciranih stanica s niskom mitotskom aktivnošću od područja sa stanicama koje imaju visoku proliferativnu aktivnost i slabu diferencijaciju. Pretpostavlja se da područje s višim histološkim gradusom određuje prognozu kod pacijenta i da se recidiv najvjerojatnije javlja u ovom području (31). Mada je intratumorska heterogenost višestruko potvrđena, mali broj studija je istražio njen utjecaj na prognostičku vrijednost različitih potencijalnih prognostičkih parametara.

### **1.5.3. Mogući utjecaj intratumorske heterogenosti na prognostičke parametre**

U istraživanju prognostičke vrijednosti različitih morfoloških parametara, kod cijelog niza tumora (tako i u karcinomima grkljana) u literaturi se pojavljuju kontradiktorni rezultati tako da neki autori dobivaju vrlo visoku prognostičku vrijednost različitih parametara dok ih drugi u potpunosti negiraju.

Prognostička nekonzistentnost moguće ima svoj uzrok u intratumorskoj heterogenosti koja dovodi do toga da se zajedno obrađuju područja tumora s potpuno drugačijim biološkim karakteristikama.

S biološkog i kliničkog gledišta, vrlo je značajna analiza stanične heterogenosti u svakom tumoru (7,10,28,40). Procjena tumorske heterogenosti je značajna i stoga, što



tumori s heterogenom staničnom populacijom imaju veću mogućnost nastajanja metastaza i vraćanja bolesti te zbog lošijeg odgovora na kemoterapiju (14).

Postojanje različitih staničnih populacija u jednom tumoru teško se može odrediti rutinskim histološkim pregledom, a u rutinskoj histološkoj dijagnostici nema niti nekakvo značenje. Uporabom naprednih dijagnostičkih tehnika, uporabom kvantitativnih pokazatelja ili na njima baziranih prognostičkih parametara taj problem dolazi do izražaja (41).

Bez obzira na znanje o intratumorskoj heterogenosti, dobro bazirano na eksperimentalnim rezultatima, relativno malo je klinički baziranih morfoloških istraživanja izvedeno u tom smjeru. To naročito vrijedi za područje tumora glave i vrata.

Analizirajući morfologiju epitelnih tumora općenito, a karcinoma grkljana napose, može se ustanoviti da postoje dva različita područja koja se mogu okarakterizirati kao "rub".

Jedno od njih je invazivni rub - (u većini radova ovo se i uzima kao "rub") dok je drugo proliferativni rub gdje normalni epitel prelazi u tumorski. Ovo razlikovanje moguće je jedino na razini histološke pripreme preparata za daljnju obradu. U dostupnoj literaturi nismo našli rad koji bi analizirao intratumorsku heterogenost ciklina D1, katepsina D, nm23 i nm 23-H1 gena koristeći mikroskopski definirana područja.

## **1.6. Katepsin D**

Katepsin D je karboksil - proteinaza s optimumom aktivnosti između pH 2,8 do 4,0 (42) koja katalizira cijepanje peptidne veze u unutrašnjosti lanca. Ovaj enzim je lokaliziran u stanici, najčešće u lizosomima i u fiziološkim uvjetima djeluje intracelularno. Sintetizira se u svim tipovima stanica kao glikoprotein manoza 6 fosfat modificirani 52 kD, koji se transportira iz Golgijeva aparata u lizosome. Kad se nađe u

lizosomima dijeli se na dvije jednolančane stabilne forme 34 kD i 14 kD, koje se tu i akumuliraju (43). Protein 52 kD je identificiran kao prekursor katepsina D lizosomalne kisele proteinaze. U normalnim se stanicama samo mala količina katepsina D izluči kao 52 kD pro katepsin D (42). Oko 40% celularnog 52 kD prekursora se secernira, dok oko 60% ide za proizvodnju proteina 48kD i 34kD + 14kD (44).

Unutar vrijednosti kiselog pH katepsin D može razgraditi različite sastojke, uključujući strukturalne proteine, peptide, peptidne prekursore i hormone. Imunocitokemijskim i biokemijskim studijama utvrđeno je da je katepsin D široko rasprostranjen u životinjskim i ljudskim tkivima s kvalitativnim i kvantitativnim razlikama u distribuciji između različitih organa i staničnih tipova u istom organu. Ovaj enzim obavlja različite fiziološke funkcije što je vjerojatno razlog za nejednak obrazac rasporeda katepsina D unutar organa i stanica. Većinom je uključen u kataboličku razgradnju intracelularnih proteina te u ostale važne biokemijske procese kao što su stvaranje, izlučivanje, aktivacija i katabolizam ostalih proteolitičkih enzima i hormona, stimulaciju sinteze DNK i mitozu tijekom regeneracije tkiva, mobilizaciju leukocita i povećanu permeabilnost stijenki krvnih žila (45).

Proteolitička aktivnost katepsina D regulirana je mnogim čimbenicima, primjerice intracelularnim pH, metaboličkim produktima, hormonima, faktorima rasta i endogenim inhibitorima. Ovi čimbenici ograničavaju njegovu proteolitičku aktivnost u određenom kiselom mikrokolišu te sudjeluju u regulaciji mehanizama koji kontroliraju aktivaciju/inhibiciju katepsina D uz pomoć sustava lizosoma.

Upravo zbog toga, lizosomalne proteinaze, uključujući i katepsin D, mogu biti opasne i uzrokovati oštećenje ako djeluju u nefiziološkim uvjetima, ekstralizosomalno ili ekstracelularno (46). Katepsin D može svojom proteolitičkom aktivnošću uzrokovati oštećenja bitnih staničnih sastojaka, koja za posljedicu mogu imati ireverzibilne promjene

normalnih fizioloških funkcija stanica i tkiva (47). To je utvrđeno u nekim patološkim procesima kao što su ishemička lezija miokarda, mišićna distrofija, lezije jetre i neki drugi upalni procesi povezani s pojačanim otpuštanjem katepsina D.

Katepsin D može djelovati kao autokrini mitogen i in vitro potaknuti staničnu proliferaciju. Mehanizmi autokrine aktivnosti nisu sasvim razjašnjeni, a postoje neke naznake da taj enzim može inducirati tumorsku proliferaciju aktiviranjem latentnih oblika faktora rasta ili interakcijom s receptorima za faktor rasta.

Veliki broj istraživanja uloge katepsina D u tumorskoj invaziji i metastaziranju, učinjen je na karcinomima dojke in vitro i in vivo. Nađeno je da dio staničnih linija tih karcinoma aktivno izlučuje prekursor katepsina D, 52 kD pro katepsin D. Pro katepsin D u kiselom mediju se samostalno aktivira, a aktivni oblik katepsina D može razgraditi ekstracelularni matriks ili pak može katalizirati aktivaciju latentnih oblika drugih proteolitičkih enzima, npr. tiolskih proteaza, katepsina B i L, za koje je također nađeno da su uključeni u proces nastanka metastaza. Također je utvrđeno da je povećana citosolska aktivnost katepsina D povezana s lošijom prognozom bolesnica s primarnim karcinomom dojke (46,48,49).

Među rezultatima studija rađenih na karcinomima dojke je i nalaz da 52 kD pro katepsina D, prekursor katepsina D, u staničnim linijama karcinoma dojke reguliraju estrogeni, što je pokrenulo istraživanja uloge katepsina D u karcinomima ovarija (46). Ta istraživanja su pokazala da bi katepsin D mogao biti uključen u proces širenja ovarijalnog tumora, ali i u druge patološke promjene povezane s ovom neoplazmom (47). Istraživanja povezanosti kolorektalnog karcinoma i katepsina D utvrdila su da katepsin D može biti zanimljiv kao specifični, neovisni marker progresije kolorektalnog karcinoma (50). Sve navedeno samo otvara nove mogućnosti za znanstveno istraživanje.

## 1.7. Ciklin D1

Ciklin D1 je bjelančevina uključena u regulaciju staničnog ciklusa te kontrolira ekspresiju Rb gena. To je regulatorna bjelančevina koja kontrolira prijelaz staničnog ciklusa iz G1 i S fazu, udružena s ciklin ovisnim kinazama 4 i 6 (51). Ciklin D1 gen (također poznat i kao PRAD1) nalazi se na segmentu 11q13, a amplificiran je u 30 – 50 % karcinoma grkljana (52).

I drugi geni na istom segmentu su potencijalni onkogeni (HST i INT-2, oba članovi obitelji fibroblastičnog čimbenika rasta), ali korelacija amplifikacije i ekspresije najbolja je za ciklin D1 (52). Rb gen bjelančevina je primarni substrat za ciklin D1. Kada se fosforilira, hvata ciklin D1 i zaustavlja stanični ciklus. Inaktivnost Rb gena kao posljedica mutacije, vodi do nekontrolirane proliferacije, što je karakteristika malignih stanica (54).

Poremećaj u regulaciji ciklina D1 ima utjecaja na razvoj različitih tipova neoplazmi, primjerice cerviksa (55), hepatocelularnog karcinoma (56) te jednjaka (57).

Neki su autori opisali prognostički značaj ciklina D1 u planocelularnom karcinomu grkljana (58), dok su drugi dobili suprotne rezultate (59,60). Prekomjerna ekspresija ciklina D1, česti fenomen u uznapredovalim planocelularnim karcinomima, nije izražena u ranoj fazi razvoja neoplazme (61). Opisana je i korelacija niskih vrijednosti ciklina D1 s relativnom radiorezistencijom ranih stadija karcinoma grkljana (62).

## 1.8. Nm23H1 gen

Nm23H1 gen (nemetastatski klon #23) je tumor supresorski gen uključen u kontrolu procesa metastaziranja tumorskih stanica. Identificiran je u mišjim modelima gdje je

otkriveno jako izražavanje u linijama životinja sa slabom sposobnošću metastaziranja, a deset puta smanjeno u linijama s jakom metastatskom sposobnošću (63).

Reducirana ekspresija nm23 gena korelira ne samo s povećanim metastatskim potencijalom u tumorima nastalim iz staničnih kultura glodavaca, već i s metastazama induciranim različitim agensima, kao što su kancerogeni, tumorski promotori, onkogeni i virusi. Transfekcija nm23 cDNK u visoko metastatskom mišjem melanomu koji ima nisku ekspresiju nm23 gena, dovodi do 50-90 %-tne inhibicije metastatskog potencijala in vivo, što potvrđuje da je nm23 gen tumor supresorski gen koji koči metastaziranje (64,65).

Reducirana ekspresija nm23-H1 gena povezana je s prisustvom metastaza u limfnim čvorovima kod brojnih neoplazmi, primjerice kolona (66,67), dojke (68), želuca (69), cerviksa (70) i hepatocelularnog karcinoma (71). U dostupnoj literaturi postoji malo radova koji istražuju odnos nm23 gena i planocelularnog karcinoma glave i vrata. Za razliku od gore navedenih lokalizacija tumora u planocelularnom karcinomu glave i vrata nm23 gen ima obrnutu prognostičku implikaciju, odnosno pojačana ekspresija nm23 – H1 gena povezana je s lošijom prognozom i visokim tumorskim stadijem (72,73). Slični rezultati dobiveni su i kod karcinoma pluća (74) te neuroblastoma. Kod dječjih neuroblastoma stadiji bolesti III i IV bili su povezani s visokim vrijednostima nm23 gena u usporedbi s nižim stadijima bolesti. Također, visoke vrijednosti nm23 gena bile su udružene sa značajno nižim preživljenjem bolesnika (74,75). Rezultati upućuju na moguću molekularnu alteraciju (mutaciju) nm23 gena. <sup>Ser-120</sup>-gly mutacija nm23 gena otkrivena je u humanom neuroblastomu (75,76).

## **1.9. Gubitak heterozigotnosti nm23-H1 gena**

Gubitak heterozigotnosti (LOH - loss of heterosigosity) je definiran kao vidljiva promjena u omjeru alela u tumorskom tkivu u odnosu na normalno tkivo istog pacijenta. Gubitak heterozigotnosti nm23-H1 gena istražen je u različitim humanim tumorima, primjerice kolorektalnim karcinomu (67), pločastom karcinomu pluća (77), karcinomu bubrega (78) te ovarijskom karcinomu (79). U većini radova nije otkrivena povezanost s kliničkim stadijem niti metastatskim potencijalom. (77-79).

## 2. CILJ RADA

Različita istraživanja pokazuju dosta nekonzistentno prognostičku vrijednost ekspresije pojedinih bjelančevina ili enzima uključenih u rast stanice ili sposobnost metastaziranja tumora. Tumori su prema cijelom nizu pokazatelja građeni od heterogene populacije stanica, najvjerojatnije kao posljedica sekundarnih mutacija. U dosadašnjim istraživanjima uglavnom nije vođeno računa o postojanju intratumorske heterogenosti kao mogućem uzroku nekonzistentnosti objavljenih studija, pa smo za cilj ovog rada odredili:

- a. Utvrditi intratumorsku heterogenost ekspresije bjelančevina katepsina D, ciklina D1, nm23 i nm23 gena u planocelularnom karcinomu grkljana istražujući tri različite tumorske regije.
- b. Odrediti postoji li prognostička vrijednost ekspresije bjelančevina katepsina D, ciklina D1, nm23 i nm23 gena u planocelularnom karcinomu grkljana.
- c. Ustanoviti da li intratumorska heterogenost navedenih bjelančevina i gena pokazuje povezanost s klasičnim prognostičkim čimbenicima (TNM i histološki gradus) te preživljenjem.

### 3. BOLESNICI I METODE

#### 3.1. Bolesnici

U istraživanje je bilo uključeno 170 bolesnika s karcinomom grkljana, od kojih je 141 operirano (hemilaringektomirano i laringektomirano) na Klinici za otorinolaringologiju KBC Šalata u Zagrebu, a ostalih 29 bolesnika liječeno je na Odjelu za otorinolaringologiju Opće bolnice Slavonski Brod, od 1987 do 2003 godine. Kod 43 bolesnika medicinska dokumentacija nije bila kompletna pa je statistika preživljenja učinjena je na materijalu s kompletnom medicinskom dokumentacijom (127 bolesnika), dok je deskriptivna statistika učinjena na ukupnom materijalu (170 bolesnika), kod onih koji su istraživane parametre imali.

Kod svih bolesnika preoperativno nije bila provedena nikakva terapija citostaticima ili zračenjem.

**Dob bolesnika** bila je u rasponu od 34 do 88 godinu, sa srednjom vrijednosti od 57,8 godina (**Tablica 1**).

**Tablica 1.** Dob bolesnika

Dob bolesnika	Srednja vrijednost	Minimum	Maksimum	Medijan	Standardna devijacija
	57,8	34	88	58	9,71



**Spol bolesnika:** Većina bolesnika bila su muškog, a 9 ženskog spola (**Tablica 2**).

**Tablica 2.** Spol bolesnika

<b>Spol bolesnika</b>	<b>M</b>	<b>Ž</b>
n	162	8
%	95,3	4,7

**Raširenost primarnog tumora** prema TNM klasifikaciji bila je: T1 kod 11 bolesnika, T2 kod 46 bolesnika, T3 kod 39 bolesnika i T4 kod 41 bolesnika (**Tablica 3**).

**Tablica 3.** Raširenost tumora

<b>TNM</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>
n	11	46	38	41
%	8,1	33,6	28,6	29,9

**Limfni čvorovi** bili su zahvaćeni tumorom u 63 bolesnika, od toga N1 kod 33 pacijenta, N2 kod 22 pacijenta, a N3 kod 8 pacijenata (**Tablica 4**).

**Tablica 4.** Zahvaćenost limfnih čvorova tumorom

<b>Zahvaćenost limfnih čvorova</b>	<b>N0</b>	<b>N1</b>	<b>N2</b>	<b>N3</b>
n	70	33	22	8
%	52,6	24,8	16,5	6,1

**Udaljene metastaze** nađene su u 5 bolesnika.

**Histološki stupanj diferencijacije** bio je G1 (dobro diferenciran) u 58 bolesnika, G2 (umjereno diferenciran) u 74 bolesnika i G3 (slabo diferenciran) u 34 bolesnika (**Tablica 5**).

**Tablica 5.** Stupanj diferencijacije tumora

<b>Stupanj diferencijacije</b>	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>
n	59	76	35
%	34,9	44,6	20,5

Bolesnici su bili praćeni kroz razdoblje od 6 do 96 mjeseci, s time da je minimalni period praćenja bolesnika koji nisu umrli bio 24 mjeseca.

Od toga je kompletno praćenih – necenzoriranih (onih koji su umrli tijekom perioda praćenja) bilo 64, a cenzoriranih 105. (**Tablica 6.**)

**Tablica 6.** Preživljenje bolesnika

<b>Preživljenje</b>	<b>cenzorirani</b>	<b>necenzorirani</b>
n	105	64
%	62,1	37,9

## 3.2. Metode

Uzorci tumorskog tkiva rutinski su fiksirani u 10% formalinu, dehidrirani u uzlaznom nizu alkohola i uklopljeni u parafin.

### 3.2.1. Imunohistokemija

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 vezanja. 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 se vežu kombinacijom vodikovih, elektrostatskih i van der Waalsovih sila.

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

Avidin biotin kompleks (ABC) metoda je indirektna imunohistokemijska metoda, a zasniva se na principu sposobnosti glikoproteina avidina iz bjelanjka jajeta da neimunološki veže 4 molekule biotina (vitamina H). Koriste se tri reagensa. Prvi je

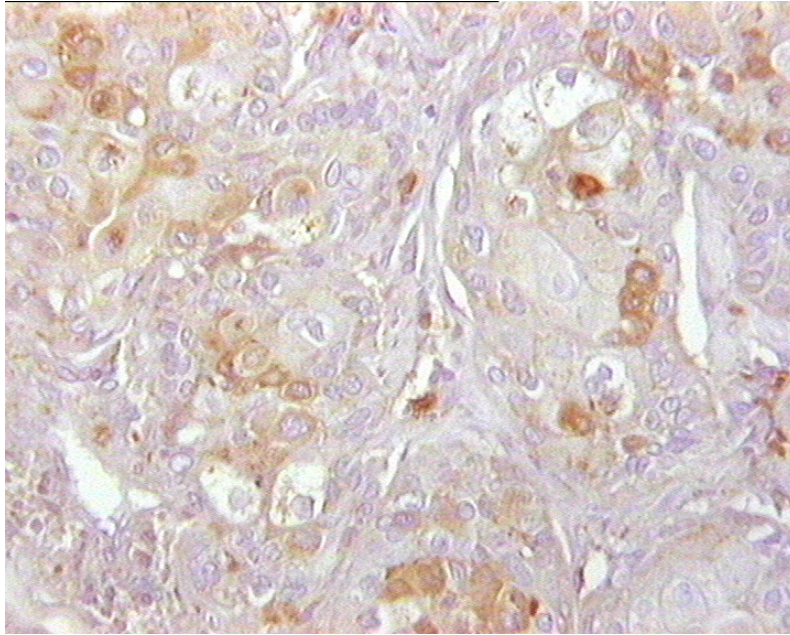
primarno protutijelo specifično za lokaliziranje antigena. Sekundarno protutijelo konjugirano je biotinom i avidinom. Enzim peroksidaza i postojanje traženog antigena se vizualizira odgovarajućim kromogenom. Iako se koriste konjugirana protutijela, jako privlačenje između avidina i biotina daje ovoj metodi veću osjetljivost od drugih metoda. ABC metoda omogućuje lokalizaciju brojnih antigena u različitim uzorcima tkiva. Bojenje pozadine ("background") se u imunohistokemiji nastoji eliminirati različitim postupcima, npr. proteolizom. Proteoliza (predigestija) je uspostavljanje imunoreaktivnosti antigena ukoliko su maskirani usljed djelovanja fiksacije. To se radi s proteolitičkim enzimima 0,1% tnom pronazom, ali se može raditi i s tripsinom i pepsinom. Izvodi se na temperaturi od 37 C.

