

Prognostički faktori karcinoma grkljana

Davorin Đanić

Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Stručni rad

UDK 616.22-006.6

Prispjelo: 25. kolovoza 1999.

U 63 bolesnika, s planocelularnim karcinomom grkljana, retrospektivno je istraživana utjecaj prognostičkih pokazatelja: lokalizacije, veličine primarnog tumora, prisutnost ili odsutnost metastaza vrata, stadija bolesti i histološki stupanj diferencijacije. Protočna citometrijska analiza staničnog ciklusa, DNA ploidnost i proliferativne aktivnosti, kao neposrednih prognostičkih pokazatelja tumorske agresivnosti izvedena je na parafinskim blokovima 36 bolesnika. Kao značajni pojedinačni nepovoljni prognostički pokazatelji ukupnog preživljenja pokazali su se: supraglotična lokalizacija tumora ($p=0,0008$), veći tumor ($p=0,0064$), prisutne metastaze vrata ($p=0,00009$), viši klinički stadij bolesti ($p=0,0091$), DNA aneuploidnost ($p=0,0091$), veća ukupna proliferativna aktivnost ($p=0,0001$), veća ukupna proliferativna aktivnost diploidnih tumora ($p=0,0017$), dok se histološki stupanj diferencijacije tumora nije pokazao vjerodostojnim prognostičkim pokazateljem ($p=0,988$). U multivarijantnoj analizi jedino se veća ukupna proliferativna aktivnost tumorskih stanica pokazala vjerodostojno nepovoljnim prognostičkim pokazateljem ($p=0,013$). Sadržaj stanične DNA (ploidnosti, ukupne proliferativne aktivnosti i ukupne proliferativne aktivnosti tumora diploidnog statusa) signifikantno je povezan s primarnom lokalizacijom i veličinom tumora, prisutnošću lokalnih metastaza vrata i stadijem bolesti.

Ključne riječi: karcinom grkljana - prognoza

Bolesnike s karcinomom grkljana često je moguće podijeliti u podskupine prema bitnim značajkama tumora i tako postići vjerojatnost da će uspješnost liječenja unutar iste podskupine biti približno jednaka, ali će se značajno razlikovati među podskupinama (1). Dva su osobito značajna pitanja u biti svih dosadašnjih nastojanja u sagledavanju prognostičkih čimbenika u bolesnika s karcinomom grkljana: prvo, kada i u kojim uvjetima treba poduzeti modificirani kirurški zahvat i štedjeti funkciju grkljana, te olakšati postoperacijski tijek, te koji je to faktor koji određuje radikalnost zahvata? Ako radikalni postupak ne pridonosi izliječenju, treba odabrati drugi koji daje najpovoljniju prognozu zaliječenja, poštedejući bolesnika. Drugo pitanje, ne manje važno, je smišljena uporaba dopunskih postupaka liječenja. Kada budemo sposobni sagledati prognostičke čimbenike u redosljedu koji njihova prisutnost u bolesnika pridonosi ukupnom riziku oboljelog, moći ćemo planirati i obavljati kontrolu kliničkih istraživanja na temelju ne samo temeljnih nego i dopunskih postupaka liječenja.

Iako je protočna citometrija u određivanju sadržaja stanične DNA u uporabi nekoliko godina, u literaturi o karcinomu grkljana nema jedinstvenog stava o uporabi ove biološke značajke tumora u određivanju terapijskog protokola (2,4,12). Kombinacijom DNA ploidije i proliferativne aktivnosti tumora kao poznatih bioloških značajki tumorske agresivnosti i znanih kliničkih (TNM) i histoloških značajki, moguće je odrediti modifikacije dosadašnjih standardnih terapija ili uvesti alternativne terapije. Svrha rada je pokušaj određivanja skupine bolesnika s povoljnom prognozom, a na temelju DNA sadržaja i ostalih kliničko-patoloških značajki. Kako se radi o bolesnicima starije životne dobi, sa često popratnim bolestima, takva klasifikacija bi omogućila pošteno liječenje.

