

# Receptor epidermalnog faktora kod tumora glotisa

---

**Imbrishich, Svetlana**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2016**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:032653>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-13**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE

Svetlana Imbrishich

RECEPTOR EPIDERMALNOG FAKTORA RASTA KOD TUMORA  
GLOTISA

Diplomski rad

Rijeka, 2016.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE

Svetlana Imbrishich

RECEPTOR EPIDERMALNOG FAKTORA RASTA KOD TUMORA  
GLOTISA

Diplomski rad

Rijeka, 2016.

Mentor rada: prof. dr. sc. Tamara Braut, dr.med.

Komentor rada: Blažen Marijić, dr. med.

Diplomski rad ocjenjen je dana \_\_\_\_\_ u/na \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_,

pred povjerenstvom u sastavu:

1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

3. \_\_\_\_\_

Rad sadrži 50 stranica, 11 slika, 9 tablica, 43 literaturnih navoda.

## **ZAHVALA**

*Istraživanje je obavljeno u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta Sveučilišta u Rijeci “Molekularni markeri u prekanceroznim lezijama i invazivnim karcinomima larinksa”.*

*Zahvaljujem svome mentoru prof. dr. sc. Tamari Braut i komentoru dr. Blaženu Marijiću koji su mi svojim savjetima bili od velike pomoći. Trud i volja kojom su se iskazali i vrijeme koje su odvojili od nemjerljive su važnosti za kvalitetu ovog rada i mog osobnog rasta.*

*Zahvaljujem dr. sc. Andrei Dekanić za histološku obradu materijala, prof. dr. sc. Marti Žuvić-Butrorac za statističku obradu te Bosi Licul za pomoć oko pronalaženja stručne literature.*

*Zahvaljujem svojoj obitelji, prijateljima i kolegama te posebno svojoj majci koja mi je uvijek bila najveća potpora.*

# Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Anatomija grkljana.....	1
1.2. Karcinom grkljana.....	3
1.2.1. Epidemiologija karcinoma grkljana .....	3
1.2.2. Etiologija karcinoma grkljana .....	4
1.2.3. Dijagnostički postupci kod tumora grkljana .....	5
1.2.4. TNM klasifikacija tumora grkljana .....	5
1.2.5. Terapija tumora grkljana .....	7
1.2.6. Prognoza tumora grkljana .....	9
1.3. Receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR).....	11
1.3.1. EGFR kod tumora grkljana .....	11
2. Hipoteza rada.....	13
3. Svrha rada.....	14
4. Ispitanici i metode .....	15
4.1. Ispitanici .....	15
4.2. Metode.....	15
4.3. Statistička analiza .....	16
5. Rezultati .....	17
5.1. Opis uzorka .....	17
5.2. Analiza obilježja tumora u uzorku ispitanika.....	18
5.3 Analiza prediktivnih vrijednosti obilježja tumora za preživljenje ispitanika.....	27
6. Rasprava .....	29
7. Zaključci.....	35
8. Sažetak .....	36
9. Summary .....	37
10. Literatura .....	38
11. Životopis.....	44

## Popis skraćenica

HPV – human papillomavirus (engl.), humani papiloma virus

AIDS – acquired immune deficiency syndrome (engl.), sindrom stečene imunodeficijencije

CT – computed tomography (engl.), kompjutorizirana tomografija

MSCT – multi-slice computer tomography (engl.), višeslojna kompjutorizirana tomografija

MR – magnetic resonance (engl.), magnetska rezonancija

PET-CT – positron emission tomography - computed tomography (engl.), pozitronska emisijska tomografija

TNM – tumor, nodus, metastasis (engl.), tumor, limfne čvorovi, metastaze

PHD – pathohistological diagnosis (engl.), patohistološka dijagnoza

TGF- $\alpha$  – transforming growth factor alfa (engl.), transformirajući faktor rasta alfa

MAPK – mitogen-activated protein kinases (eng.), mitogen aktivirana protein kinaza

ERK – extracellular signal-regulated kinases (engl.), izvanstanična signalom regulirana protein kinaza

PI3K – phosphoinositide 3-kinase (eng.), fosfoinozimid-3-kinaza

mEGFR – membrane epidermal growth factor receptor (engl.), membranski epidermalni faktor rasta

cEGFR – cytoplasmic epidermal growth factor receptor (engl.), citoplazmatski epidermalni faktor rasta