Iz 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.

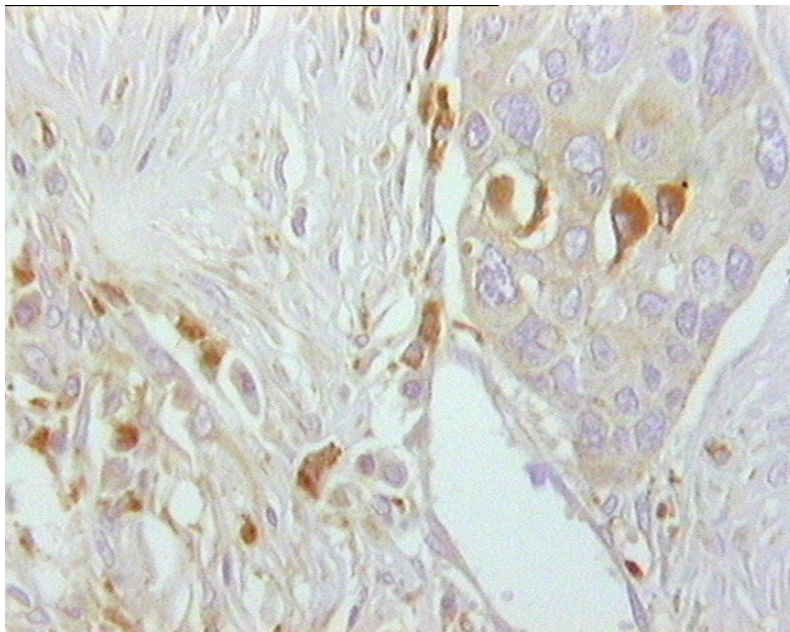
Za imunohistokemijsko bojenje za nm23 i ciklin D1 korišteno je monoklonalno protutijelo tvrtke Biogenex, a za bojenje katepsina D zečje, antihumano protutijelo (Dako Glostrup, Danska). Za detekciju ekspresije koristila se indirektna ABC tehnika (LSAB+, Dako, Glostrup, Danska).

Na gotovim preparatima izvršena je kvantitativna analiza kompjuterskim sustavom za analizu slike "image analyser", tvrtke VAMS, Zagreb, pomoću koje je mjeren broj imunoreaktivnih stanica te izražen kao postotak broja pregledanih stanica (reaktivno do 10 % stanica – skor 1, reaktivno 11-50 % stanica – skor 2, reaktivno iznad 50 % stanica – skor 3). Na svakom preparatu gledali smo 3 vidna polja, u najjače obojenom dijelu istraživanog područja (centar, transformacijski rub, invazivni rub), koja su sadržavala oko

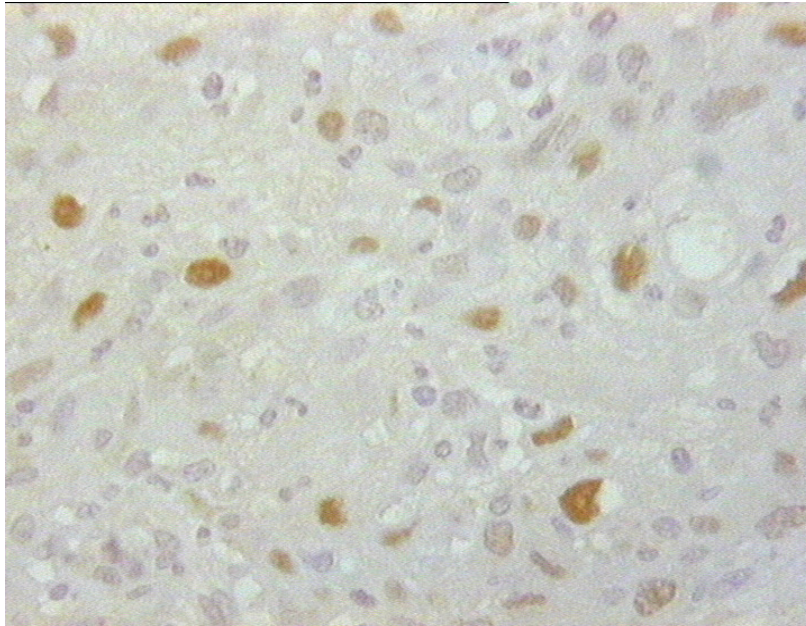
500 do 1000 tumorskih stanica, a ukupno je bilo analizirano oko 2500 stanica po uzorku, na objektivu 40x.



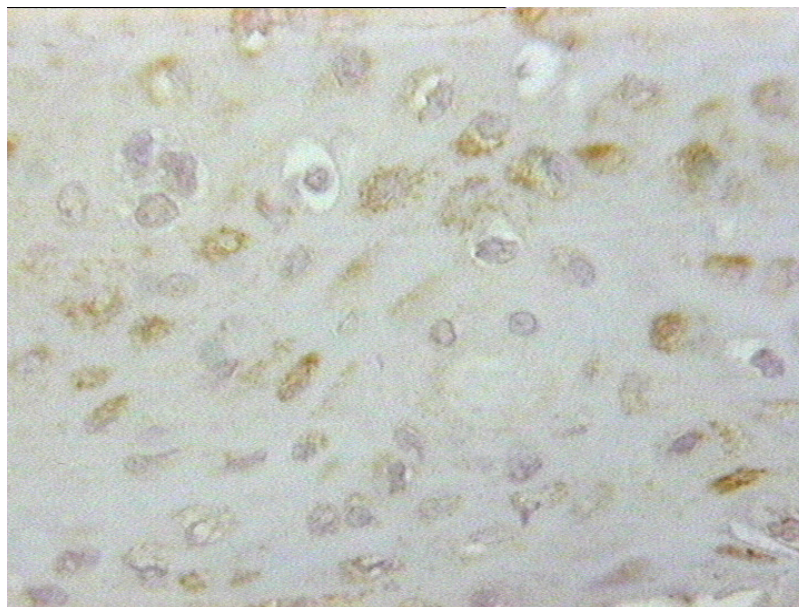
Slika 1. Imunohistokemijsko bojenje tumorskih stanica s katepsinom D, vidi se pozitivna reakcija u citoplazmi, povećanje 40x.



Slika 2. Imunohistokemijsko bojenje tumorske strome katepsinom D, vidi se pozitivna reakcija u citoplazmi, povećanje 40x.

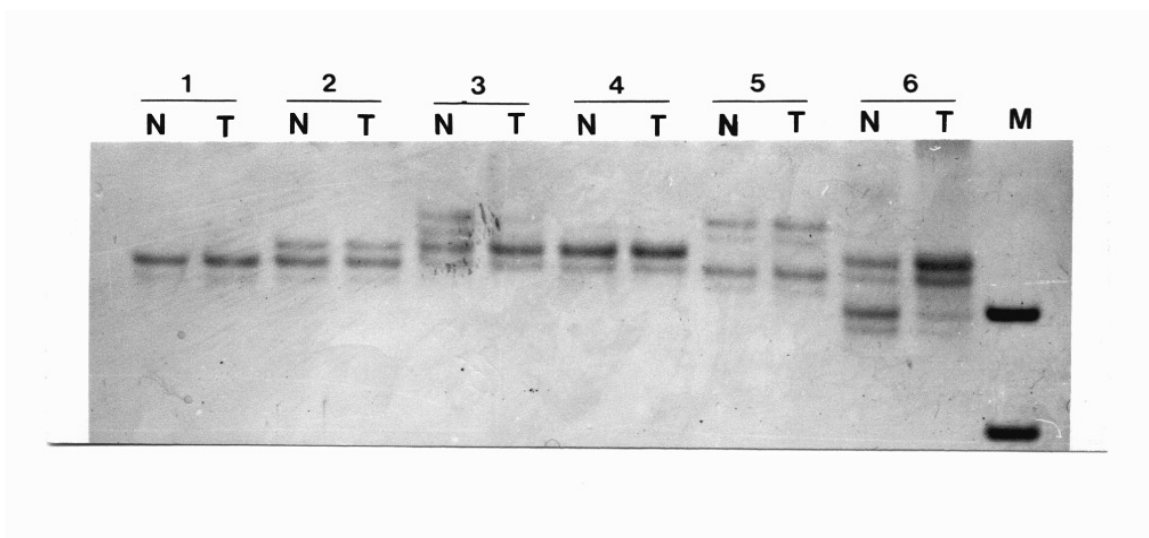


Slika 3. Imunohistokemijsko bojenje ciklinom D1, vidi se pozitivna reakcija u jezgrama tumorskih stanica, povećanje 40x



Slika 4. Imunohistokemijsko bojenje s nm 23, vidi se pozitivna reakcija u citoplazmi tumorskih stanica, povećanje 40x





Slika 5. Gubitak heterozigotnosti nm23-H1 gena, mikrosatelitni lokus u planocelularnom karcinomu grkljana. N – normalno, T – tumor; linije 1 i 4 su homozigoti (neinformativni); linije 2 i 5 su heterozigoti (informativni) bez gubitka heterozigotnosti; linije 3 i 6 su heterozigoti s gubitkom heterozigotnosti; linija M je DNK marker pBR 322. Gel je bojan srebrom.



## 2.2. Gubitak heterozigotnosti nm23-H1 gena

Gubitak nm23 gena određivan je na istom tumorskom materijalu, koristeći konsekvativne rezove iza bojenja imunohistokemije. Koristila se reakcija lančane polimeraze (PCR), koja omogućuje eksponencijalno umnažanje ciljanog dijela DNK, u *in vitro* uvjetima. Preduvjet za njezinu primjenu je poznavanje dijela slijeda nukleotida koji se želi umnožiti. Na osnovu tih podataka prema graničnim dijelovima slijeda nukleotida koji se želi umnožiti konstruiraju se početni oligonukleotidi. Reakcijom PCR umnažaju se oba lanca DNK i to između slijeda nukleotida na koje su se vezali početni oligonukleotidi. Reakcija teče zahvaljujući enzimu DNK polimerazi uz prisustvo slobodnih nukleotida i optimalne koncentracije iona  $Mg^{++}$  u reakcijskoj smjesi. Reakcija PCR sastoji se od većeg broja ciklusa, od 20 do 60, ovisno o zastupljenosti slijeda nukleotida u materijalu koji se koristi u reakciji. Svaki ciklus se sastoji od tri faze: (1) denaturacija koja se odvija pri temperaturi od 93 - 96° C i dovodi do razdvajanja dvostrukih molekula DNK, (2) sparivanja u kojem se početni oligonukleotidi vežu na komplementarne jednolančane molekule DNK i (3) sinteze komplementarnih lanaca DNK u kojoj povišenje temperature na 72° C aktivira enzim *Taq* polimerazu (DNK polimeraza otporna na povišene temperature). Po završetku reakcije uzorak bi trebao sadržavati  $2^n$  kopija DNK slijeda nukleotida koji se želi umnožiti, pri čemu je n broj ciklusa.

Za umnažanje željenih odsječaka gena nm23-H1 koristio se par primera (5' - TATGAGTTCAACTACGCACG - 3' i 5'- CTCGAGCACAGGAGCAGGTT- 3'). Reakcija PCR odvijala se u volumenu od 25  $\mu$ l kojeg je sačinjavalo: 10 pmola svakog primera, smjese nukleotida (50  $\mu$ M svake dNTP) te 1 U *Taq* polimeraze. PCR reakcija učinjena je u aparatu (GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer). Svaki od 30 ciklusa

reakcije PCR sastojao se od tri faze. Denaturacija je trajala 30 sekundi pri 95° C, faza sparivanja trajala je 30 sekundi pri 55° C, dok je faza produljivanja lanaca trajala 45 sekundi pri 72° C. Amplifikacija produkata polimerizacije bila je provjerena elektroforezom na agaroznom gelu i očitana na elektroforezi na poliakrilamidnom gelu (77).

### **3.3. Statistička analiza podataka**

Nominalni i ordinalni podaci su prikazani tabelarno kao apsolutne i relativne frekvencije. Razlika u ekspresiji markera u pojedinim zonama je izvršena uporabom sign-testa. Razlika u preživljenju ispitanika s različitom ekspresijom za pojedinačne markere procjenjivana je uporabom Kaplan-Meierove metode, a razlike među dobivenim krivuljama određivane su uporabom log-rank testa i Tarone –Ware testa.

Utjecaj kombinacije varijabli na preživljenje procjenjivan je uporabom RPART klasifikatora. RPART klasifikator može prihvatiti cenzorirane podatke, kao i podatke o dužini preživljenja, za razliku od klasičnih klasifikatora poput C4.5 ili CART. Rezultat je podjela na podskupine ispitanika koje imaju različit kumulativni hazard (80). RPART konstruira klasifikacijski model koji se može predočiti kao binarno stablo (81). Stablo se gradi slijedećim procesom: prvo se pronade varijabla koja najbolje dijeli podatke u dvije skupine. Podaci se razdvajaju, a potom se ovaj proces ponavlja odvojeno za svaku podskupinu i tako rekurzivno dok podskupine ne postignu minimalnu, unaprijed definiranu veličinu, ili kad više nema poboljšanja u razvrstavanju (81).

Točka razdvajanja u RPART klasifikatoru se zasniva na uporabi tzv. alter priors indeksa koji potječe iz algoritamske teorije informacija, a detaljno je raspravljen u referencama Therneay i suradnici (80,81).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Katepsin D

Mjerenjem **katepsina D u tumorskim stanicama u transformacijskoj zoni tumora** za cjelokupnu skupinu ispitanika dobivene su sljedeće vrijednosti prikazane u **Tablici 7:**

**Tablica 7.** Intezitet bojanja katepsina D u tumorskim stanicama u transformacijskoj zoni tumora

<b>Katepsin D</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>n</b>	15	81	26	5
<b>%</b>	11.8	63.4	20.4	3.9

Iz prikazane tablice vidi se da je u tumorskim stanicama u transformacijskoj zoni tumora katepsin D bio najčešće inteziteta 1.

Mjerenjem **katepsina D u stromi u transformacijskoj zoni tumora** dobivene su sljedeće vrijednosti prikazane u **Tablici 8:**

**Tablica 8.** Intezitet bojanja katepsina D u stromi u transformacijskoj zoni tumora

<b>Katepsin D</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>n</b>	6	67	50	4
<b>%</b>	4.3	53.2	39.1	3.3

Iz prikazane tablice vidi se da je katepsin D u stromi u transformacijskoj zoni tumora bio također najčešće inteziteta 1.

Prikaz raspodjele bolesnika prema vrijednostima **katepsina D u tumorskim stanicama u invazivnom rubu tumora** nalazi se u **Tablici 9.**

**Tablica 9.** Intezitet bojanja katepsina D u tumorskim stanicama u invazivnom rubu tumora

<b>Katepsin D</b>	0	1	2	3
<b>n</b>	13	33	51	30
<b>%</b>	9.9	25.7	40.6	23.8

Iz navedenih rezultata vidi se da je najčešći intenzitet bojanja katepsina D u tumorskim stanicama u invazivnom rubu tumora bio intenzitet 2.

Mjerenjem **katepsina D u stromi u invazivnom rubu** dobivene su sljedeće vrijednosti prikazane su u **Tablici 10**:

**Tablica 10.** Intezitet bojanja katepsina D u invazivnom rubu u stromi tumora

<b>Katepsin D</b>	0	1	2	3
<b>n</b>	1	40	43	43
<b>%</b>	0.8	31.2	33.9	33.9

Iz navedenih rezultata vidi se da su kod katepsina D u stromi u invazivnom rubu tumora podjednako često bili zastupljeni intezitet bojanja 2 i 3.

Prikaz raspodjele bolesnika prema vrijednostima **katepsina D u tumorskim stanicama u središtu tumora** nalazi se u **Tablici 11**.

**Tablica 11.** Intezitet bojanja katepsina D u tumorskim stanicama u središtu tumora

<b>Katepsin D</b>	0	1	2	3
<b>n</b>	13	80	28	6
<b>%</b>	10.2	62.9	22.2	4.6

Mjerenjem **katepsina D u stromi u središtu tumora** za cjelokupnu skupinu ispitanika dobivene su sljedeće vrijednosti prikazane u **Tablici 12**.

**Tablica 12.** Intezitet bojanja katepsina D u stromi u središtu tumora

<b>Katepsin D</b>	0	1	2	3
<b>n</b>	10	60	47	10
<b>%</b>	7.6	48.1	36.8	7.6

Iz navedenih rezultata vidi se da je kod katepsina D u stromi u središtu tumora najčešće bio zastupljen intezitet bojanja 1.

Ako gledamo tumor kao cjelinu, ekspresija katepsina D (najviše vijednosti intenziteta 3) najjača je u invazivnom rubu, a najslabija u transformacijskom rubu tumora.

#### 4.2. Ciklin D1 i nm 23

Prikaz raspodjele bolesnika prema vrijednostima **ciklina D1 u tumorskim stanicama u transformacijskoj zoni tumora** nalazi se u **Tablici 13**.

**Tablica 13.** Intezitet bojanja ciklina D1 u tumorskim stanicama u transformacijskoj zoni tumora

<b>Ciklin D1</b>	0	1	2	3
<b>n</b>	77	36	6	8
<b>%</b>	61.5	28.9	3.9	5.8

Ciklin D1 u tumorskim stanicama u transformacijskoj zoni tumora najčešće je bio negativan.

Mjerenjem **ciklina D1 u tumorskim stanicama u invazivnom rubu** dobivene su sljedeće vrijednosti prikazane su u **Tablici 14**:

**Tablica 14.** Intezitet bojanja ciklina D1 u tumorskim stanicama u invazivnom rubu tumora

<b>Ciklin D1</b>	0	1	2	3
<b>n</b>	19	39	44	25
<b>%</b>	14.8	31.2	34.4	19.7

Iz navedenih rezultata vidi se da je kod ciklina D1 u tumorskim stanicama u invazivnom rubu tumora najčešće bio zastupljen intezitet bojanja 2.