MATERIJAL I METODE

U istraživanje su bila uključena 63 bolesnika s planocelularnim karcinomom grkljana. Za svakog ispitanika vođena je sustavna

dokumentacija o dobi, spolu i kliničkom statusu bolesti (TNM klasifikacija tumora American Joint Committee on Cancer, 1988. godine). Svi ispitanici bili su muškarci. Srednja dob iznosila je $59 \pm 10,12$ godina; najmlađi bolesnik imao je 35, a najstariji 89 godina.

Svi bolesnici su operirani, a dijagnoza patohistološki potvrđena. U istraživanje nisu bili uključeni bolesnici kod kojih je bio recidiv tumora nakon ranijeg kirurškog liječenja, kao ni bolesnici koji su ranije primili radioterapiju ili kemoterapiju. Lokalne metastaze u limfne čvorove vrata potvrđene su patohistološki nakon elektivne ili radikalne disekcije vrata.

Tumorski materijal fiksiran je u 10% formalinu, uklopljen u parafinske kocke i obojen standardnom Hemalaun Eosin metodom. Histopatološke karakteristike potvrdila su dva patologa i odredili histološke stupnjeve diferencijacije planocelularnog karcinoma po World Health Organisation, bez prethodnih spoznaja o kliničkim podacima bolesnika i krajnjem ishodu liječenja.

Kada je započeto istraživanje, bila je jasno definirana grupa bolesnika, klasične morfološke histološke metode, analiza staničnog ciklusa protočnim citometrom i cilj istraživanja. Tijekom istraživanja, dio tumorskog materijala u parafinskim kockama, koja je retrospektivno analizirana u protočnom citometru, pokazala se nedostatnom i nekvalitetnom, tako da je kvalitetno obrađeno tumorsko tkivo kod 36 bolesnika.

Tumorsko tkivo planocelularnog karcinoma grkljana nakon biopsije uklopljeno je u parafin i naknadno obrađeno prema standardnoj metodi po David Hedleyu i Vindelovu za analizu staničnog ciklusa (9,18). Prije rezanja odsječka, svaki uzorak tumora je pregledao patolog kako bi utvrdio nazočnost tumorskog tkiva, a za analizu je uzet najagresivniji dio s periferije tumora. Iz parafinskih kocki izrezana su 2-3 odsječka čistog tumorskog tkiva na mikrotomu, debljine 30-50 nm.

Odsječci tumorskog tkiva prvo su se deparafinizirali u 4 ml ksilena, dva puta po deset minuta na sobnoj temperaturi. Ksilena se ukloni vakuum-crpkom, a zatim se učini rehidracija, postup-

no u 4 ml alkohola (100%, 95%, 75%) 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga tkivo se ispere dva puta u destiliranoj vodi. Slijedi enzimska reakcija s 0,5 % otopinom pepsina (pH01,5) u fiziološkoj otopini 30 minuta na 37°C u vodenoj kupelji uz stalno miješanje. Uzorak se centrifugira na 800 G pet minuta, vakuum-crpkom odstrani nadtalog, doda se 2 mL medija (RPMI) i filtrira kroz najlonsku mrežicu (veličina pora 35 nm). Ponovo se uzorak centrifugira i na talog doda 1 mL tripsina u citratnom puferu, 10 minuta u vodenoj kupelji uz miješanje.

Za bojenje izvađenih jezgara koristi se Vindelova procedura s propidijevim jodidom (18). Talog dobivenih jezgara tumorskih stanica ($2 \times 10^6/L$) obradi se 30 minuta na 37°C s 200 nL (1 mg/mL) riñobukleaze S da bi se spriječilo stvaranje kompleks boje s RNA, a zatim se jezgre boje pomoću 100 nL propidijeva jodida (50 g/mL; 5 mh PJ u 0,1% Na-citratu) najmanje 30 minuta na sobnoj temperaturi u tami.

MJERENJE NA PROTOČNOM CITOMETRU

Analize sadržaja DNA i faza staničnog ciklusa učinjena je u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb, na protočnom citometru FACScan (fluorescein Activated Cell

Sorter), firme Becton Dickinson, San Jose, CA, SAD, uz uporabu računalskih programa - Cellquest™ (Becton Dickinson Immunochemistry Systems, San Jose, CA, SAD) i ModFit LT™ (Verity Software Louse, Inc., SAD, 1995) na osobnom računalu Macintosh Quadra 650 (17,19). Program Cellquest™ služi za mjerenje uzoraka i pohranjivanje izmjerenih podataka, a program ModFit LT™ za analizu pohranjenih podataka. Za svaki uzorak tumorskog tkiva kroz mjerni sustav protočnog citometra propušteno je 10.000 jezgara.

Jednparametrijski histogrami (intenzitet fluorescencije x broj stanica / jezgara) analizirani su Programom ModFit LT™.

Histogram se tumači kao diploidan ako postoji jedan sitemtričan G0-G1 vršak, dok nazočnost više od jednog vrška pokazuje da se radi o aneuploidiji. Kao biološki standard upotrijebljeno je normalno tkivo grkljana.

Proliferacijska aktivnost tumorskih stanica izražena je kao ukupna S-faza. Proliferacijska aktivnost diploidnih tumora istovjetna je izmjerenoj vrijednosti udjela stanica u S-fazi staničnog ciklusa diploidnih tumora. Kod aneuploidnih tumora posebno se dobije udio diploidnih i udio aneuploidnih stanica u S-fazi staničnog ciklusa, te ukupna proliferacijska aktivnost izražena kao udio svih izmjerenih stanica u S-fazi. Srednja vrijednost koeficijenta

TABLICA 1.
 Vjerojatnost ukupnog preživljenja u bolesnika s planocelularnim karcinomom grkljana
TABLE 1.
 Prognosis of overall survival in patients with planocellular laryngeal carcinoma

Bolesnici Patients	N	Ukupno preživljenje (%) Overall survival (%)	
		Dvogodišnje 2 - year	Petogodišnje 5 - year
Ukupno Total	63	68,29±5,9	63,41±6,1
DNA ploidiya DNA ploidy	36		
Diploidni Diploid		88,89±6,1	81,31±7,5
Aneuploidni Aneuploid		44,44±16,5	44,44±16,7
Ukupna proliferativna aktivnost Overall proliferative activity	36		
< 16		89,29±5,9	85,71±6,6
≥ 16		37,50±17,1	25,0±15,3

TABLICA 2.

Kliničko patološke značajke i vrijednosti sadržaja stanične DNA u bolesnika s plancelularnim karcinomom grkljana

Pokazatelj	Značajke	No (%)
Lokalizacija	supraglotis	38 (60,3)
	glotis	25 (39,7)
Veličina tumora	T1-2	26 (41,2)
	T3-4	37 (58,8)
Lokalne metastaze	N+	15 (23,8)
	N-	48 (76,2)
Klinički stadij bolesti	I	6 (9,6)
	II	17 (27,0)
	III	21 (33,3)
	IV	18 (28,6)
Histološki stupanj diferencijacije	G1	35 (55,6)
	G2	24 (38,1)
	G3	4 (6,3)
DNA ploidnost	diploidni	27 (75,0)
	aneuploidni	9 (25,0)
Ukupna proliferativna aktivnost tumorskih stanica	< 16	28 (77,8)
	≥ 16	8 (22,2)
Proliferativna aktivnost tumora diploidnog statusa	< 13	22 (81,5)
	≥ 13	5 (18,5)

varijacije (CV) iznosila je $5,83 \pm 1,685\%$ (raspon od 1,160 do 9,690, median 5,670).

ANALIZA PREŽIVLJENJA BOLESNIKA

Analiza preživljenja temelji se na podacima o praćenju bolesnika od dana postavljanja dijagnoze do smrti, od osnovne bolesti (nepovoljan događaj) ili prestanka istraživanja (povoljan događaj, tzv. cenzus ispitanika). Vjerojatnost preživljenja izračunata je metodom životnih tablica i prikazana grafički Kaplan-Maierovim krivuljama. Statistički pokazatelji analize preživljenja temelje se na log-normalnoj raspodjeli podataka. Istodobni utjecaj svih pokazatelja na prognozu preživljenja analiziran je metodom multivarijantne regresije na nepotpunim podacima, tj. Coxovim regresijskim testom.