U **središtu tumora ciklin D1** je imao ovakvu raspodjelu, prikazanu u **Tablici 15**:

**Tablica 15.** Intezitet bojanja ciklina D1 u tumorskim stanicama u središtu tumora

<b>Ciklin D1</b>	0	1	2	3
<b>n</b>	47	43	28	9
<b>%</b>	37.3	33.9	22.1	6.8

Iz navedenih rezultata vidi se da je ciklin D1 u tumorskim stanicama u središtu tumora najčešće bio negativan.

Gledano u cjelini, najjača ekspresija ciklina D1 nalazi se u invazivnom rubu tumora dok je najslabija u transformacijskoj zoni tumora.

Prikaz raspodjele bolesnika prema vrijednostima **nm23 u tumorskim stanicama transformacijskoj zoni tumora** nalazi se u **Tablici 16.**

**Tablica 16.** Intezitet bojanja nm23 u tumorskim stanicama u transformacijskoj zoni tumora

<b>Nm23</b>	0	1	2
<b>n</b>	101	23	3
<b>%</b>	80.0	18.2	2.4

Iz navedenih rezultata vidi se da je nm 23 u tumorskim stanicama u transformacijskoj zoni tumora najčešće bio negativan.

Mjerenjem **nm 23 u tumorskim stanicama u invazivnom rubu** dobivene su sljedeće vrijednosti prikazane su u **Tablici 17:**

**Tablica 17.** Intezitet bojanja nm23 u tumorskim stanicama u invazivnom rubu tumora

<b>Nm23</b>	0	1	2
<b>n</b>	68	55	4
<b>%</b>	53.5	43.1	3.4

Iz navedenih rezultata vidi se da je nm 23 u tumorskim stanicama u invazivnom rubu tumora također najčešće bio negativan.

U središtu tumora nm23 je imao ovakvu raspodjelu, prikazanu u **Tablici 18**:

**Tablica 18.** Intezitet bojanja nm23 u tumorskim stanicama u središtu tumora

<b>Nm23</b>	0	1	2
<b>n</b>	76	48	3
<b>%</b>	60.3	37.9	1.7

Kao i u predhodnom slučaju i tu se iz navedenih rezultata vidi se da je nm 23 u tumorskim stanicama u središtu tumora također najčešće bio negativan.

Gledajući tumor u cjelini najslabiju ekspresiju nm23 proteina nalazimo u transformacijskom rubu, dok je ona jače izražena u središtu tumora.

#### **4.3. Gubitak heterozigotnosti nm23-H1 gena (LOH)**

Gubitak heterozigotnosti nm23 gena određivao se na istom tumorskom materijalu. Na gelu normalni sadržaj DNK pokazao je jedan (homozigoti, neinformativni pacijenti) ili dva (heterozigoti, informativni pacijenti) "banda" na genskom lokusu nm23-H1. 9 pacijenata je bilo heterozigotno, a od tih 9 pacijenata u 5 je dokazan gubitak nm23 gena (LOH).

**Tablica 19.** Gubitak nm23 gena (LOH)

<b>Gubitak heterozigotnosti nm23- H1 gena (LOH)</b>	heterozigoti	LOH
Broj ispitanika	9	5

#### 4.4 Usporedba tumorskih zona testom predznaka (sign testom)

Usporedili smo katepsin D u tumorskim stanicama po regijama testom predznaka te smo statistički značajnu razliku našli između katepsina D u tumorskim stanicama u transformacijskoj zoni i katepsina D u tumorskim stanicama u invazivnom rubu tumora ( $p = 0,0001$ ) te katepsina D u tumorskim stanicama u središtu tumora i katepsina D u tumorskim stanicama u invazivnom rubu tumora ( $p = 0,0001$ ), što se vidi iz **Tablice 20**.

**Tablica 20.** Usporedba katepsina D u tumorskim stanicama po regijama testom predznaka

<b>p vrijednosti</b>	<b>KR1T</b>	<b>KR2T</b>	<b>KCT_2</b>
<b>KR1T</b>	1.000		
<b>KR2T</b>	<b>0.000</b>	1.000	
<b>KCT</b>	0.824	<b>0.000</b>	1.000

Usporedili smo i katepsin D u stromi po regijama testom predznaka te je statistički značajna razlika dobivena između katepsina D u stromi u transformacijskoj zoni i katepsina D u stromi u invazivnom rubu tumora ( $p = 0,001$ ) te katepsina D u stromi u središtu tumora i katepsina D u stromi u invazivnom rubu tumora ( $p = 0,0001$ ), što se vidi iz **Tablice 21**.

**Tablica 21.** Usporedba katepsina D u stromi po regijama testom predznaka

<b>p vrijednosti</b>	<b>KR1S</b>	<b>KR2S</b>	<b>KCS</b>
<b>KR1S</b>	1.000		
<b>KR2S</b>	<b>0.001</b>	1.000	
<b>KCS</b>	1.000	<b>0.000</b>	1.000

Statistički značajna razlika testom predznaka dobivena je i za ciklin D1 i to između ciklina D1 u transformacijskoj zoni i ciklina D1 u invazivnom rubu tumora ( $p = 0,001$ )



te ciklina D1 u središtu tumora i ciklina D1 u invazivnom rubu tumora ( $p = 0,0001$ ), što se vidi iz **Tablice 22**.

**Tablica 22.** Usporedba ciklina D1 po regijama testom predznaka

<b>p vrijednosti</b>	<b>CDR1</b>	<b>CDR2</b>	<b>CDC</b>
<b>CDR1</b>	1.000		
<b>CDR2</b>	<b>0.000</b>	1.000	
<b>CDC</b>	0.064	<b>0.002</b>	1.000

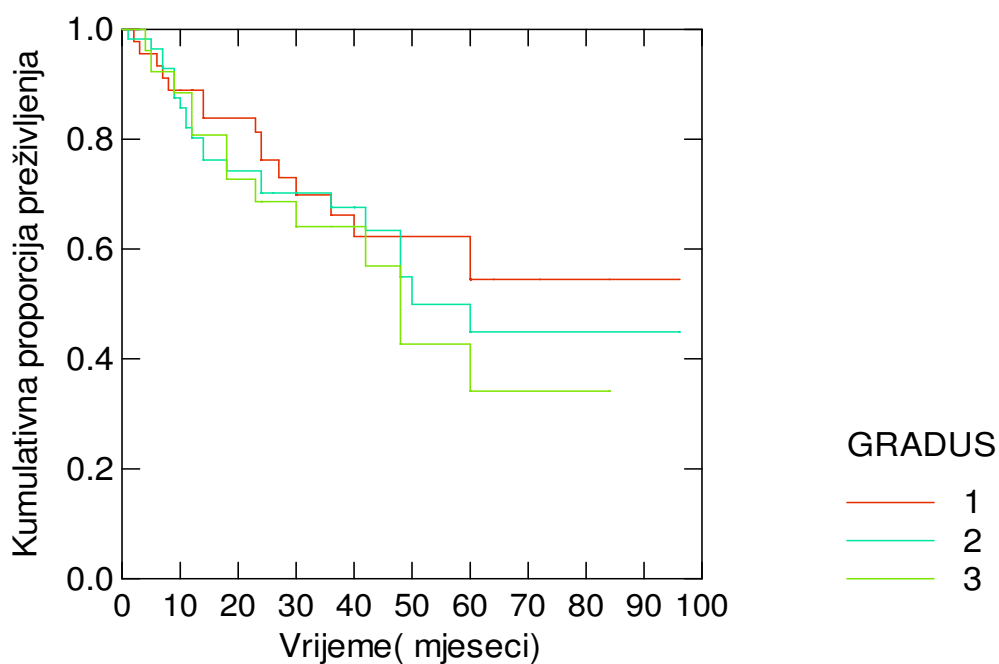
Usporedili smo i nm23 po regijama testom predznaka te nismo dobili statistički značajnu razliku, što se vidi iz **Tablice 23**.

**Tablica 23.** Usporedba nm23 po regijama testom predznaka

<b>p vrijednost</b>	<b>NM23R1</b>	<b>NM23R2</b>	<b>NM23C</b>
<b>NM23R1</b>	1.000		
<b>NM23R2</b>	1.000	1.000	
<b>NM23C</b>	1.000	1.000	1.000

#### 4.5. Kaplan - Meierove ( KM) krivulje preživljenja

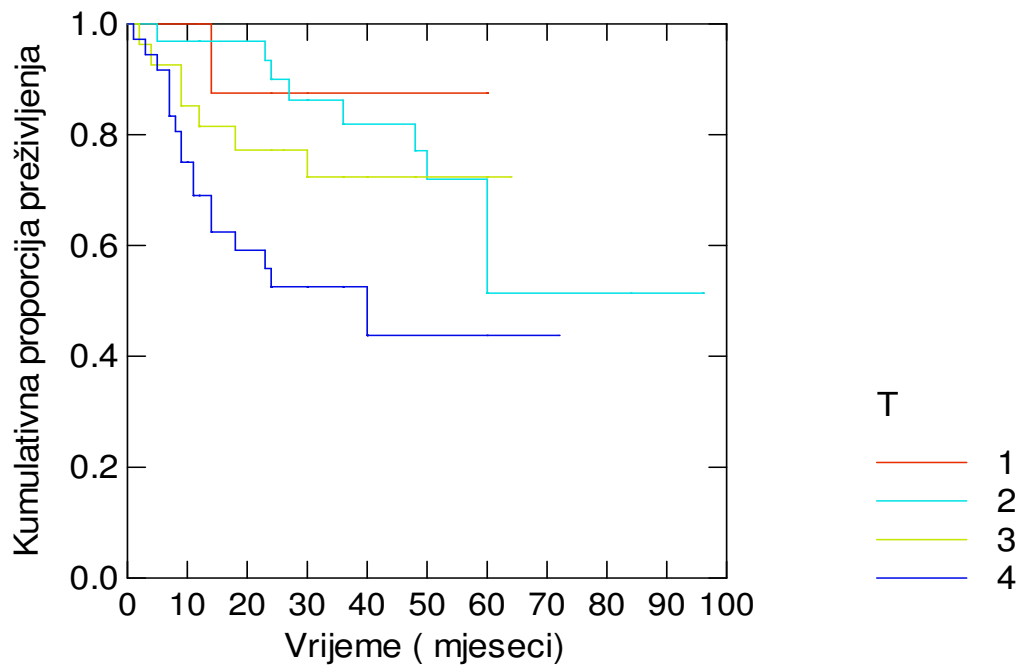
##### Gradus tumora i preživljenje ( Kaplan - Meier)



**Grafikon 1.** KM krivulje preživljenja za histološki gradus tumora

**KM krivulje preživljenja za gradus tumora** date su na **Grafikonu 1**. Razlika u kumulativnoj proporciji preživljenja nije bila signifikantna ( $\chi^2 = 0,903$ ,  $p = 0,637$ ).

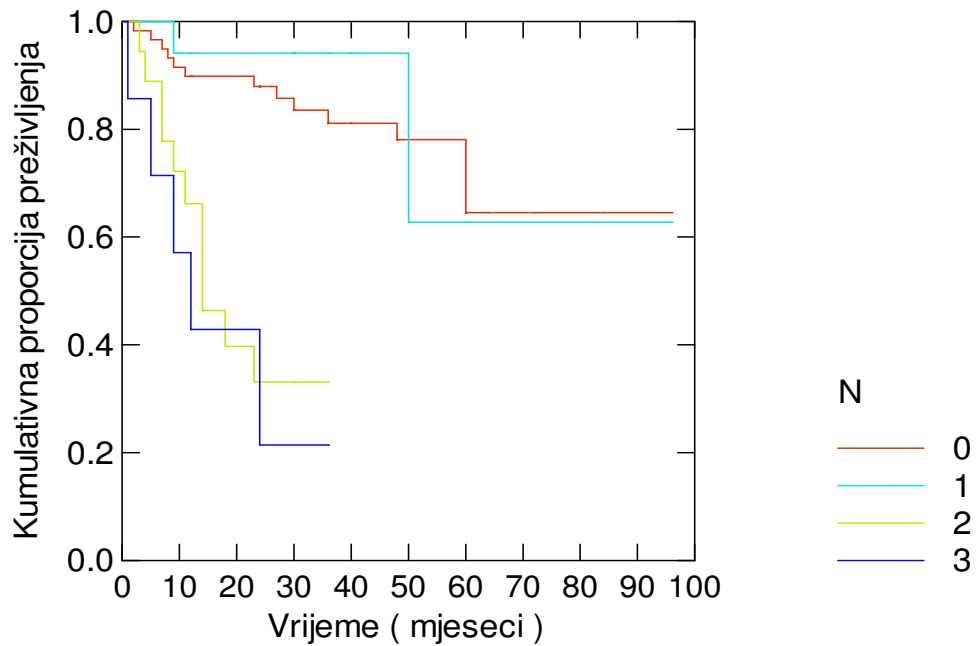
## T i preživljenje ( Kaplan - Meier )



**Grafikon 2.** KM krivulje preživljenja za T (veličinu tumora) iz TNM ljestvice

**KM krivulje preživljenja za veličinu tumora** date su na **Grafikonu 2**. Razlika u kumulativnoj proporciji preživljenja bila je signifikantna ( $\chi^2 = 12,100$ ,  $p = 0,007$ ).

### N i preživljenje ( Kaplan - Meier )

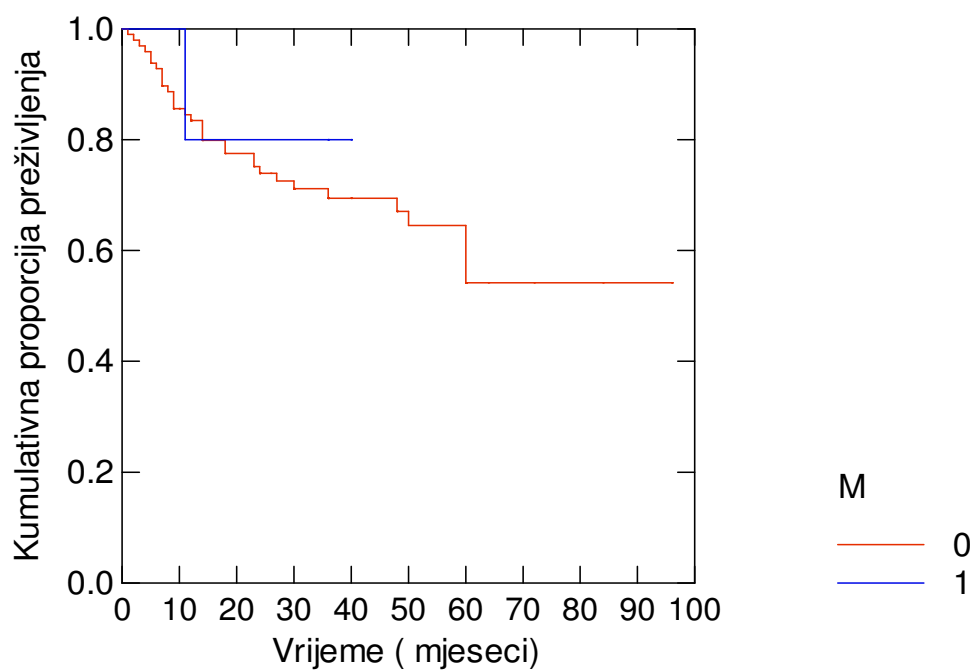


**Grafikon 3.** KM krivulje za N (zahvaćenost limfnih čvorova) iz TNM

ljestvice

**KM krivulje za zahvaćenost limfnih čvorova** prikazane su na **Grafikonu 3.** Log - rank test je pokazao da je kumulativna proporcija preživljenja statistički značajna ( $\chi^2 = 32,917$ ,  $p = 0,0001$ ).

## Metastaze i preživljenje ( Kaplan - Meier )



**Grafikon 4.** KM krivulje za M (prisutnost metastaza) iz TNM ljestvice

**KM krivulje za prisutnost metastaza.** prikazane su na **Grafikonu 4.** Kumulativna proporcija preživljenja nije bila statistički signifikantna ( $\chi^2 = 0,197$ ,  $p = 0,658$ ).

#### **4.5.1. Kaplan Meierove ( KM) krivulje preživljenja za katepsin D**

KM krivulje preživljenja date su za slijedeće varijable:

katepsin D u tumorskim stanicama u transformacijskom rubu

katepsin D u stromi u transformacijskom rubu

katepsin D u tumorskim stanicama u invazivnom rubu

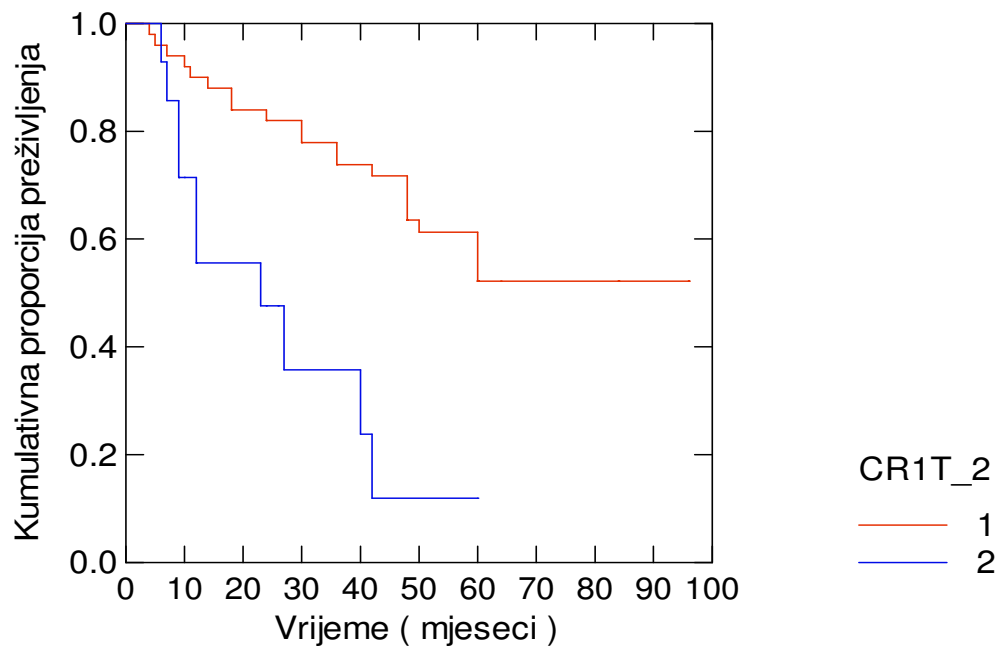
katepsin D u stromi u invazivnom rubu

katepsin D u tumorskim stanicama u središtu tumora

katepsin D u stromi u središtu tumora

Pri tome su pacijenti podijeljeni u dvije skupine, tj. na skupinu čije su vrijednosti katepsina D u tumorskim stanicama bile negativne ili reaktivne do 10 % stanica (skupina 1) i skupinu čije su vrijednosti katepsina D u tumorskim stanicama bile reaktivne do 50 % stanica ili više od 50 % stanica (skupina 2).