Za uporedbu među ispitivanim skupinama upotrijebljen je Mann-Whitney test. Prelomne vrijednosti (cut off) za ukupnu S-fazu, 16, te S-fazu za diploidne tumore, 13, koje najbolje razgraničavaju vjerojatnost preživljenja, nađene su kao vrijednost najvećeg χ^2 testa, proporcionalnom regresijskom metodom. Zaključivanje o statističkim hipotezama u ovome je radu provedeno uz razinu od p manje od 0.05 kod svih primijenjenih testova (13).

Za korelaciju je korišten Spermanov koeficijent korelacije.

Statistička obrada podataka izvršena je uporabom programa SPSS 6.1 za Windows, na PC-podudarnom računalu.

REZULTATI

Osnovne kliničke i histološke značajke ispitivane su kod 63 bolesnika s karcinomom grkljana. Dvogodišnje preživljenje bilo je $68,29 \pm 5,9\%$, a petogodišnje $63,41 \pm 6,1\%$ (tablica 1).

Kliničko patološke značajke i vrijednosti sadržaja stanične DNA prikazane su na tablici 2. DNA ploidnost analizirana je u 36 bolesnika, od kojih je 27 (75%) imalo diploidni status tumora, a 9 (25%) aneuploidni. Dvogodišnje preživljenje skupine bolesnika diploidnog statusa bilo je $88,89 \pm 6,1\%$, a petogodišnje $81,31 \pm 7,5\%$. Srednja vrijednost ukupne proliferativne aktivnosti tumorskih stanica bila je $11,982 \pm 8,0\%$ u rasponu od 2,330 do 32,78; median 9,945.

Proliferativna aktivnost tumorskih stanica bila je u 28 bolesnika manja od 16 (cut off), a u 8 jednaka ili veća od 16%. U 28 bolesnika ukupne proliferativne aktivnosti manje od 16%, dvogodišnje preživljenje bilo je $89,29 \pm 5,9\%$, a petogodišnje $85,71 \pm 6,6\%$. U 8 bolesnika ukupne proliferativne aktivnosti veće od 16% dvogodišnje preživljenje bilo je $37,50 \pm 17,1\%$, a petogodišnje $25,0 \pm 15,3\%$.

TABLE 2.
 Clinical pathological features and the values of the cell DNA content in patients with planocellular laryngeal carcinoma

Indicator	Features	No (%)
Site	supraglottis	38 (60,3)
	glottis	25 (39,7)
Tumour site	T1-2	26 (41,2)
	T3-4	37 (58,8)
Local metastases	N+	15 (23,8)
	N-	48 (76,2)
Clinical stage of the disease	I	6 (9,6)
	II	17 (27,0)
	III	21 (33,3)
	IV	18 (28,6)
Histological degree of differentiation	G1	35 (55,6)
	G2	24 (38,1)
	G3	4 (6,3)
DNA ploidy	diploid	27 (75,0)
	aneuploid	9 (25,0)
Overall proliferative activity of tumour cells	< 16	28 (77,8)
	≥ 16	8 (22,2)
Proliferative activity of diploid tumours	< 13	22 (81,5)
	≥ 13	5 (18,5)

TABLICA 3. Utjecaj kliničkih, patohistoloških značajki i profila staničnog ciklusa na ukupno preživljenje bolesnika s planocelularnim karcinomom grkljana

TABLE 3. The influence of clinical, pathohistological features and cell cycle profile on the overall survival of patients with planocellular laryngeal carcinoma

POKAZATELJ INDICATOR	ANALIZA ANALYSIS	
	UNIVARIJANTA UNIVARIATE	MULTIVARIJANTA MULTIVARIATE
	p	p
Lokalizacija Site	0.0008	0.277
Veličina tumora (T1 - T4) Tumour size	0.0064	0.227
Lokalne metastaze Local metastases	0.00009	0.177
Klinički stadij (I - IV) Clinical stage	0.0030	0.397
Histološki stupanj diferencijacije Histological degree of differentiation	0.0988	0.976
DNA ploidnost DNA ploidy	0.0091	0.253
Ukupna proliferativna aktivnost Overall proliferative activity	0.0001	0.013

TABLICA 4.

Združeni utjecaj DNA ploidijske, ukupne proliferativne aktivnosti i proliferativne aktivnosti tumora diploidnog statusa i kliničkih značajki tumora na ukupno preživljenje bolesnika s planocelularnim karcinomom grkljana

	DNA ploidijska (DIPLOIDNI / ANEUPLOIDNI)	Ukupna proliferativna aktivnost < 16 / ≥ 16	Proliferativna aktivnost diploidnih tumora < 13 / ≥ 13
	p	p	p
Lokalizacija:			
SUPRAGLOTIS	0.0334	0.0159	0.1416
GLOTIS	0.0542	0.0037	0.054
VELIČINA TUMORA			
T1-2	0.0062	0.0359	0.0001
T3-4	0.2958	0.0065	0.1826
METASTAZE VRATA			
N-	0.0492	0.0091	0.0032
N+	0.0177	0.0629	0.3173
STADIJ BOLESTI			
I*	-	-	-
II	0.2961	0.0515	0.047
III	0.2690	0.0621	0.0833
IV	0.0082	0.1831	0.5924

* U prvom stadiju bolesti nije bilo statističke razlike u vjerojatnosti preživljenja, jer su svi tumori bili diploidnog statusa, proliferativne aktivnosti manje od 13%.

Proliferativna aktivnost diploidnih tumora bila je manja od 13 (cut off) u 22 i jednaka ili veća od 13 u 5 bolesnika.

Rezultati univarijantne i multivarijantne analize utjecaja kliničkih, patohistoloških značajki i profila staničnog ciklusa na ukupno preživljenje prikazani su na tablici 3. Prema univarijantnoj analizi, kao značajni pojedinačni pokazatelji ukupnog preživljenja, pokazali su se lokalizacija ($p=0,008$), veličina tumora ($p=0,0064$), prisutnost lokalnih metastaza vrata ($p=0,0009$), klinički stadij bolesti ($p=0,003$), DNA ploidijska ($p=0,0091$) i ukupna proliferativna aktivnost tumorskih stanica ($p=0,0001$). Histološki stupanj diferencijacije tumora nije se pokazao značajnijim prognostičkim pokazateljem ukupnog preživljenja ($p=0,988$). Prema multivarijantnoj analizi kao značajan pokazatelj ukupnog preživljenja jedino se pokazala veća ukupna S-faza ($p=0,013$).

KORELACIJA PROGNOŠTIČKIH FAKTORA

Združeni utjecaj DNA ploidijske, ukupne proliferativne aktivnosti, ukupne proliferativne aktivnosti tumora diploidnog statusa i kliničkih karakteristika tumora na ukupno preživljenje bolesnika s planocelularnim karcinomom grkljana, prikazani su na tablici 4. Bolesnici supraglotične lokalizacije tumora aneuploidnog statusa, ukupne S-faze veće od 16%, imali su značajno lošiju prog-

nozu bolesti. Proliferativna aktivnost diploidnih tumora nije imala značajan utjecaj na ukupno preživljenje za razliku od glotične lokalizacije tumora. Ukupna S-faza i proliferativna aktivnost diploidnih tumora pokazali su se značajnim prognostičkim pokazateljem kod veličine tumora T1-2, kao i DNA ploidijska, dok je kod veličine tumora T3-4 jedino ukupna S-faza imala značajnu povezanost s ukupnim preživljenjem. Značajno lošiju prognozu bolesti imali su bolesnici bez metastaza vrata i veće ukupne S-faze od 16% i veće proliferativne aktivnosti diploidnih tumora od 13%, bez obzira na ploidijski status tumora. U bolesnika s prisutnim metastazama vrata, značajna povezanost uz prognozu bolesti nađena je kod aneuploidnih tumora i ukupne S-faze veće od 16%, dok ta povezanost nije bila značajna za tumore diploidnog statusa. Značajno nepovoljniji utjecaj na ishod bolesti imala je DNA aneuploidijska tumora kod bolesnika IV stadija bolesti i proliferativna aktivnost tumorskih stanica diploidnog statusa većeg od 13% u II. stadiju bolesti.