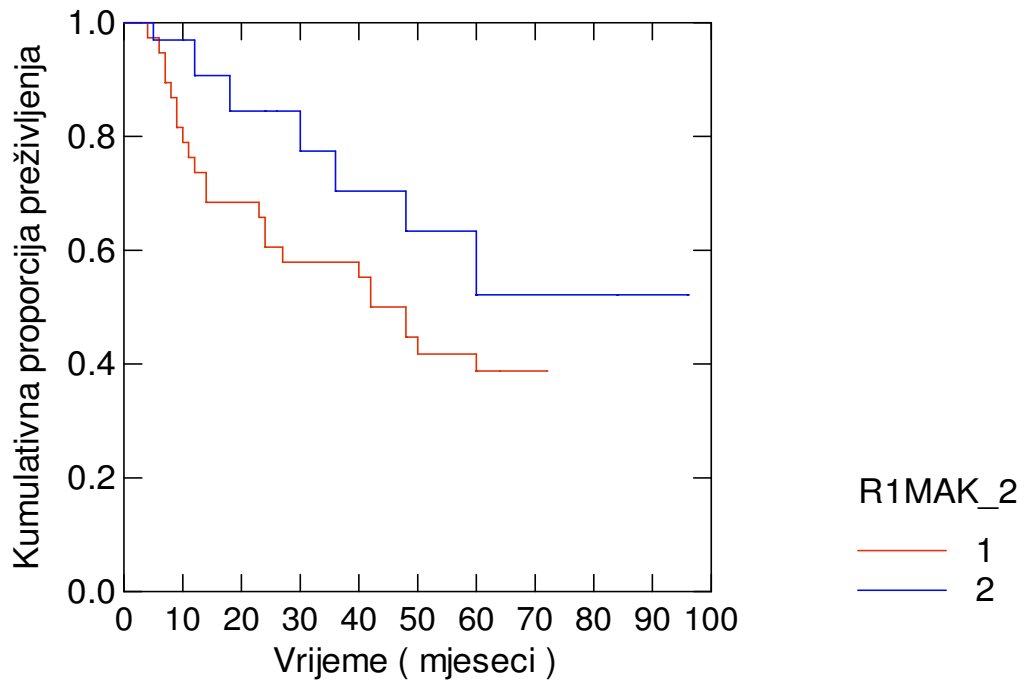
## Katepsin D u tumoru (R1) i preživljenje



**Grafikon 5.** KM krivulje za CR1T\_2 (catepsin D u tumorskim stanicama u transformacijskom rubu)

**KM krivulje za catepsin D u tumorskim stanicama u transformacijskom rubu** date su na **Grafikonu 5**. Razlika u kumulativnoj proporciji preživljenja bila je signifikantna ( $\chi^2 = 12,683$ ,  $p = 0,0001$ ).

## Katepsin D u stromi (R1) i preživljenje

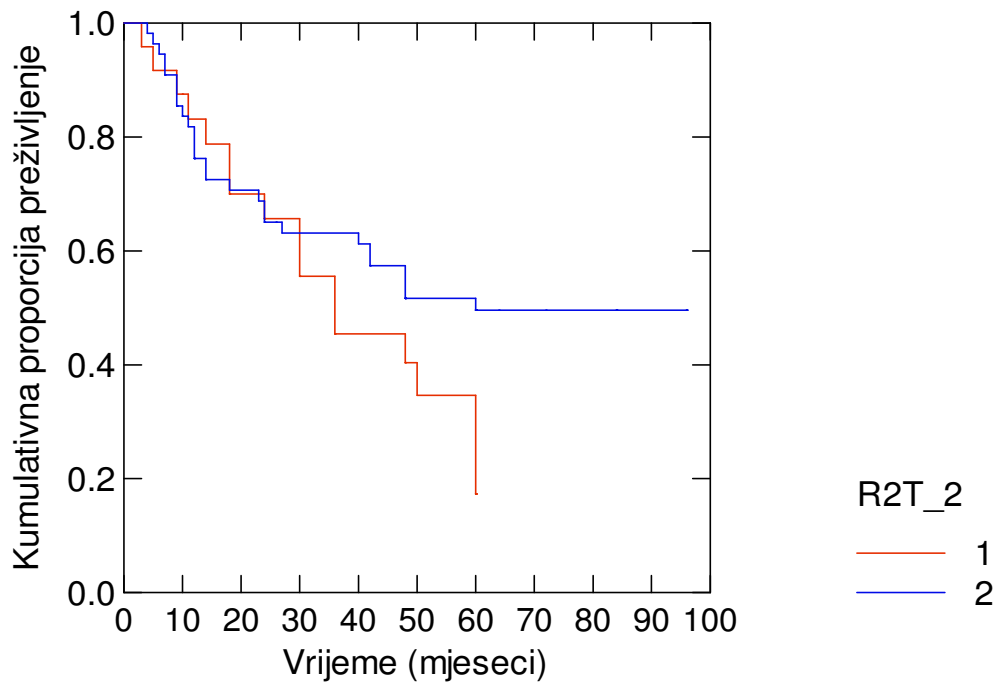


**Grafikon 6.** KM krivulje za CR1MAK\_2 (catepsin D u stromi u transformacijskom rubu)

KM krivulje za katepsin D u stromi u transformacijskom rubu prikazane su na **Grafikonu 6**. Kumulativne proporcije preživljenja nisu statistički signifikantne ( $\chi^2 = 3,127$ ,  $p= 0,077$ ).



## Katepsin D u tumoru (R2) i preživljenje

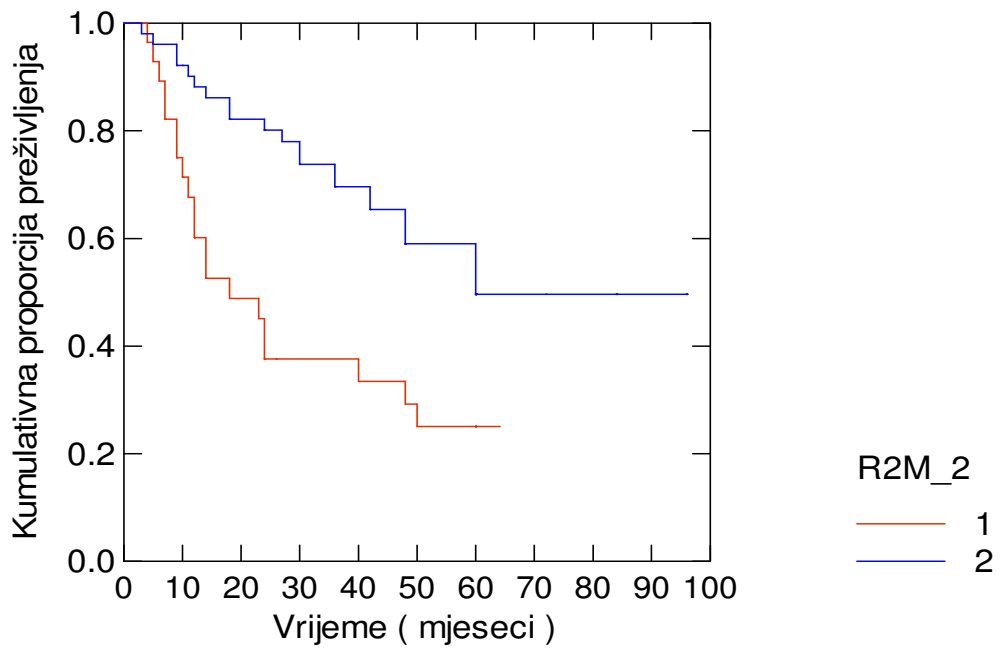


**Grafikon 7.** KM krivulje za CR2T\_2 (catepsin D u tumorskim stanicama u invazivnom rubu)

### **KM krivulje za katepsin D u tumorskim stanicama u invazivnom rubu**

prikazane su na **Grafikonu 7.** Log - rank test je pokazao da kumulativna proporcija preživljenja nije statistički značajna ( $\chi^2 = 1,715$ ,  $p = 0,190$ ).

## Katepsin D u stromi (R2) i preživljenje

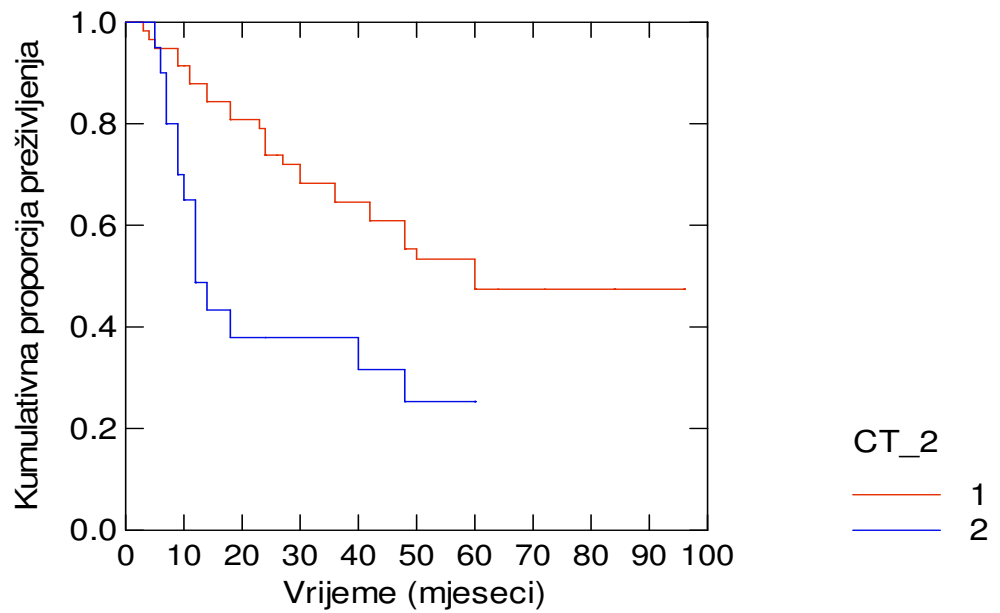


**Grafikon 8.** KM krivulje za CR2M\_2 (catepsin D u stromi u invazivnom rubu)

**KM krivulje za catepsin D u stromi u invazivnom rubu** prikazane su na

**Grafikonu 8.** Log - rank test je pokazao da je kumulativna proporcija preživljenja statistički značajna ( $\chi^2 = 10,641$ ,  $p = 0,001$ ).

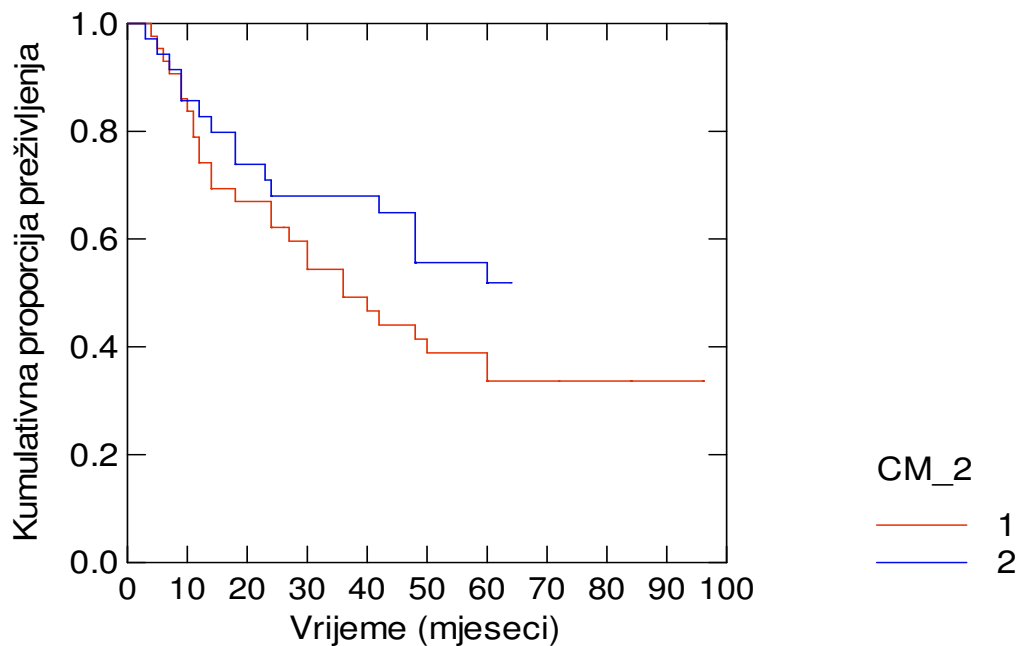
## Katepsin D u tumoru (C) i preživljenje



**Grafikon 9.** KM krivulje za CT\_2 (catepsin D u tumorskim stanicama u središtu tumora)

**KM krivulje za catepsin D u tumorskim stanicama u središtu tumora** prikazane su na **Grafikonu 9**. Log - rank test je pokazao da je kumulativna proporcija preživljenja statistički značajna ( $\chi^2 = 9,104$ , **p = 0,003**).

## Katepsin D u stromi (C) i preživljenje



**Grafikon 10.** KM krivulje za CM\_2 (katepsin D u stromi u središtu tumora)

**KM krivulje za katepsin D u stromi u središtu tumora.** prikazane su na

**Grafikonu 10.** Kumulativna proporcija preživljenja nije bila statistički signifikantna ( $\chi^2 = 1,879$ ,  $p = 0,170$ ).

Analizirajući odnos katepsina D u transformacijskom rubu, invazivnom rubu i središtu tumora te preživljenja vidi se da su kumulativne proporcije preživljenja bile statistički značajne za: katepsin D u tumorskim stanicama u transformacijskom rubu, katepsin D u stromi u invazivnom rubu te katepsin D u tumorskim stanicama u središtu tumora.

#### **4.5.2. KM krivulje preživljenja za ciklin D1 i Nm23**

KM krivulje preživljenja date su za slijedeće varijable:

Ciklin D1 u transformacijskom rubu

Ciklin D1 u invazivnom rubu

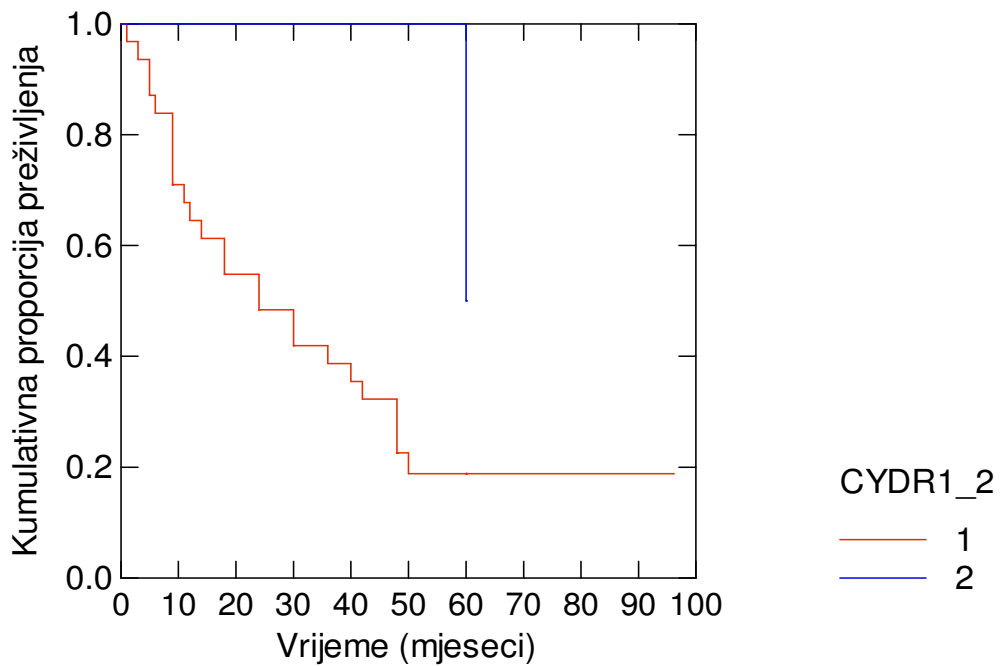
Ciklin D1 središtu tumora

Nm23 u transformacijskom rubu

Nm23 u invazivnom rubu

Nm23 u središtu tumora

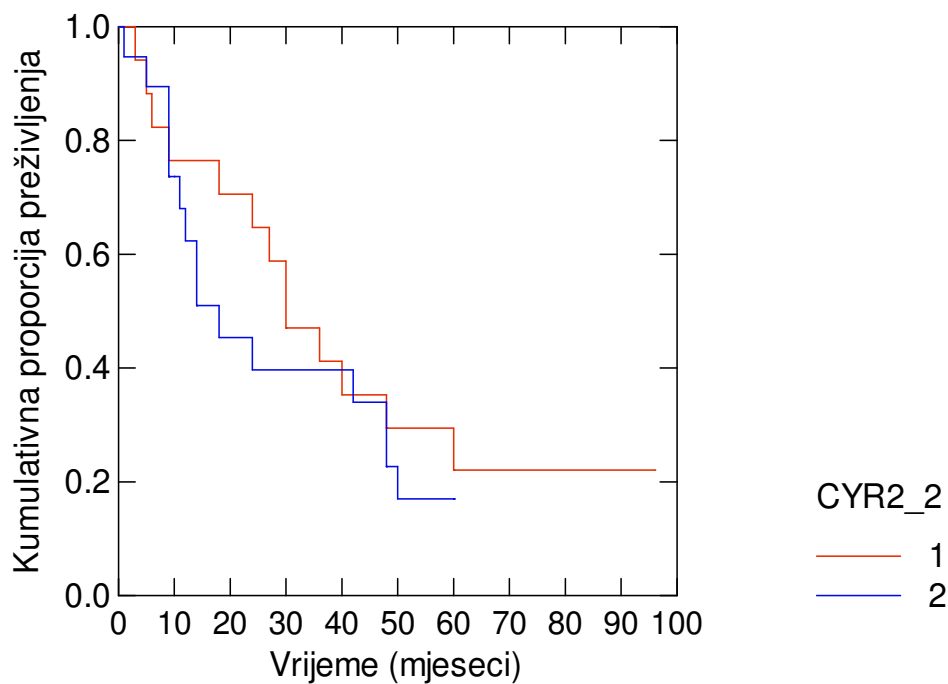
## Ciklin D1 (R1) i preživljenje



**Grafikon 11.** KM krivulje preživljenja za CYDR1\_2 (ciklin D1 u transformacijskom rubu)

KM krivulje preživljenja za ciklin D1 u transformacijskom rubu prikazane su na **Grafikonu 11**. Razlika u kumulativnoj proporciji preživljenja nije bila je signifikantna ( $\chi^2 = 2,400$ ,  $p = 0,121$ ).