RASPRAVA

DNA ploidijska tumorskih stanica karcinoma grkljana u ovom radu se pokazala kao značajan nezavisni prognostički pokazatelj ukupnog preživljenja u univarijantnoj analizi, ali ne i multivarijantnoj. Skupina bolesnika s karcinomom grkljana, iploidnog

TABLE 4.

Combined influence of DNA ploidy, overall proliferative activity and overall proliferative activity of diploid tumours and clinical tumour features on the overall survival of patients with planocellular

	DNA ploidy (Diploid / Aneuploid)	Total proliferative activity < 16 / ≥ 16	Proliferative activity of diploid tumours < 13 / ≥ 13
	P	P	P
Site:			
Supraglottis	0.0334	0.0159	0.1416
Glottis	0.0542	0.0037	0.054
Tumour size			
T1-2	0.0062	0.0359	0.0001
T3-4	0.2958	0.0065	0.1826
Neck metastases			
N-	0.0492	0.0091	0.0032
N+	0.0177	0.0629	0.3173
Clinical stage of the disease			
I*	-	-	-
II	0.2961	0.0515	0.047
III	0.2690	0.0621	0.0833
IV	0.0082	0.1831	0.5924

* In the first stage of the disease there was no significant difference in survival prognosis, because all tumours were of diploid status and of less than 13% proliferative activity.

statusa tumora, imala je statistički značajno veću vjerojatnost dužeg življenja nego skupina bolesnika aneuploidnih statusa tumora. Slične spoznaje u svojim istraživanjima imali su i Goldsmith i sur. (8) i Rua i sur. (14), dok Barona de Guzman i sur. (1) nisu našli povezanost DNA ploidijske i petogodišnjeg preživljenja. Ukupna proliferativna aktivnost tumorskih stanica pokazala se kao najznačajniji prognostički pokazatelj i u univarijantnoj i u multivarijantnoj analizi.

Bolesnici supraglotične lokalizacije, aneuploidnog statusa i ukupne proliferativne aktivnosti veće od 16%, imali su značajno nepovoljniju prognozu bolesti. To nas upućuje na agresivniji pristup liječenja supraglotičnog tumora aneuploidnog statusa i većeg postotka ukupne S-faze. Tumori T1N0M0 glotične lokalizacije najčešće se liječe radioterapijom, s visokim postotkom izliječenja od 85% do 94% i zadovoljavajućim funkcijskim rezultatima (10). Čini se da su tumori diploidnog statusa više radiorezistentni (15,16). Za to do sada nije nađeno jedinstveno objašnjenje. Yasusa i sur. (21) i Walter i sur. (20) nakon radioterapije T1-2 tumora glotisa zaključuju da bolesnici s aneuploidnim statusom tumora imaju lošiju prognozu i da liječenje treba biti agresivnije. Prema rezultatima ovoga rada za pretpostaviti je da će postotak izliječenja biti veći u bolesnika T1-2 veličine tumora glotične lokalizacije, diploidnog statusa tumora,

ukupne proliferativne aktivnosti manje od 16% i proliferativne aktivnosti diploidnog statusa tumora manje od 13%, a koji su operirani, nego oni koji su liječeni radioterapijom.

Veličina tumora, kao i metastaziranje u limfne čvorove vrata, pokazatelji su kliničkog stadija bolesti, dok su sadržaj stanične DNA i proliferativna aktivnost stanica odraz zloćudnog ponašanja tumora. I u ovom radu jedan od najboljih prognostičkih pokazatelja tjeka i ishoda bolesti je prodor u limfne čvorove vrata, tj. prisutnost ili odsutnost pozitivnih limfnih čvorova. Od ukupnog broja bolesnika s tumorom grkljana, bez prisutnih metastaza vrata, 77% imalo je preživljenje 60 mjeseci i više, a samo 20% bolesnika s metastazama. Utjecaj sadržaja stanične DNA primarnog tumora bio je značajan prognostički pokazatelj, aneuploidni status tumora bio je loš prognostički pokazatelj i u bolesnika bez metastaza vrata, a svi bolesnici s metastazama i aneuploidnim statusom umrli su tijekom praćenja. Utjecaj ukupne proliferativne aktivnosti i proliferativne aktivnosti diploidnog statusa tumora nije imao vjerodostojan značaj na ukupno preživljenje u bolesnika s prisutnim metastazama vrata. Rua i sur. (14) nisu našli povezanost DNA ploidijske i metastaza vrata s dužinom preživljenja, ali su u skupini bolesnika bez metastaza vrata imali značajno lošiju prognozu kod tumora aneuploidnog statusa. Ta prognoza bila je još lošija za podskupinu bolesnika