## Ciklin D1 (R2) i preživljenje

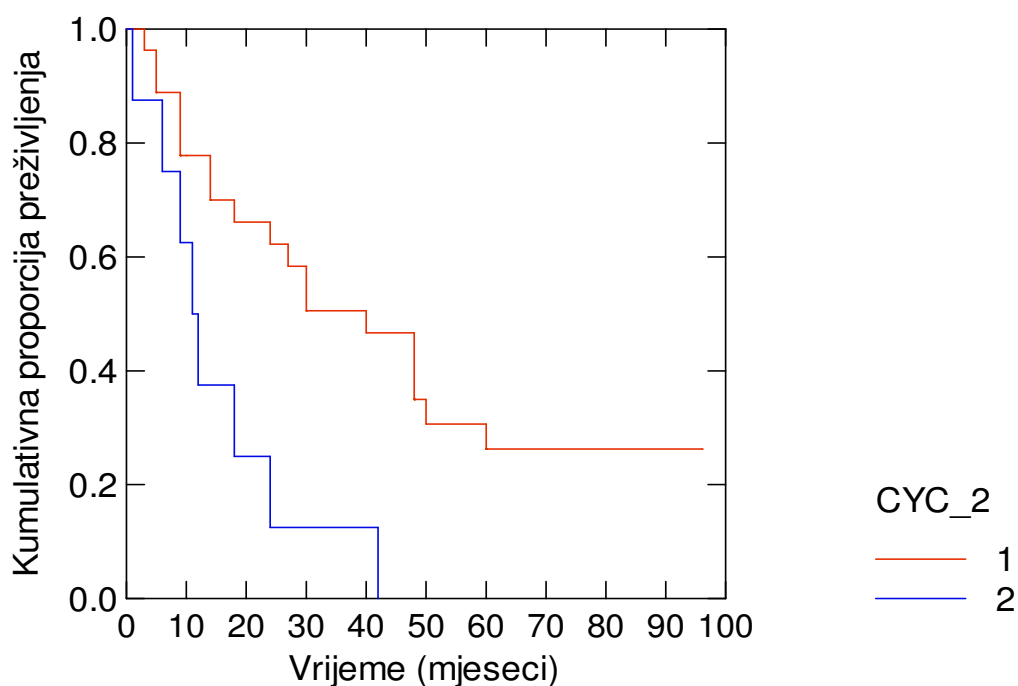


**Grafikon 12.** KM krivulje preživljenja za CYR2\_2 (ciklin D1 u invazivnom rubu)

**KM krivulje preživljenja za ciklin D1 u invazivnom rubu** prikazane su na

**Grafikonu 12.** Kumulativna proporcija preživljenja nije bila statistički signifikantna ( $\chi^2 = 0,446$ ,  $p = 0,504$ ).

## Ciklin D1 (C) i preživljenje



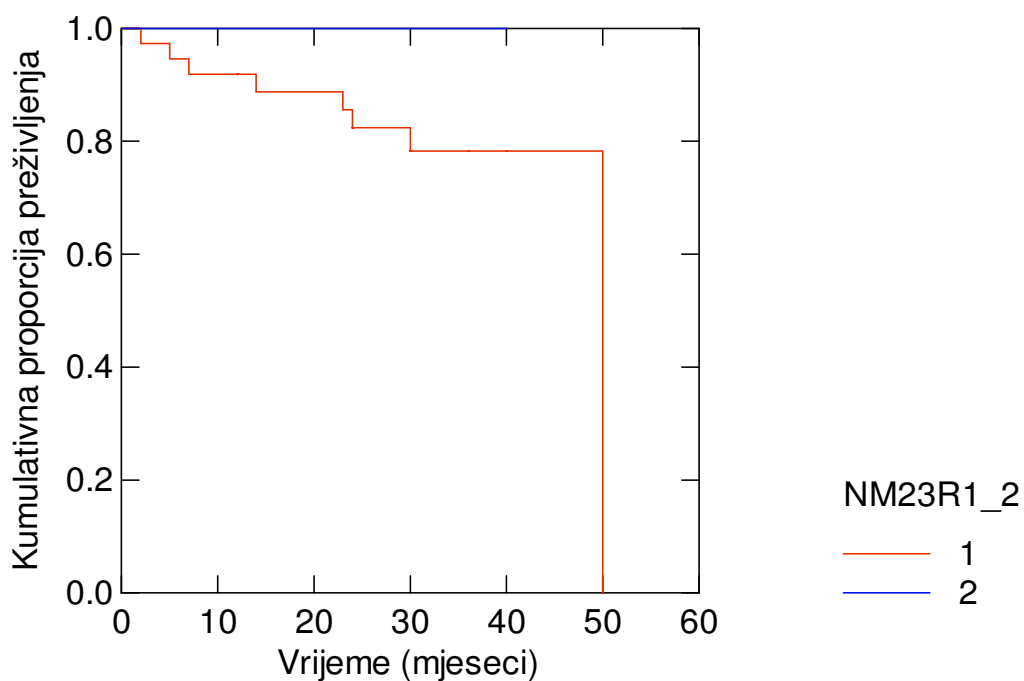
**Grafikon 13.** KM krivulje preživljenja za CYC\_2 (ciklin D1 u središtu tumora)

KM krivulje preživljenja za ciklin D1 u središtu tumora prikazane su na **Grafikonu 13**. Razlika u kumulativnoj proporciji preživljenja bila je signifikantna ( $\chi^2 = 7,021$ ,  $p = 0,008$ ).

Analizirajući odnos ciklina D1 u transformacijskom rubu, invazivnom rubu i središtu tumora te preživljenja vidi se da su kumulativne proporcije preživljenja bile statistički značajne za intenzitet reakcija u središnjem dijelu tumora, gdje manji intenzitet reakcije znači i bolje preživljenje.



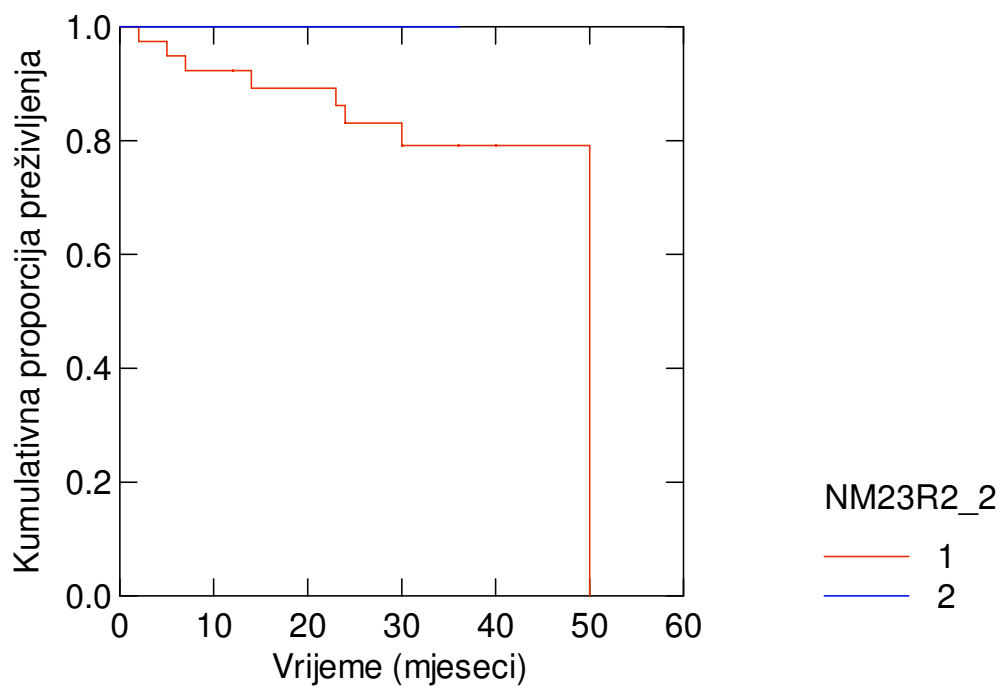
## Nm23 (R1) i preživljenje



**Grafikon 14.** KM krivulje preživljenja za NM23R1\_2 (nm23 u transformacijskom rubu)

KM krivulje preživljenja za nm23 u transformacijskom rubu prikazane su na **Grafikonu 14**. Log - rank test je pokazao da kumulativna proporcija preživljenja nije statistički značajna ( $\chi^2 = 0,238$  ,  $p = 0,626$ ).

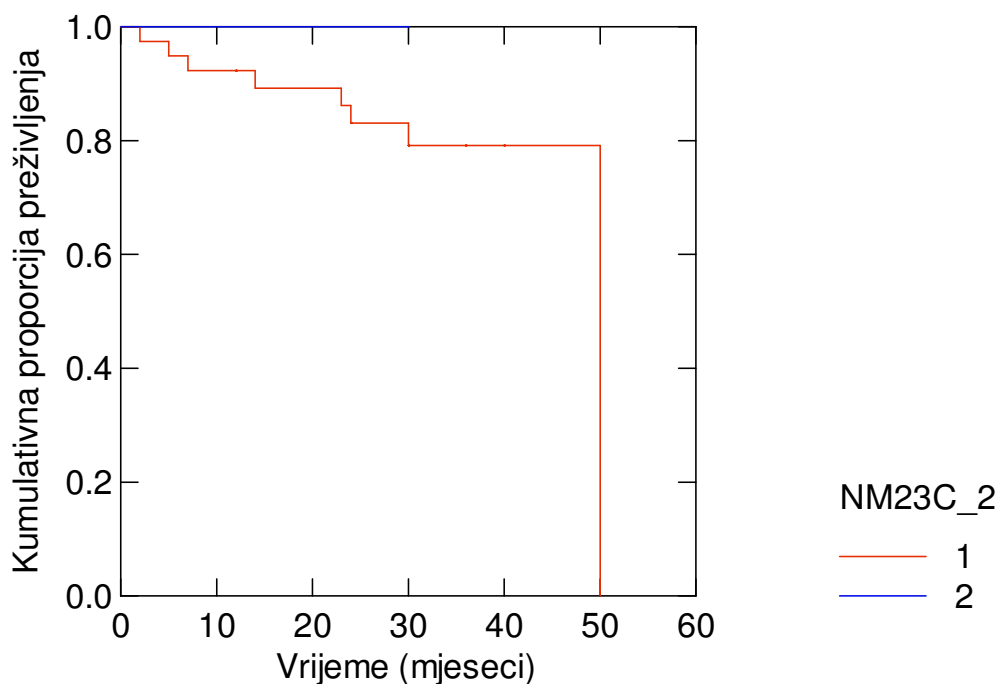
## Nm 23 (R2) i preživljenje



**Grafikon 15.** KM krivulje preživljenja za NM23R2\_2 (nm23 u invazivnom rubu)

**KM krivulje preživljenja za nm23 u invazivnom rubu** prikazane su na **Grafikonu 15**. Kumulativna proporcija preživljenja nije bila statistički signifikantna ( $\chi^2 = 0,227$ ,  $p = 0,633$ ).

## Nm 23 (C) i preživljenje



**Grafikon 16.** KM krivulje preživljenja za NM23C\_2 (nm23 u središtu tumora)

**KM krivulje preživljenja za nm23 u središtu tumora** prikazane su na **Grafikonu 16**. Log - rank test je pokazao da kumulativna proporcija preživljenja nije statistički značajna ( $\chi^2 = 0,227$ ,  $p = 0,633$ ).

Iz učenjene analize za nm23 nije dobivena statistički značajna krivulja preživljenja iako je uočljiva tendencija boljeg preživljenja bolesnika s manjom ekspresijom nm23.

Statistička analiza KM metodom učinjena je i za gubitak heterozigotnosti nm23-H1 gena (LOH), ali s obzirom na mali broj rezultata, kumulativna proporcija preživljenja nije bila statistički značajna.

#### **4.6. Korelacija ispitivanih parametara s klasičnim prognostičkim čimbenicima**

Uporabom Spearmanove rang korelacije istražena je povezanost katepsina D, ciklina D1, nm23, u transformacijskom rubu (R1), invazivnom rubu (R2) i središtu tumora te gubitka heterozigotnosti nm23-H1 gena (LOH-a), s dobi, veličinom tumora (T), zahvaćenosti limfnih čvorova (N), prisutnosti metastaza (M) te histološkim gradusom (G).

Testirana je korelacija između katepsina D, ciklina D1, nm23, u transformacijskom rubu (R1), invazivnom rubu (R2) i središtu tumora te nm23-H1 gena (LOH-a) s dobi bolesnika, uporabom Spearmanove rang korelacije te je utvrđena statistički značajna povezanost slijedećih varijabli: dobi i gradusa (G) te dobi i nm23 u središtu tumora, dok je statistički značajna, negativna korelacija utvrđena između dobi i zahvaćenosti limfnih čvorova (N) što se vidi iz **Tablice 24**.

**Tablica 24:** Korelacija ispitivanih parametara s dobi Spearman R testom

VARIJABLE	Spearman R	p vrijednost
DOB i T	-0.080251	0.351227
<b>DOB i N</b>	<b>-0.210973</b>	<b>0.014785</b>
DOB i M	-0.006876	0.939583
<b>DOB i GRADUS</b>	<b>0.214452</b>	<b>0.005979</b>
DOB i KR1T	0.035501	0.738316
DOB i KR1S	0.017760	0.868043
DOB i KR2T	-0.085569	0.402169
DOB i KR2S	0.124323	0.204178
DOB i KCT	-0.049439	0.616480
DOB i KCS	0.011055	0.911754
DOB i CYDR1	-0.044658	0.755669
DOB i CYDR2	-0.062640	0.640408
DOB i CYDC	-0.133814	0.321021
DOB i NM23R1	0.068906	0.617159
DOB i NM23R2	0.157791	0.236822
<b>DOB i NM23C</b>	<b>0.334463</b>	<b>0.010284</b>
DOB i LOH	0.206912	0.368161

Kada je testiran suodnos ispitivanih parametara i veličine tumora Spearman R testom statistički značajna pozitivna korelacija utvrđena je između: veličine tumora (T) i zahvaćenosti limfnih čvorova (N), T i katepsina D u transformacijskom rubu u tumorskim stanicama, T i katepsina D u invazivnom rubu u tumorskim stanicama, T i katepsina D u središtu tumora u tumorskim stanicama, a negativna između T i katepsina D u transformacijskom rubu u stromi i T i katepsina D u invazivnom rubu u stromi, što je prikazano u **Tablici 25**.

**Tablica 25:** Korelacija ispitivanih parametara s veličinom tumora Spearman R testom

VARIJABLE	Spearman R	p vrijednost
T i DOB	-0.080251	0.351227
<b>T i N</b>	<b>0.366403</b>	<b>0.000014</b>
T i M	0.126888	0.161947
T i GRADUS	0.050132	0.562185
<b>T i KR1T</b>	<b>0.351165</b>	<b>0.003571</b>
<b>T i KR1S</b>	<b>-0.327157</b>	<b>0.006466</b>
<b>T i KR2T</b>	<b>0.261020</b>	<b>0.023704</b>
<b>T i KR2S</b>	<b>-0.379230</b>	<b>0.000568</b>
<b>T i KCT</b>	<b>0.285039</b>	<b>0.011424</b>
T i KCS	-0.096608	0.403253
T i CYDR1	0.203821	0.207131
T i CYDR2	0.210211	0.160853
T i CYDC	0.120757	0.429430
T i NM23R1	-0.017717	0.898814
T i NM23R2	-0.046526	0.731096
T i NM23C	0.156119	0.246177
T i LOH	-0.248361	0.305239

Kada se istražio suodnos ispitivanih parametara i zahvaćenosti limfnih čvorova (N) statistički značajna pozitivna korelacija dobivena je između N i veličine tumora (T), a negativna između: N i dobi, N i katepsina D u transformacijskom rubu u stromi, N i katepsina D u invazivnom rubu u stromi te N i katepsina D u središtu tumora u stromi, što je prikazano u **Tablici 26**.

**Tablica 26:** Korelacija ispitivanih parametara s zahvaćenošću limfnih čvorova Spearman R testom

VARIJABLE	Spearman R	p vrijednost
<b>N i DOB</b>	<b>-0.210973</b>	<b>0.014785</b>
<b>N i T</b>	<b>0.366403</b>	<b>0.000014</b>
N i M	0.120974	0.186248
N i GRADUS	0.115840	0.185934
N i KR1T	0.189955	0.132733
<b>N i KR1S</b>	<b>-0.314897</b>	<b>0.010623</b>
N i KR2T	0.191298	0.107460
<b>N i KR2S</b>	<b>-0.417777</b>	<b>0.000173</b>
N i KCT	0.192825	0.097426
<b>N i KCS</b>	<b>-0.277317</b>	<b>0.016753</b>
N i CYDR1	0.243195	0.152938
N i CYDR2	0.285693	0.066644
N i CYDC	0.282970	0.073021
N i NM23R1	-0.075420	0.591448
N i NM23R2	-0.073836	0.588636
N i NM23C	0.171836	0.205391
N i LOH	-0.288292	0.231329

Testirana je i korelacija katepsina D, ciklina D1, nm23, u transformacijskom rubu (R1), invazivnom rubu (R2) i središtu tumora te nm23-H1 gena (LOH-a) s prisutnošću metastaza (M), ali nije utvrđena statistički značajna povezanost istraženih parametara, što se vidi iz **Tablice 27**.

**Tablica 27:** Korelacija ispitivanih parametara s prisutnošću metastaza Spearman R testom

<b>VARIJABLE</b>	<b>Spearman R</b>	<b>p vrijednost</b>
M i DOB	-0.006876	0.939583
M i T	0.126888	0.161947
M i N	0.120974	0.186248
M i GRADUS	0.078044	0.390878
M i KR1T	0.000000	1.000000
M i KR1S	--	--
M i KR2T	-0.115979	0.339015
M i KR2S	0.006304	0.958695
M i KCT	-0.039210	0.749062
M i KCS	-0.088805	0.468067
M i CYDR1	-0.119024	0.502570
M i CYDR2	0.222810	0.166992
M i CYDC	0.189886	0.246935
M i NM23R1	0.233934	0.095084
M i NM23R2	-0.134164	0.333437
M i NM23C	-0.094846	0.495108
M i LOH	0.024840	0.922062

Spearman R testom testirana je i korelacija ispitivanih parametara s gradusom te je utvrđena statistički značajna povezanost slijedećih varijabli: gradusa i dobi bolesnika te gradusa i katepsina D u invazivnom rubu u stromi, što se vidi u **Tablici 28**.