bez metastaza koji su bili samo operirani. Rezultati ovoga istraživanja upućuju na značajnu povezanost ploidnog statusa tumora, lokalizacije i regionalnih metastaza vrata. Iako je DNA ploidnost previše neodređen parametar za predviđanje pojave metastaza vrata, količina sadržaja stanične DNA mogla bi se koristiti u prevenciji. Okultne metastaze vrata kod planocelularnog karcinoma grkljana prisutne su kod 16-28% bolesnika (3,7). Bolesnici supraglotične lokalizacije, bez obzira na veličinu tumora, aneuploidnog statusa, ukupne proliferativne aktivnosti veće od 16%, proliferativne aktivnosti diploidnih tumora veće od 13%, a bez klinički prisutnih metastaza vrata, pripadali bi skupini "visokog rizika". U ovoj skupini bolesnika postoji velika vjerojatnost prisutnih okultnih metastaza vrata, te bi se trebao modificirati terapijski protokol. Uz radikalnu resekciju primarnog tumora, neovisno o veličini, potrebno je učiniti obveznu profilaktičku (elektivnu) disekciju vrata, a možda biti još agresivniji u terapiji, te uvesti adjuvantnu radio ili kemoterapiju. Karcinomi grkljana mogu biti heterogeni i sastavljeni od stanica s različitim biološkim i metastatičkim potencijalom (11). El-Naggar i sur. (6) u 33,3% slučajeva imali su histološki heterogene tumore grkljana i značajne razlike količine sadržaja stanične DNA unutar istog tumora. Međutim heterogenost tumora nije imala značajan utjecaj na postotak proliferativne aktivnosti tumorskih stanica. Postotak proliferativne aktivnosti kod homogenih tumora diploidnog statusa značajno se razlikovao od postotka proliferativne aktivnosti homogenih tumora aneuploidnog statusa, kao i tumora heterogenog sadržaja stanične DNA. Ti nalazi upućuju da je DNA ploidnost možda manje značajan pokazatelj biološkog ponašanja tumora od proliferativne aktivnosti. To pokazuju i naši rezultati (tablica 3). Rezultati ovog rada mogu pomoći u razjašnjenju dijela prijeoperacijskih dilema o primjeni određenih kirurških metoda i tehnika u liječenju planocelularnog karcinoma grkljana, kao i odluci o uporabi određenih dodatnih agresivnijih metoda liječenja.