**Tablica 28:** Korelacija ispitivanih parametara s gradusom, Spearman R testom

<b>VARIJABLE</b>	<b>Spearman R</b>	<b>p vrijednost</b>
<b>GRADUS i DOB</b>	<b>0.214452</b>	<b>0.005979</b>
GRADUS i T	0.050132	0.562185
GRADUS i N	0.115840	0.185934
GRADUS i M	0.078044	0.390878
GRADUS i KR1T	-0.059102	0.573609
GRADUS i KR1S	0.144897	0.168177
GRADUS i KR2T	-0.047022	0.640543
<b>GRADUS i KR2S</b>	<b>0.218250</b>	<b>0.022615</b>
GRADUS i KCT	0.051821	0.594286
GRADUS i KCS	0.120295	0.219335
GRADUS i CYDR1	-0.088293	0.533659
GRADUS i CYDR2	0.112364	0.396823
GRADUS i CYDC	-0.012103	0.928151
GRADUS i NM23R1	0.019100	0.889915
GRADUS i NM23R2	-0.053982	0.687348
GRADUS i NM23C	0.120968	0.365711
GRADUS i LOH	-0.080119	0.729925

Uporabom Spearmanove rang korelacije istražena je međusobna povezanost katepsina D te ciklina D1, nm23, u transformacijskom rubu (R1), invazivnom rubu (R2) i središtu tumora i nm23-H1 gena (LOH-a).

Kada je testiran suodnos katepsina D i ispitivanih parametara Spearman R testom statistički značajna pozitivna korelacija utvrđena je između: katepsina D u transformacijskom rubu u tumorskim stanicama s: veličinom tumora (T), katepsinom D u invazivnom rubu u tumorskim stanicama i katepsinom D u središtu tumora u tumorskim stanicama, a negativna s katepsinom D u invazivnom rubu u stromi.

Statistički značajna korelacija utvrđena je i između: katepsina D u transformacijskom rubu u stromi s katepsinom D u invazivnom rubu u stromi, dok je negativna korelacija

utvrđena između katepsina D u transformacijskom rubu u stromi i veličine tumora te zahvaćenosti limfnih čvorova (N).

Utvrđena je i statistički značajna pozitivna povezanost katepsina D u invazivnom rubu u tumorskim stanicama s: veličinom tumora (T), katepsinom D u transformacijskom rubu u tumorskim stanicama te katepsinom D u središtu tumora u tumorskim stanicama, a negativna s katepsinom D u invazivnom rubu u stromi.

Katepsin D u invazivnom rubu u stromi statistički značajno, u pozitivnoj korelaciji je bio s: gradusom, katepsinom D u transformacijskom rubu u stromi, katepsinom D u središtu tumora u stromi, a u negativnoj korelaciji s: veličinom tumora (T), zahvaćenošću limfnih čvorova (N), katepsinom D u transformacijskom rubu u tumorskim stanicama, katepsinom D u invazivnom rubu u tumorskim stanicama, katepsinom D u središtu tumora u tumorskim stanicama, ciklinom D1 u invazivnom rubu te ciklinom D1 u središtu tumora.

Utvrđena je i statistički značajna pozitivna povezanost katepsina D u središtu tumora s: veličinom tumora (T), katepsinom D u transformacijskom rubu u tumorskim stanicama, katepsinom D u invazivnom rubu u tumorskim stanicama te negativna s katepsinom D u invazivnom rubu u stromi.

Spearman R testom također je utvrđena statistički značajna pozitivna korelacija između katepsina D u središtu tumora u stromi i: katepsina D u invazivnom rubu u stromi, a negativna s zahvaćenosti limfnih čvorova (N), što je sve prikazano u **Tablici 29**.

**Tablica 29:** Parametri testirani Spearman R testom koji pokazuju značajnu korelaciju

VARIJABLE	Spearman R	p vrijednost
KR1T i T	0.351165	0.003571
KR1S i T	-0.327157	0.006466
KR1S i N	-0.314897	0.010623
KR2T i T	0.261020	0.023704
KR2S i T	-0.379230	0.000568
KR2S i N	-0.417777	0.000173
KR2S i GRADUS	0.218250	0.022615
KR2S i CYDR2	-0.308823	0.021786
KR2S i CYDC	-0.356208	0.008201
KCT i T	0.285039	0.011424
KCS i N	-0.277317	0.016753

Uporabom Spearmanove rang korelacije istražena je međusobna povezanost ciklina D1 te katepsina D, nm23, u transformacijskom rubu (R1), invazivnom rubu (R2) i središtu tumora i nm23-H1 gena (LOH-a). Statistički značajna, pozitivna korelacija utvrđena je između: ciklina D1 u transformacijskom rubu tumora i ciklina D1 u invazivnom rubu tumora te nm23 u središtu tumora. Ciklin D1 u invazivnom rubu bio je u statistički značajnoj, negativnoj korelaciji s katepsinom D u invazivnom rubu u stromi te pozitivnoj korelaciji s ciklinom D1 u transformacijskom rubu tumora. Ciklin D1 u središtu tumora bio je u statistički značajnoj, pozitivnoj korelaciji s ciklinom D1 u invazivnom rubu tumora te negativnoj s katepsinom D u invazivnom rubu u stromi, što se vidi iz **Tablice 30.**

**Tablica 30:** Parametri testirani Spearman R testom koji pokazuju značajnu korelaciju

VARIJABLE	Spearman R	P vrijednost
CYDR1 i NM23C	0.682191	0.007192
CYDR2 i KR2S	-0.308823	0.021786
CYDC i KR2S	-0.356208	0.008201

Istražena je i međusobna povezanost nm23 i katepsina D, ciklina D1 u transformacijskom rubu (R1), invazivnom rubu (R2) i središtu tumora i nm23-H1 gena (LOH-a). Statistički značajna korelacija utvrđena je između: nm23 u transformacijskom rubu tumora i nm23 u invazivnom rubu tumora, nm23 u invazivnom rubu tumora i nm23 u središtu tumora, nm23 u središtu tumora i ciklina D1 u transformacijskom rubu tumora te nm23 u središtu tumora i nm23 u invazivnom rubu tumora, što je prikazano u **Tablici 31**.

**Tablica 31:** Parametri testirani Spearman R testom koji pokazuju značajnu korelaciju

VARIJABLE	Spearman R	p vrijednost
NM23C i CYDR1	0.682191	0.007192

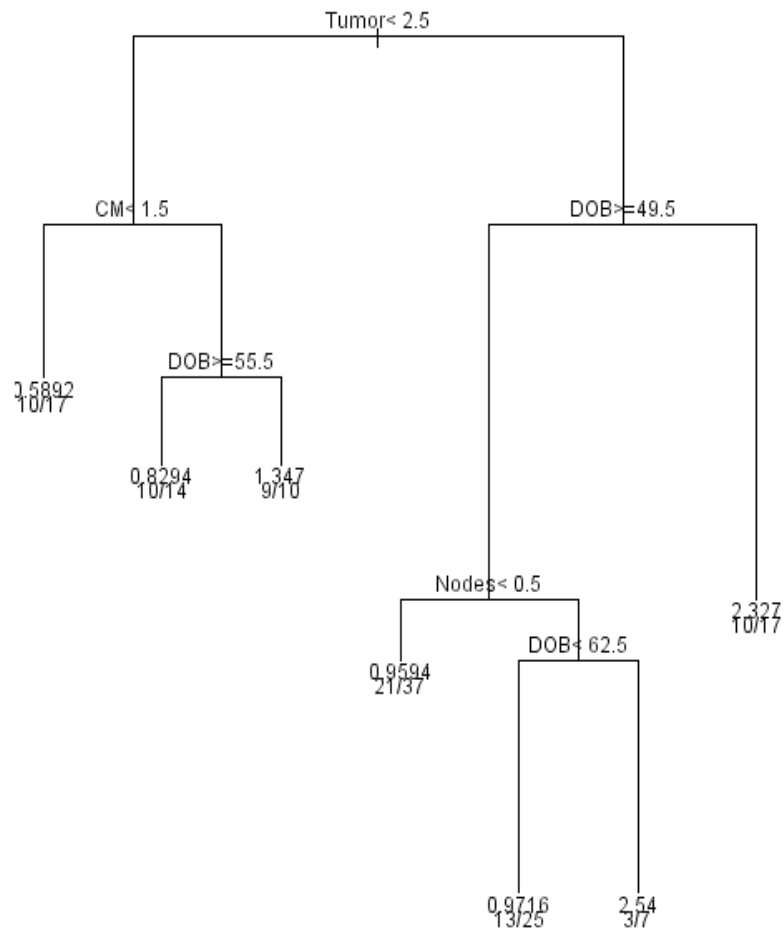
Uporabom Spearmanove rang korelacije istražena je međusobna povezanost gubitka heterozigotnosti nm23-H1 gena (LOH-a) i, katepsina D, nm23, u transformacijskom rubu (R1), invazivnom rubu (R2) i središtu tumora. Statistički značajna korelacija utvrđena je jedino između gubitka heterozigotnosti nm23-H1 gena (LOH-a) i ciklina D1 u invazivnom rubu tumora, što se vidi iz **Tablici 32**.

**Tablica 32:** Statistički značajna korelacija za nm23-H1 gen (LOH) utvrđena Spearman R testom

<b>VARIJABLE</b>	<b>Spearman R</b>	<b>p vrijednost</b>
<b>NM23LOH i CYDR2</b>	<b>0.912871</b>	<b>0.030466</b>

## 4.7. REZULTATI ALGORITAMSKE ANALIZE PODATAKA UPORABOM RPART-A

RPART modul je konstruirao slijedeći algoritam za procjenu kumulativnog rizika koji se grafički može prikazati na slijedeći način:



n=127 (43 observations deleted due to missing)

node), split, n, deviance, yval  
\* denotes terminal node

```

1) root 127 107.273400 1.0000000
2) Tumor < 2.5 41 39.670890 0.8030107
4) KCS < 1.5 17 17.017400 0.5891576 *
5) KCS >= 1.5 24 20.310190 1.0158120
10) DOB >= 55.5 14 10.521220 0.8294087 *
11) DOB < 55.5 10 8.449391 1.3465800 *
  
```

```

3) Tumor>=2.5 86 64.714050 1.1810850
6) DOB>=49.5 69 50.645680 1.0294140
12) Nodes< 0.5 37 23.109390 0.9594485 *
13) Nodes>=0.5 32 27.252500 1.1345160
26) DOB< 62.5 25 17.547880 0.9715752 *
27) DOB>=62.5 7 6.145659 2.5400470 *
7) DOB< 49.5 17 8.321853 2.3273560 *

```

Tumačenje algoritma se zasniva na nizu binarnih čvorova u kojima se vrši razdvajanje ispitanika na osnovu njihovih varijabli. Ukupno je za analizu uzeto 127 ispitanika jer su za njih postojali cjelokupni podaci. 43 ispitanika nije uzeto za analizu zbog manjka podataka u jednoj ili više varijabli.

Prvi čvor vrši razdvajanje ispitanika na osnovu klasične varijable T (Tumor) u TNM ljestvici. Jedna grana čvora sadrži ispitanike kojima T iznosi 1 i 2, a druga ispitanike s T vrijednošću 3 i 4.

A.

Grana s ispitanicima kojima je T 1 i 2 se potom dijeli u čvoru kojeg čini varijabla KCS (katepsin D u središtu neoplazme u stromi). Oni ispitanici koji su imali vrijednost varijable KCS 1 (intezitet bojanja 0 i 1) imali su koeficijent kumulativnog rizika umiranja 0,5892. Kod ispitanika s vrijednošću varijable KCS 2 (intezitet bojanja 2 i 3), razdvajanje je nadalje vršeno u čvoru po dobi. Ispitanici s dobi jednakoj ili većoj od 55,5 godina imali su koeficijent kumulativnog rizika umiranja 1,347, dok su mlađi od 55,5 godina imali koeficijent kumulativnog rizika umiranja 0,8294.

B.

Grana koja sadrži ispitanike s vrijednošću varijable T 3 i 4 dijeli se u čvoru kojeg čini varijabla dob i to na ispitanike mlađe od 49,5 godina, te na ispitanike s 49,5 godina ili

starije. Ispitanici mlađi od 49,5 godina imaju koeficijent kumulativnog rizika umiranja 2,327. Grana s ispitanicima starijima od 49,5 godina potom se dijeli u čvoru koji ponovno sadržava varijablu Nodes, a to je klasična N varijabla (zahvaćenost limfnih čvorova iz TNM ljestvice). Osobe kojima limfni čvorovi nisu zahvaćeni imaju koeficijent kumulativnog rizika umiranja 0,9594, što je manje od ispitanika kojima su limfni čvorovi zahvaćeni. Kod te podskupine ponovno treba gledati dob. Osobe mlađe od 62,5 godina imaju koeficijent kumulativnog rizika umiranja 0,9716, dok osobe od 62,5 godina ili starije imaju koeficijent kumulativnog rizika umiranja 2,54.



## 5. RASPRAVA

Intratumorska heterogenost definira se kao postojanje diploidnog i aneuploidnog sadržaja DNK ili postojanje višestrukih abnormalnih staničnih linija s ekspresijom različitih gena/antigena ili produkcijom različitih proteina/onkoproteina u različitim dijelovima jednog tumora. Heterogenost tumorskih stanica razvija se kroz proces progresije ili napredovanja tumora te se može reći da se tumori sastoje od različitih staničnih subpopulacija s različitim biološkim karakteristikama. Značaj ovakve heterogenosti ogleđa se u mogućem divergentnom biološkom ponašanju pojedinih tumorskih podklonova. U praktičnom smislu to znači da će pojedini dijelovi tumora pokazivati drugačiju sposobnost invadiranja, metastaziranja, otpornost prema kemoterapiji i/ili zračenju (37). Moći predvidjeti takvo ponašanje tumora ili postojanje potencijala za takvo ponašanje, predstavljalo bi znatan doprinos u praćenju i terapiji bolesnika. Drugo vrlo značajno pitanje je mogućnost i svrsishodnost određivanja pojedinih prognostičkih (ili bilo kojih drugih) čimbenika u heterogenoj populaciji tumorskih stanica. Neoplazma je trodimenzionalna struktura gdje, teoretski gledano, različiti tumorski klonovi mogu biti raspoređeni jednoliko unutar njene mase ili predominantno u pojedinim dijelovima tumora. Uobičajeni pristup, koji naročito podržavaju nemorfološke struke, a uključuje sve moguće razine moderne tehnologije, promatra tumor kao mješavinu stanica i samim tim, kao mješavinu različitih klonova. Ako, međutim, neoplazmu shvatimo kao autonomno rastuću tvorbu koja je u interakciji sa svojim okolišem (domaćinom) onda je logično očekivati određenu trodimenzionalnu organizacijsku strukturu te barem u nekim elementima (i to poglavito onima koji su vezani za rast, invaziju i metastaziranje), prostorni raspored unutar tumora. Ako je to

točno, proučavanje tumora kao cjeline nije uvijek svrsishodno te bismo više korisnih informacija mogli dobiti proučavajući svaki njegov prostorni dio odvojeno.

Našim smo istraživanjem željeli saznati da li u ispitanom materijalu postoji razlika u ekspresiji istih parametara između histološki određenih centra i rubova tumora. Također se istražila povezanost ovih čimbenika s klasičnim prognostičkim pokazateljima (TNM stadijem i stupnjem histološke diferencijacije tumora) za svako mikroskopsko područje posebno te prognostička vrijednost svakoga područja zasebno u odnosu na preživljenje bolesnika. Na taj način se iz tumora kao cjeline pokušalo izdvojiti područje (ili područja) koje je prognostički relevantno te bi se u budućim rutinskim aplikacijama izbjeglo uzimanje u obradu dijelova tumora koji daju irelevantne vrijednosti te dovode do pogrešnih zaključaka odnosno pojačavanjem «šuma» onemogućavaju stvaranje zaključaka.

Ovom studijom istražili smo intratumorsku heterogenost ekspresije bjelančevina ciklina D1, nm23 i katepsina D kao i nm23 gena u planocelularnom karcinomu grkljana istražujući tri različite tumorske regije. One su bile mikroskopski definirana, histološki različita područja tumora: središte tumora (C), transformacijski rub (R1) te invazivni rub (R2).

Prognostička važnost katepsina D u pacijenata s karcinomima glave i vrata često je bila predmetom istraživanja (82-86) Utvrđeno je bolje preživljenje kod pacijenata s niskim vrijednostima enzima u citosolu ili serumu (87-90) i slabim intenzitetom bojanja imunohistokemijski (91). Prognostička vrijednost katepsina D istaknuta je u tri (83,84,88) od četiri studije koje su koristile multivarijatnu analizu. Također je utvrđena povezanost ekspresije katepsina D s metastazama u cervikalnim limfnim čvorovima kod pacijenata s karcinomom glave i vrata, s time da ekspresija katepsina D signifikantno korelirala s prisutnošću metastaza, slabom histološkom diferencijacijom i visokim proliferacijskim

indeksom.(92,93). I u našim prethodnim istraživanjima ustanovili smo visoku prognostičku vrijednost imunohistokemijski određenog katepsina D. Istraživanje je rađeno na cijelom tumoru, uz posebnu kvantifikaciju reakcije u tumorskim stanicama i tumorskoj stromi. Imunohistokemijska kvantifikacija ima neprijeponu prednost pred biokemijskom upravo zbog činjenice da je samo tako moguće razlikovati reakciju u tumorskim stanicama od one u stromalnim (mahom histiocitima). To je naročito važno u svijetlu činjenica da se visoka vrijednost u tumorskim stanicama pokazala kao negativan, a visoka vrijednost u stromalnim stanicama kao pozitivan prognostički čimbenik (63).

U ovom radu dobiveni su vrlo zanimljivi rezultati vezani za ekspresiju katepsina D. Gledajući tumor u cijelosti ustanovljena je statistički značajna razlika između centra tumora i invazivnog ruba te između invazivnog i transformacijskog ruba i to kako za tumorske stanice, tako i za stromu. Reakcija je najjača u invazivnom rubu, srednje jaka u centru i najslabija u transformacijskom rubu. Uspoređujući ekspresiju katepsina D sa klasičnim prognostičkim parametrima dobivena je korelacija između veličine tumora (T) i vrijednosti katepsina u tumorskim stanicama svih područja te negativna korelacija za rubove i vrijednosti katepsina u tumorskoj stromi. Također je ustanovljena korelacija između reakcije u stromi invazivnog ruba te stupnja diferencijacije tumora (G). Ovi rezultati u skladu su sa literaturnim podacima za tumore glave i vrata, koji su dobiveni na uzorcima tumora uzetim bez neke prostorne orijentacije (92,93). Naročito je značajan nalaz prognostičke vrijednosti katepsina D u tumorskim stanicama transformacijskog ruba i centra tumora, gdje veća ekspresija označava lošiju prognozu, te obrnuto prognostičko značenja ekspresije katepsina D u stromi invazivnog ruba, gdje veća vrijednost označava povoljniju prognozu. I u ostalim regijama tumora postoje rezultati koji pokazuju istu tendenciju samo nisu dosegli razinu značajnosti. Ovi nalazi odgovaraju našim prethodnim rezultatima (63) i drugim literaturnim podacima (83,88) gdje

ekspresija katepsina D u tumorskim stanicama mahom korelira sa njegovom agresivnošću, dok stromalna reakcija korelira sa upalnim odgovorom. Iako postoji intratumorska heterogenost u ekspresiji katepsina D kako u tumorskim tako i u stromalnim stanicama ipak prognostička tendencija svih regija ide u istom smjeru što rezultira dobrom prognostičkom vrijednošću na nasumično uzetom uzorku tumora te katepsin D određen imunohistokemijski, čini potentnim prognostičkim čimbenikom. (63,93) To svakako još više naglašava činjenica da je uz etablirane klasične prognostičke parametre, jedino vrijednost katepsina D u stromi centra tumora algoritam (RPART) izdvojio kao visoko vrijedan prognostički čimbenik.

Ciklin D1 je bjelančevina uključena u regulaciju staničnog ciklusa te kontrolira ekspresiju Rb gena. Poremećaj u regulaciji ciklina D1 ima utjecaja na razvoj različitih tipova neoplazmi, primjerice cerviksa (55), hepatocelularnog karcinoma (56) te jednjaka (57). Ovakav utjecaj izgleda da je jače izražen u već uznapredovalim tumorima (61).

Utjecaj ciklina D1 u progresiji plancelularnog karcinoma glave i vrata još nije dovoljno istražen. Prekomjerna ekspresija ciklina D1 većinom je bila istražena u tumorskim staničnim linijam (94-96), a rezultati nisu bili konzistentni. Neki su autori opisali prognostički značaj ciklina D1 u planocelularnom karcinomu grkljana, dok su drugi dali suprotne rezultate (73,74,97). I ovdje izgleda da je prekomjerna ekspresija ciklina jače izražena u već uznapredovalim tumorima nego u ranoj fazi karcinogeneze ili najranijem stadiju invazivnog karcinoma grkljana (75). Neki autori opisuju da je prekomjerna ekspresija ciklina D1 u plancelularnim karcinoma glave i vrata udružena s češćim recidivima i kraćim preživljenjem (98). Također je opisano da ekspresija ciklina D1 korelira s prisutnošću okultnih cervikalnih metastaza u pacijenata s karcinomima glave i vrata, što ukazuje na mogućnost korištenja imunohistokemijske analize bioptičkog materijala kao dodatnog sredstva za identifikaciju onih pacijenata koji će biti tretirani

elektivnom disekcijom vrata (99). U našem istraživanju pokazali smo da postoji statistički značajna razlika u ekspresiji ciklina D1 u različitim dijelovima tumora, s time da je najjače izražena u invazivnom rubu, zatim centru te transformacijskom rubu. Ciklin D1 je određivan samo u tumorskim stanicama, jer je njegova prisutnost u stromi neznatna. Korelirajući njegovu ekspresiju sa standardnim prognostičkim čimbenicima ustanovili smo da postoji izrazita tendencija korelacije sa zahvaćenošću limfnih čvorova, ali ne doseže razinu značajnosti ( $p=0,07$ ). To je svakako u skladu s literaturnim podacima o ciklinu D1 kao mogućem markeru za metastatski potencijal (99). Jedan je od mogućih uzroka korelacije koja ne doseže prag te neulasku u prognostički algoritam leži u relativno malom broju tumora gdje je bojenje uspjelo na svim uzorcima.

Visoke vrijednosti ekspresije ciklina D1 u centru tumora dobro koreliraju sa lošom prognozom, što je također u skladu s literaturnim podacima za cjelovite tumore (98). Slična tendencija se vidi i u invazivnom rubu, ali ne doseže razinu značajnosti. Očito je dakle da kod ciklina D1, kao i kod katepsina D, središte tumora, kao najveća masa stanica, iako ne pokazuje najveći intenzitet bojenja, predstavlja svojevrsni „pacemaker“ – određujući element za ponašanje tumora.

Zanimljiva je i korelacija s katepsinom D, gdje postoji negativna povezanost ekspresije ciklina D1 u središtu tumora i u invazivnom rubu sa imunoreaktivnošću katepsina D u stromi invazivnog ruba. Korelacija sa katepsinom D svakako je dodatni pokazatelj mogućeg prognostičkog značaja na koji treba usmjeriti daljnja istraživanja.

Generalno je prihvaćeno mišljenje o nm23 genu kao o «protumetastatskom genu». To vrijedi za većinu tumora. Kod karcinoma dojke (68,100), kolorektalnog (66), želučanog (69) cervikalnog (70) i hepatocelularnog karcinoma, reducirana ekspresija nm23-H1 gena udružena je s prisustvom metastaza u limfnim čvorovima i kraćim preživljenjem. Za razliku od ovih pokazatelja pojačana ekspresija nm23-H1 gena u planocelularnom

karcinomu glave i vrata povezana je s lošijom prognozom i visokim tumorskim stadijem. (26,84). Mc Donald i suradnici (60) također su pokazali da u planocelularnom karcinomu glave i vrata nm23 gen ima obrnutu prognostičku implikaciju, odnosno da je nm23-H1 gen povezan sa slabijim preživljenjem pacijenata. Engel i suradnici (63) dobili su slične rezultate na drugoj lokaciji tumora, na plućima. Oni opisuju povezanost visokih vrijednosti nm23-H1 i nm23-H2 gena u humanom planocelularnom karcinomu pluća sa slabom diferencijacijom tumora i uznapredovalim stadijem bolesti. Leone i suradnici (64,65) objavili su slične rezultate za agresivne neuroblastome. Dječji neuroblastomi stadija III (sa zahvaćenim regionalnim limfnim čvorovima) i IV (s udaljenim metastazama) bili su povezani s povišenim vrijednostima nm23 mRNK, u usporedbi s lokaliziranim tumorima. Povišene vrijednosti nm23 mRNK bile su udruženje sa značajnim skraćanjem preživljenja. Tako prema sadašnjem stanju znanosti nije moguće jednoznačno odrediti ulogu nm23 u nastanku i biologiji tumora. U našem istraživanju dobiveno je dosta malo statistički jasnih podataka. U prostornom rasporedu unutar tumora postoje razlike koje ne doiru razinu značajnosti. Ekspresija je najjače izražena u invazivnom, a najslabije u transformacijskom rubu. Nađena korelacija s dobi bolesnika eventualno bi se mogla pokazati korisnom u daljnjem razdvajanju bolesnika s povećanim izgledima lošeg tijeka bolesti, nakon zadnjeg grananja u algoritmu RPART na čemu treba dalje poraditi. U krivuljama preživljenja postoji tendencija lošijeg ishoda u bolesnika sa slabijom ekspresijom nm23 koja nije statistički značajna. Ovakav rezultat ne bi bio u skladu s dosad objavljenim radovima o ekspresiji nm23 u tumorima glave i vrata, ali budući da ove, i tako vrlo rijetke studije pate od sličnih nedostataka kao i ova naša potrebno je sve ove rezultate uzeti s određenom dozom opreza te eventualno provesti strogo kontroliranu prospektivnu studiju s pouzdanim protutijelom. Trenutno su u razini

tehnički razumne prihvatljivosti samo studije na molekularnoj razini s identifikacijom mRNK dok s identifikacijom proteina postoje određeni problemi.

Svakako treba napomenuti da se pri bojenju nm23 javljaju tehnički problemi koji ne postoje kod katepsina D. Prvo protutijelo je istraživačko protutijelo s visokom specifičnošću i dosta slabom osjetljivošću tako da postoji mogućnost lažno negativnog nalaza. Dodatni problem predstavljao je arhivski materijal u kojemu se nije uspjela dobiti zadovoljavajuća i konstantna reaktivnost u uzorcima starijim od tri godine. To je zahtijevalo proširenje izvorne baze bolesnika te smanjilo broj uzoraka koji su se mogli u cijelosti analizirati. Sličan problem javio se kod određivanja gubitka heterozigotnosti nm23-H1.

Ukupno uzevši rezultati ove studije dali su odgovore na neka od postavljenih pitanja, neka nisu, a postavili su i neke nove probleme.

Jasno se pokazalo da heterogenost unutar tumora nije difuzno raspoređena unutar tumorske mase, već da postoji prostorno organizirana struktura, barem što se tiče istraživanih parametara. Ovakva prostorna heterogenost dijelom je pokazala povezanost sa preživljenjem ili nekim od klasičnih prognostičkih čimbenika, a kao jedini od svih istraživanih novih parametara katepsin D u stromi centra tumora pokazao se kao klasifikator u naprednom klasifikacijskom modelu RPART. Time smo odgovorili na dva vrlo važna pitanja; heterogenost? Njena eventualna prognostička vrijednost? Slobodno se može ustvrditi da ovi rezultati, u svijetlu dosadašnjih stavova i pogleda na tumorsku biologiju, predstavljaju značajnu novost te da bi bilo korisno dalje slijediti ovdje postavljene smjernice. Jedan od mogućih ciljeva je konstruiranje 3D modela tumora na razini ekspresije proteina. Također je za vjerovati da takav model ne bi bio istoga izgleda i rasporeda u svih tumora, već da bi korelirao s ponašanjem tumora. Ono što je u ovom istraživanju ostalo samo dijelom odgovoreno je pitanje povezanosti ciklina D1 s

klasičnim prognostičkim čimbenicima dok je mjesto i uloga nm23 proteina te gubitka heterogenosti nm23 u karcinomima grkljana i nadalje prilično nerazjašnjeno područje.



## 6. ZAKLJUČCI

Iz rezultata ovoga rada može se zaključiti slijedeće:

1. Postoji prostorna intratumorska heterogenost koja se manifestira različitim stupnjem ekspresije katepsina D i ciklina D1 te donekle nm23 u različitim djelovima tumora (centar, invazivni rub, transformacijski rub/zona).
2. Za sve istraživane proteine (katepsin D, ciklin D1, nm23) najjača je ekspresija u invazivnom rubu, zatim u centru, a najslabija u transformacijskom rubu tumora. Treba napomenuti da u slučaju nm23 vrijednosti nisu dosegle razinu značajnosti
3. Postoji značajna korelacija ekspresije pojedinih proteina u različitim područjima tumora s klasičnim prognostičkim čimbenicima (veličinom tumora - T, metastazama u limfne čvorove - N, te stupnjem histološke diferencijacije (anaplazije) - G)
4. Korelacija je najjače izražena za invazivni rub, zatim za centar, a najslabije za transformacijski rub tumora, bez obzira o kojem istraživanom proteinu se radi
5. Kod katepsina D ustanovljena je pozitivna korelacija za ekspresiju u tumorskim stanicama s veličinom tumora te negativna korelacija za ekspresiju u stromi s veličinom tumora, infiltracijom limfnih čvorova te stupnjem diferencijacije (anaplazije)
6. Od drugih proteina najznačajnija je povezanost ciklina D1 u centru i rubu tumora s invazijom limfnih čvorova, koja nije dosegla razinu značajnosti ( $p=0,07$ ), ali bi mogla predstavljati osnovu procjene metastatskog potencijala tumora
7. Ustanovljena je povezanost prostorne heterogenosti sa preživljenjem (Kaplan-Meier krivulje) kako za katepsin D tako i za ciklin D1
8. Klasični prognostički parametri (T, N, G) pokazali su svoju prognostičku vrijednost

9. Kao jedini od svih istraživanih novih parametara katepsin D u stromi centra tumora pokazao se kao klasifikator u naprednom klasifikacijskom modelu RPART što upućuje na njegovu moguću prognostičku vrijednost

10. Možemo zaključiti da bi ovi rezultati trebali bitno utjecati na shvaćanje biologije tumora kao trodimenzionalne strukture, a ne jednolike mješavine stanica te na taj način doprinjeti stvaranju nove metodologije istraživanja tumora

## 7. SAŽETAK

Intratumorska heterogenost definira se kao postojanje diploidnog i aneuploidnog sadržaja DNK ili postojanje višestrukih abnormalnih staničnih linija s ekspresijom različitih gena/antigena ili produkcijom različitih proteina/onkoproteina u različitim djelovima jednog tumora. U dosadašnjim istraživanjima uglavnom nije vođeno računa o mogućnosti postojanja prostorno određene intratumorske heterogenosti, pa smo za cilj ovog rada odredili utvrditi intratumorsku heterogenost ekspresije bjelančevina katepsina D, ciklina D1, nm23 i nm23 gena u planocelularnom karcinomu grkljana istražujući tri različite tumorske regije te odrediti postoji li prognostička vrijednost bjelančevina katepsina D, ciklina D1, nm23 i nm23 gena u planocelularnom karcinomu grkljana vezano za njihov prostorni raspored unutar tumora. Također se pokušalo ustanoviti da li intratumorska heterogenost navedenih bjelančevina i gena pokazuje povezanost s klasičnim prognostičkim čimbenicima (TNM i histološki gradus) te preživljenjem.

U studiju je uključeno 170 bolesnika s karcinomom grkljana koji su bili operirani (hemilaringektomirani i laringektomirani) na Klinici za otorinolaringologiju KBC Šalata u Zagrebu te Odjelu za otorinolaringologiju Opće bolnice Slavonski brod, od 1987 do 2003 godine. Statistika preživljenja rađena je na 127 bolesnika kod kojih je postojala sva medicinska dokumentacija.

Rezultati su pokazali da postoji prostorna intratumorska heterogenost koja se manifestira različitim stupnjem ekspresije katepsina D i ciklina D1 u različitim djelovima tumora, tako da je najjača ekspresija u invazivnom rubu, zatim u centru, a najslabija u transformacijskom rubu tumora. Utvrđena je značajna korelacija ekspresije pojedinih proteina u različitim područjima tumora s klasičnim prognostičkim čimbenicima (veličinom tumora - T, metastazama u limfne čvorove – N, te stupnjem histološke

diferencijacije (anaplazije) – G), a jače je izražena za invazivni rub, zatim za centar, a manje za transformacijski rub tumora, bez obzira o kojem istraživanom proteinu se radi. Kod katepsina D ustanovljena je pozitivna korelacija za ekspresiju u tumorskim stanicama s veličinom tumora ( $p=0,003$ ) te negativna korelacija za ekspresiju u stromi s veličinom tumora ( $p=0,006$ ), infiltracijom limfnih čvorova ( $p=0,01$ ) te stupnjem diferencijacije (anaplazije) ( $p=0,02$ ). Utvrđena je povezanost prostorne heterogenosti s preživljenjem (Kaplan-Meier krivulje) kako za katepsin D ( $p=0,0001$ ) tako i za ciklin D1 ( $p=0,008$ ). Klasični prognostički parametri (T, N, G) pokazali su svoju prognostičku vrijednost. Kao jedini od svih istraživanih novih parametara katepsin D u stromi centra tumora pokazao se kao klasifikator u naprednom klasifikacijskom modelu RPART što upućuje na njegovu moguću prognostičku vrijednost. Za nm23 i nm23H-1 gen nisu dobiveni statistički relevantni pokazatelji.

## 8. SUMMARY

### **Intratumoral heterogeneity of cathepsin D, cyclin D1, nm23 and nm23H1 gene expression in laryngeal squamous cell carcinoma**

Intratumoral heterogeneity is defined as the parallel existence of diploid and aneuploid clones as well as different abnormal cell lines within a given tumor. This implies that different tumor parts express different behavior (e.g. propensity to invade or metastasize, resistance against chemo- or radiotherapy). One of the most important goals of different investigations is to predict the biological behavior of tumors. Current investigations mostly neglect intratumoral heterogeneity in general and completely ignore the possibility of regional intratumoral heterogeneity. The goals of my investigation, performed on a group of 170 patients with laryngeal cancer undergoing partial or complete laryngectomy were to define intratumoral heterogeneity of cyclin D1, cathepsin D and nm23 protein as well as nm23H1 gene in three different tumor regions (tumor center, invasive margin and transformation region), to establish potential prognostic significance of regional factors and to establish potential correlation between the investigated factors and classical prognostic factors (T, N, M, histological grade).

Taken together the results of this study give some intriguing answers to the above questions. It was clearly shown that the intratumoral heterogeneity is not a diffuse, random event, but that there is a clear areal distribution of immunoreactivity to cathepsin D and cyclin D1, with the invasive margin expressing the strongest immunoreactivity followed by the tumor center. There is positive correlation for expression of cathepsin D in tumor cells with T ( $p=0,003$ ), and negative correlation for stromal expression of cathepsin D with T ( $p=0,006$ ), N ( $p=0,01$ ) and histological grade ( $p=0,02$ ). Areal expression of cathepsin D and cyclin D1 showed prognostic significance on Kaplan-Meier curves (cathepsin D ( $p=0,001$ ) cyclin D1 ( $p=0,008$ )).

Using RPART statistics the expression of cathepsin D in tumor stromal cells of tumor center was demonstrated as being a classifier equal to standard prognostic parameters.

## 9. LITERATURA

1. Krmpotić - Nemanić J. Anatomija čovjeka. Zagreb: Medicinska naklada; 1993: str. 653-65.
2. Padovan I. Otorinolaringologija. Zagreb: Školska knjiga; 1991: str. 280-315.
3. Duančić V. Osnove embriologije čovjeka. Beograd Zagreb: Medicinska knjiga; 1985: str. 123-5.
4. Juqueira LC. Carneiro J. Kelley RO. Osnove histologije. Zagreb: Školska knjiga; 1995: str. 338-345.
5. Padovan I. Otorinolaringologija 3, kirurgija usne šupljine, ždrijela, grla i vrata. Zagreb: Školska knjiga; 1987: str. 287-91.
6. Robins KC. Osnove patologije. 2. izd. Zagreb: Školska knjiga; 1994: str. 435-6.
7. Cappelari JO. Histopathology and pathologic prognostic indicators of laryngeal cancer: Otolaryngol Clin North Am 1997, 30: 251-8.
8. UICC. Priručnik kliničke onkologije. Zagreb: Karitas; 1992: str. 159-73.
9. Barnes L. Surgical pathology of the head and neck. Marcel Dekker 1985, New York. str. 142-92.
10. Wynder EL, Mushinski MH, Spivak JC. Tobacco and alcohol consumption in relation to the development of multiple primary cancers. Cancer 1977; 40: 1872-8.
11. Krajina Z. Otorinolaringologija i cervikofacijalna kirurgija I. Zagreb: Školska knjiga; 1983: str. 419-35.
12. Rosai I. Ackermans surgical pathology. StLouis : Mosby – Year Book Inc.; 1996: str.327-8.
13. Aryan S. Cancer of the head and neck: Mosby Co; 1987: str. 396-401.