LITERATURA

1. Barona-de-Guzman R, Martorell MA, Basterra J, Armengot M, Montoro A, Montoro J. Analysis of DNA content in supraglottic epidermoid carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1993;108(6):706-10.
2. Bracko M. Evaluation of DNA content in epithelial hyperplastic lesions of the larynx. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1997; Suppl.527:62-5.
3. Calhoun K, Stierberg C, Hocanson J, Quinn F, Bailey B. Laryngeal cancer without spread to the neck: treatment options and outcome. *South Med J* 1988;81:1369-74.
4. Del Valle Zapico A, Fernandez FF, Suarez AR, Angulo CM, Quintela JR. Prognostic value of histopathologic parameters and DNA flow cytometry in squamous cell carcinoma of the pyriform sinus. *Laryngoscope* 1988;108:269-72.
5. Delvaney KO, Ferlito A, Hunter BC, Rinaldo A. Pretreatment pathologic prognostic factors in head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997;106:983-8.
6. El-Naggar AK, Lopez-Varela V, Luma MA, Weber R, Batsakis JG. Intratumor DNA content heterogeneity in laryngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1992;118:169-73.
7. Gavilan C, Gavilan J. Five-years results of functional neck dissection for cancer of the larynx. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1989;115:1193-6.
8. Goldsmith MM, Cresson DH, Arnold LA, Postma DS, Askin FB, Pillsbury HC. Part I. DNA flow cytometry as a prognostic indicator in head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1987;96:307-18.
9. Hedley D, Friedlander M, Taylor I, Rugg C, Musgrove C. Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem* 1983;31:1333-5.
10. Johansen LV, Overgaard J, Hjelm-Hansen M, Gadeberg CC. Primary radiotherapy of T1 squamous cell carcinoma of the larynx: analysis of 478 patients treated from 1963. to 1985. *Int Radiol Oncol Biol Phys* 1990;18:1307-13.
11. Leonard RCF, Smyth JF. The heterogeneity of human cancer and its influence on metastases and therapy. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1985;21:1001-4.
12. Maturri L, Biondo B, Tamplenizza P, Ottaviani A, Lavezzi AM. DNA content and thymidine labeling index correlate with prognosis in squamous cell carcinoma of the larynx. *Cancer Detect Prev* 1997;21(4):319-25.
13. Norman GR, Streiner DL. PDQ statistics. B.C. Decker Inc, Toronto, 1986.
14. Rua S, Comino A, Fruttero A, Cera G, Semeria A, Lanzillotta L, Boffetta P. Relationship between histologic features, DNA flow cytometry, and clinical behavior of squamous cell carcinoma of the larynx. *Cancer* 1991;67(1):141-9.
15. Stern Y, Aronson M, Shpitzer T, Nativ O, Medalia O, Segal K, Feinmesser R. Significance of DNA ploidy in the treatment of T1 glottic carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;121:1003-5.
16. Toffoli G, Franchin G, Barzan L, Cernigoi C, Carbone A, Sulfaro S, Franceschi S, Biocchi M. Brief report: Prognostic importance of cellular DNA content in T 1-2 laryngeal squamous cell carcinoma treated with radiotherapy. *Laryngoscope* 1995;105:649-52.
17. Užarević B, Batinić D, Petrovečki M, Marušić M. Leukocyte membrane markers on cell populations defined by six flow cytometric bitmaps. *J Clin Lab Anal* 1992;6:17-23.
18. Vindelov LL, Christensen IJ, Nissen NI. A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* 1983;3:323-7.
19. Žalud I, Marušić M. Protočni razvrstavač stanica. *Liječ Vjesn* 1988;110:384-90.
20. Walter MA, Peters GE, Peiper SC. Predicting radiorezistence in early glottic squamous cell carcinoma by DNA content. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1991;100:523-6.
21. Yasuda N, Omori A, Goto T, Hisas Y, Mukarami Y, Otsuki T. Prognostic significance of DNA ploidy of early glottic cancer. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho* 1990;93:1171-8.

PROGNOSTIC FACTORS IN LARYNGEAL CARCINOMA

Davorin Đanić

School of Medicine University "J. J. Strossmayer" in Osijek

ABSTRACT

Sixty-three patients with squamous cell carcinoma of the larynx were included in a retrospective study examining the influence of the following prognostic indicators: localization, size of primary tumor, presence or absence of neck metastases, disease stage and histologic grade of differentiation. Flow cytometric analysis of the cell cycle, DNA ploidy and proliferative activity as direct prognostic indicators of tumor aggressivity was performed on paraffin-embedded blocks of specimens taken from 36 patients. Supraglottic tumor localization ($p=0.008$), greater tumor size ($p=0.0064$), local neck metastases ($p=0.00009$), higher clinical disease stage ($p=0.0030$), DNA aneuploidy ($p=0.0091$), higher overall proliferative activity ($p=0.0001$), and higher overall proliferative activity of diploid tumors ($p=0.0017$) were found to be significant single unfavorable prognostic indicators of overall survival, whereas the histological grade of differentiation was not found to be a reliable prognostic indicator ($p=0.988$). Only a higher overall proliferative activity of tumor cells was confirmed by the multivariate analysis as a reliable unfavorable prognostic indicator ($p=0.013$). Cellular DNA content (ploidy, overall proliferative activity and overall proliferative activity of diploid tumors) correlated significantly with primary localization and size of the tumor, the presence of local metastases in the neck, and the disease stage.

Key words: laryngeal carcinoma - prognosis