14. Batsakis JG. Tumor of the head and neck. Baltimor: Williams & Wilkins; 1979: str. 200-23.
15. Silverberg SG. Principles and practice of surgical pathology. Edinbrough, London, Melbourne and New York: Curchill Livingston; 1990: str. 627-47.
16. Kissane JM, Anderson WAD. Anderson's Pathology. izd. St. Louis: Mosby Co.; 1990: str. 1084-7.
17. Beahrs OH, Myers MH. Manual for staging of cancer, American Joint Committee on Cancer. 2. Izd. Philadelphia: J. B. Lippincot Co.; 1983: str. 38-9.
18. Glany HK. Advances in otorhinolaryngology. Basel: Kar Ger; 1984: str. 1-23.
19. Pastereli HE, Ozbilim G, Elpek O, Fisenk F, Balkan E. Nm23 and cathepsin D expression in laryngeal carcinoma. Adv Clin Path 2000; 4: 121-3.
20. Bayazit Y, Mumbuc S, Ucak R, Kanlikama M, Bakir K. Significance of Fas protein in squamous cell carcinoma of the larynx. Acta Otolaryngol 2000; 120: 557-61.
21. Goldsmith MM., Pillsbury HC. Pathologic and cytometric indicators of biologic behavior in laryngeal cancer. Laryngeal cancer. Silver C.E. izd. Thieme Medical Publisher, New York, str 27-32.
22. Jin C, Jin Y, Wennerberg J, Dictor M, Mertens F. Nonrandom pattern of cytogenetic abnormalities in squamous cell carcinoma of the larynx. Geneses Chromosomes Cancer 2000; 28: 66-7.
23. Pignatato L, Cappacio P, Pruneri G i sur. The predictive value of p53, MDM-2, cyclin D1 and Ki67 in the progression from low grade dysplasia towards carcinoma of the larynx. J Laryngol Otol 1998; 112: 455-9.
24. Sun PC, el-Mofty SK, Haughey BH, Scholnik SB. Allelic loss in squamous cell carcinomas of the larynx: discordance between primary and metastatic tumors. Genes Chrom cancer 1995; 14: 145-8.



25. Becciolini A, Balzi M, Barbarisi M, Faraoni P, Biggeri A, Potten CS. 3H-thymidine labelling index (TLI) as a marker of tumor growth heterogeneity: evaluation in human solid carcinomas. *Cell Prolif* 1997; 30: 117-26.
26. Cappacio P, Pruneri G, Carboni N i sur. Cyclin D1 protein expression is related to clinical progression in laryngeal squamous cell carcinoma. *J Laryngol Otolog* 1997; 111:622-6.
27. Bartkova J, Lukas J, Muller H, Lutzhoft D, Strauss M, Bartek J. Cyclin D1 expression and function in human breast cancer. *Internat J Cancer* 1994; 57: 353-61.
28. Carey FA, Lamb D, Bird CC. Intratumoral heterogeneity of DNA content in lung cancer *Cancer* 1990; 65: 2266-9.
29. Kallionieni OP. Comparison of fresh and paraffin – embedded tissue as starting material for DNA flow cytometry and evaluation of intratumoral heterogeneity. *Cytometry* 1988; 9:164-9.
30. Ljungberg B, Stenling R, Roos G. DNA content in renal cell carcinoma with reference of tumor heterogeneity. *Cancer* 1985; 56: 503-8.
31. Jacob R, Welkoborsky HJ, Mann WJ, Höfken F, Dienes HP, Freije JE. Heterogeneity of squamous cell carcinomas of the head and neck – analysis of tumor biologic factors and proliferation rates. 1996; 106: 1170-5.
32. Foulds L. The experimental study of tumor progression: a review. *Cancer Res.* 1954; 14: 327-39.
33. Foulds L. The natural history of cancer. *J Chronic Dis.* 1958; 8: 2-37.
34. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science.* 1976;194: 23-8.
35. Nowell PC. Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res.* 1986; 46: 2203-7.
36. Klein G, Klein E. Evolution of tumours and the impact of molecular oncology. *Nature.* 1985; 315: 190-5.

37. Pathak S. Cytogenetic abnormalities in cancer: with special emphasis on tumor heterogeneity. *Cancer Metastasis Rev.* 1990; 8: 299-318.
38. Fisher MS, Cifone MA. Enhanced metastatic potential of murine fibrosarcomas treated in vitro with ultraviolet radiation. *Cancer Res.* 1981; 41: 3018-23.
39. Frost P, Kerbel RS, Hunt B, Man S, Pathak S. Selection of metastatic variants with identifiable karyotypic changes from a nonmetastatic murine tumor after treatment with 2'-deoxy-5-azacytidine or hydroxyurea: implications for the mechanisms of tumor progression. *Cancer Res.* 1987; 47: 2690-5.
40. Cappiello JNP, Antonelli AR, Facchetti F, Cadei M, Cor na Cchiari A, Grigolato PG. DNA index, cellular proliferative activity and nucleolar organizer regions in cancers of larynx. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1995; 252: 353-8.
41. Coon JS, Landay AL, Weinstein RS. Advances in flow cytometry for diagnostic pathology. *Lab Invest* 1987; 57: 451-79.
42. Nishimura Y, Kawabata T, Yano S, Kato T. Intracellular processing and secretion of lysosomal cathepsins. *Acta Histochem Cytochem* 1990; 23: 53-64.
43. Leto G, Gebbia N, Rausa L, Tumminello FM. Cathepsin D in the malignant progression of neoplastic diseases. *Anticancer Research* 1992; 12: 235-40.
44. Spyrtos F, Mudelonde T, Brouillet JP, Brunet M, Defrenne A. Cathepsin D: an independent prognostic factor for metastasis of breast cancer. *Lancet* 1989; 11: 1115-8.
45. Briozzo P, Morisset M, Capony F, Rougeot C, Rochefort H. In vitro degradation of extracellular matrix with Mr 52,000 cathepsin D secreted by breast cancer cells. *Cancer Research* 1988; 48: 3688-91.
46. Rochefort H, Augerau P, Briozzo P i sur. Structure, function regulation and clinical significance of the 52K pro cathepsin D secreted by breast cancer. *Biochimie* 1988; 943-9.

47. Toitou I, Cavallilles V, Garcia M, Defrenne A, Rochefort H. Differential regulation of cathepsin D by sex steroids in mammary cancer and uterine cells. *Mol Cell Endocrinol* 1989; 66: 231-8.
48. Ingle NJ. Assessing the risk of recurrence in breast cancer. *NEJM* 1990; 322: 329-31.
49. Thorpe SM, Rochefort H, Garcia M i sur. Association between high concentrations of Mr 52,000 cathepsin D and poor prognosis in primary human breast cancer. *Cancer Res* 1989; 49: 6008-14.
50. Tumminello FM, Gebbia N, Pizzolanti G, Russo A, Bazan V, Leto G. Cathepsin D content in colorectal cancer. *Oncology* 1996; 52: 237-42.
51. Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes & Dev.* 1993; 7: 812-21.
52. Jares P, Fernandez PL, Campo E i sur. PRAD-1/cyclin D1 gene amplification correlates with messenger RNA overexpression and tumor progression in human laryngeal carcinomas. *Cancer res.* 1994; 54: 4813-7.
53. Uhlman DL, Adams G, Knapp D, Aeppli DM, Niehans G. Immunohistochemical staining for markers of future neoplastic progression in the larynx. *Cancer res* 1996; 56: 2199-205.
54. Volavšek M, Bračko M, Gale N. Distribution and prognostic significance of cell cycle proteins in squamous cell carcinoma of the larynx, hypopharynx and adjacent epithelial hyperplastic lesions. *J Laryngol Otol*, 2003; 117: 286-93.
55. Kristensen GB, Holm R, Abeler VM, Trope CG. Evaluation of the prognostic significance of nm23/NDP kinase protein expression in cervical carcinoma: an immunohistochemical study. *Gynecol Oncol* 1996; 61: 378-83.
56. Zhang Y, Jiang W, Chen CJ i sur. Amplification and overexpression of cyclin D1 in human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 196: 1010-6.

57. Wang LD, Shi ST, Zhou Q i sur. Changes in p53 and cyclin D1 protein levels and cell proliferation in different stages in human esophageal and gastric – cardia carcinogenesis 1994; 59: 514-9.
58. Namazie A, Alavi S, Olopade OI i sur. Cyclin D1 amplification and p16(MTS1/CDK4I) deletion correlate with poor prognosis in head and neck tumors. *Laryngoscope*. 2002; 112: 472-81.
59. Almadori G, Galli J, Cadoni G, Bussu F, Maurizi M. Human papillomavirus infection and cyclin D1 gene amplification in laryngeal squamous cell carcinoma: biologic function and clinical significance. *Head Neck* 2002; 24: 597-604.
60. Vielba R, Bilbao J, Ispizua A i sur. p53 and cyclin D1 as prognostic factors in squamous cell carcinoma of the larynx. *Laryngoscope*. 2003; 113: 167-72.
61. Cardesa A, Nadal A, Jares P i sur. Hyperplastic lesions of the larynx. Experience of zhe Barcelona group. *Acta Otolaryngol Suppl* 1997; 527: 43-6.
62. Yoo SS, Carter D, Turner BC, Sasaki i sur. Prognostic significance of cyclin D1 protein levels in early-stage larynx cancer treated with primary radiation. *Int J Cancer* 2000; 90: 22-8.
63. Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L i sur. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J Nat Cancer Inst* 1988; 89:200-4.
64. Leone A, Flatow U, King CR i sur. Reduced tumor incidence, metastatic potential and cytokine responsiveness of nm23-transfected melanoma cells. *Cell* 1991; 65: 25-35.
65. Leone A, Flatow U, Van Houtte K, Steeg PS. Transfection of human nm23 –H1 into the human MDA-MB-435 breast carcinoma cell line: Effects on tumor metastatic potential, colonisation and enzymatic activity. *Oncogene* 1993; 8: 2325-33.

66. Cohn KH, Wang F, Desoto-Lapaix F i sur. Association of nm23-H1 allelic deletions with distant metastasis in colorectal carcinoma. *Lancet* 1991; 338: 722-4.
67. Kapitanović S, Čačev T, Berković M i sur. nm23-H1 expression and loss of heterozygosity in colon adenocarcinoma. *J Clin Pathol* 2004; 57: 1312-8.68.
68. Mao H, Liu H, Fu H, Fang Z, Abrams J, Worsham MJ. Loss of nm23 expression predicts distal metastasis and poorer survival for breast cancer. *Int J Oncol* 2001; 18: 587-91.
69. Nesi G, Palli D, Pernice LM i sur. Expression of nm23 gene in gastric cancer is associated with a poor 5-year survival. *Anticancer Res* 2001; 21: 3643-9.
70. Ilijaš M, Kapitanović S, Šarčević B i sur. Gene nm23-H1 – possible prognostic factor for invasive squamous cell carcinoma of cervix uteri. *J Tumor Marker Oncol* 1998; 13: 61-8.
71. Nakayama T, Ohtsuru A, Nakata K i sur. Expression in human hepatocellular carcinoma of nucleoside diphosphate kinase, a homologue of the nm23 gene product. *J Nat Cancer Inst* 1992; 84:1349-54.
72. McDonald JS, Gartside PS, Pavelić Lj, Gluckman JL, Pavelić ZP. Nm23-H1 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Path Oncol Res* 1996; 2: 34-6.
73. Pavelić K, Kapitanović S, Radošević S i sur. Increased activity of nm23-H1 gene in squamous cell carcinoma of the head and neck is associated with advanced disease and poor prognosis. *J Mol Med* 2000; 78: 111-8.
74. Engel M, Theisinger B, Seib T i sur. High levels of nm23-H1 and nm23-H2 mRNA in human squamous- cell lung carcinoma are associated with poor differentiation and advanced tumor stages. *Int J Cancer* 1993; 55: 375-9.

75. Leone A, Seeger RC, Hong CM i sur. Evidence for nm23 overexpression. DNA amplification and mutation in aggressive childhood neuroblastoma. *Oncogene* 1993; 8: 855-65.
76. Hamby CV, Mendola CE, Potla L, Stafford G, Backer JM. Differential expression and mutation of NME genes in autologous cultured human melanoma cells with different metastatic potentials. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 211: 578-85.
77. Herak Bosnar M, Pavelić K, Križanac Š, Slobodnjak Z, Pavelić J, Squamous cell lung carcinomas: the role of nm 23-H1 gene. *J Mol Med* 1997; 75: 609-13.
78. Herak Bosnar M, Pavelić K, Hrašćan R i sur. Loss of heterozygosity of the nm23-H1 gene in human renal cell carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1997; 123: 485-8.
79. Mandai M, Konishi I, Komatsu T i sur. Mutation of the nm23 gene, loss of heterozygosity at the nm23 locus and K-ras mutation in ovarian carcinoma: correlation with tumour progression and nm23 gene expression. *Br J Cancer.* 1995; 72: 691-5.
80. Therneau TM, Grambsch PM. *Modeling Survival data: Extending the Cox Model.* Springer, New York, 2000, str. 7-38.
81. Therneau TM, Atkinson EJ. *An Introduction to Recursive Partitioning: Using the RPART Routines.* Mayo Foundation, Stanford, 1997.
82. Strojan P, Budihna M, Šmid L, Svetic B, Vrhovec I, Škrk J. Cathepsin B and L and sferin A and B levels as serum tumor markers in squamous cell of the head and neck. *Neoplasma* 2001; 48: 66-71.
83. Lazaris AC, Lendari I, Kavantzias N, Kandiloros D, Adamopoulos G, Davaris P. Correlation of tumor markers p53, bcl-2 and cathepsin D with clinicopathological features and disease-free survival in laryngeal squamous cell carcinoma. *Pathol Int* 2000; 50: 717-24.

84. Seiwerth S, Štambuk N, Konjevoda P i sur. Immunohistochemical analysis and prognostic value of cathepsin D determination laryngeal squamous cell carcinoma. *J Chem Inf Comput Sci* 2000; 40: 545-9.
85. Leto G, Tumminello FM, Gebbia N i sur. Differential expression levels of urokinase-type plasminogen activator and cathepsin D in locally advanced laryngeal squamous cell carcinoma. *Int J Biol Markers* 2001; 16: 245-9.
86. Strojjan P. Cathepsin and their inhibitors as tumor markers in head and neck cancer. *Radiol Oncol* 2004; 38: 93-100.
87. Budihna M, Strojjan P, Šmid L i sur. Prognostic value of cathepsins B, H, L, D and their endogenous inhibitors stefins A and B in head and neck carcinoma. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1996; 377: 385-90.
88. Maurizi M, Almadori G, Cadoni G i sur. Cathepsin D concentration in primary laryngeal cancer: correlation with clinico-pathological parameters, EGFR status and prognosis. *Int J Cancer*. 1996; 69: 105-9.
89. Šmid L, Strojjan P, Budihna M. Prognostic value of cathepsins B, D and stefins A and B in laryngeal carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 1997; 254:150-3.
90. Strojjan P, Budihna M, Šmid L, Vrhovec I, Škrk J. Urokinase-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor type 1 and cathepsin D: analysis of their prognostic significance in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anticancer Res*. 2000; 20: 3975-81.
91. Kawasaki G, Kato Y, Mizuno A. Cathepsin expression in oral squamous cell carcinoma: relationship with clinicopathologic factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002; Apr;93: 446-54.

92. Gandour-Edwards R, Trock B, Donald PJ. Predictive value of cathepsin-D for cervical lymph node metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 1999; 21: 718-22.
93. Hussein MR, Cullen K. Molecular biomarkers in HNSCC: prognostic and therapeutic implications. *Expert Rev. Anticancer Ther* 2001; 1: 116-24.
94. Faust JB, Meeker TC. Amplification and expression of the bcl-1 gene in human solid tumor cell lines. *Cancer res* 1992; 52: 2460-3.
95. Lammie GA, Fantl V, Smith R i sur. D11S287 a putative oncogene on chromosome 11q13, is amplified and expressed in squamous cell and mammary carcinomas and linked to BCL-1 Oncogene 1991;6: 439-44.
96. Schurring E, Verhoeven E, Mooi WJ, Michaelides RJAM. Identification and cloning of two overexpressed genes U21B31/PRAD1 and EMS1, within the amplified chromosome 11q13 region in human carcinomas. *Oncogene* 1992; 7:355-61.
97. Dong Y, Sui L, Sugimoto K, Tai Y, Tokuda M. Cyclin D1-CDK4 complex, a possible critical factor for cell proliferation and prognosis in laryngeal squamous cell carcinomas. *Int J Cancer*. 2001; 95: 209-15.
98. Kuo MY, Lin CY, Hahn LJ, Cheng SJ, Chiang CP. Expression of cyclin D1 is correlated with poor prognosis in patients with areca quid chewing related oral squamous cell carcinoma in Taiwan *J Oral Pathol Med* 1999; 28: 165-9.
99. Capaccio P, Pruneri G, Carboni N i sur. Cyclin D1 expression is predictive of occult metastasis in head and neck cancer patients with clinically negative lymph node. *Head Neck* 2000; 3: 234-40.
100. Royds JA, Stephenson TJ, Rees RC, Shorthouse AJ, Silcocks PB. Nm23 protein expression in ductal in situ and invasive human breast carcinoma. *J Nat Cancer Inst* 1993; 85: 727-31.



## 10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Zadru, 26. lipnja 1969. godine gdje sam završila osnovnu i srednju školu. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 1987. godine, a diplomirala u srpnju 1993. godine. Jednogodišnji pripravnički staž sam obavila u Klinici za dječje bolesti u Klaićevoj, 1994/95. godine. Stručni ispit za doktore medicine položila sam u veljači 1996. godine.

U prosincu 1996. godine započela sam specijalizaciju na Zavodu za patologiju, KBC-a, a specijalistički ispit položila sam u studenom 2000. godine.

Poslijediplomski studij iz patologije na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 1997. godine, a magistrirala samu lipnju 2000. godine s temom: "AgNOR i sadržaj DNK u stanicama planocelularnog karcinoma grkljana".

Od svibnja 2000. godine sam asistent Medicinskog fakulteta u dopunskom radnom odnosu.

Pohađala sam tečaj trajnog usavršavanja: «Postgraduate course in theoretical and diagnostic histopathology» prvi i drugi dio, u Alexandropoulisu, u Grčkoj, 1998 i 1999 godine.

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

Udata sam i majka troje djece.