HE – hemalaun eozin

MDM2 – mouse double minute 2 homolog (engl.), mišji homolog

PCNA – proliferating cell nuclear antigen (engl.), proliferativni stanični nuklearni antigen

KBC – Klinički bolnički centar

# 1. Uvod

## 1.1. Anatomija grkljana

Grkljan je dio gornjeg dišnog sustava koji se nalazi u prednjem gornjem dijelu vrata u visini od trećega do šestoga vratnoga kralješka te se proteže od vrha epiglotisa do donjeg ruba krikoida. Cjevasta je oblika i počinje otvorom u hipofarinksu, a nastavlja se u dušnik. Grkljan se sastoji od pet velikih hrskavica (epiglotis, dvije aritenoidne hrskavice, krikoidna hrskavica i tiroidna hrskavica), dvije male hrskavice (cartilago cuneiformis i cartilago corniculata), mišića i potpornih elemenata u vidu membrane i ligamenata. Vezivom i mišićima povezan je sa jezičnom kosti. Organ je s unutarnje strane prekriven sluznicom. Hrkavice čine skelet grkljana, a mišići su njegova funkcionalna cjelina. Mišiće grkljana djelimo na vanjske i unutarnje. Vanjski mišići (m. sternohyoideus, m. thyrohyoideus, m. digastricus, m. mylohyoideus, m. stylohyoideus, m. sternothyroideus) omogućuju kretanje grkljana u kranijalnom i kaudalnom smjeru te ga fiksiraju tijekom fonacije. Unutarnji mišići grkljana su aduktori (m. cricoarytenoideus lateralis, m. thyroarytenoideus internus i externus, m. interarytenoideus transversus) i jedan abduktor (m. cricoarytenoideus dorsalis). Aduktori su mišići fonacije, oni zatvaraju glotis. Abduktor je mišić respiracije, on otvara glotis. Grkljan dijelimo u 3 podjedinice: supraglotis, glotis i subglotis. Supraglotis je gornji dio grkljana u koji spadaju epiglotis, ariepiglotidni nabori te aritenoidni i ventrikularni nabori. Glotis obuhvaća vokalne nabore, prednju i stražnju komisuru. Subglotis se proteže od donje granice glotisa do donjeg ruba krikoidne hrskavice.

Grkljan irigiraju gornja i srednja laringealna arterija (ogranci gornje tiroidne arterije) te donja laringealna arterija (ogranak donje tiroidne arterije). Nervus laryngeus superior i nervus laryngeus inferior (ogranci nervusa vagusa) motorno inerviraju grkljan. Osjetno sluznicu grkljana inervira nervus laryngeus inferior (1).



Supraglotički prostor je bogat limfnim žilama koji odvede limfu u duboke vratne i preepigloteičke limfne čvorove pa tumori ovog područja najbrže metastaziraju.

Subglotička limfna drenaža je također bogata, a vodi do prelaringealnih i pretrahealnih limfnih čvorova dok je područje glotisa siromašno limfnom drenažom pa su i metastaze rjeđe.

Histološki je sluznica grkljana građena od dvije vrste epitela: respiratornog cilindričnog s trepetljikama i višeslojnog pločastog koji se nalazi na glasnicama.

Funkcije grkljana su disanje, govor i gutanje. Poremećaji anatomskih odnosa ili pojava funkcionalnih nedostataka u regiji grkljana mogu poremetiti sve tri funkcije: disanje, govor i gutanje (1).

## **1.2. Karcinom grkljana**

Većina zloćudnih tumora grkljana su planocelularni karcinomi. Ostali tumori (hondrosarkomi, cilindromi, adenokarcinomi i dr.) u grkljanu su iznimno rijetki (1).

Bolesti grkljana se manifestiraju simptomima koji su rezultat poremećaja njegovih funkcija. Najznačajniji simptom zbog kojeg se pacijent javi liječniku je dugotrajna promuklost. U ostale simptome spadaju respiratorne tegobe poput stridora, otežano gutanje, bol u grlu, otekline na vratu, osjećaj stranog tijela (1). Zloćudne tumore grkljana prema lokalizaciji možemo podijeliti na supraglotičke, glotičke i subglotičke. Simptomi supraglotičkog karcinoma su nespecifični, pacijenti se često žale na bol u grlu kod gutanja koja se širi prema uhu te na osjećaj stranog tijela, a ponekad i na krv u ispljuvku i neugodan zadah, a promuklost je u ovom slučaju kasniji simptom. Tumori glotičkog područja su tumori smješteni na glasnicama. Vrlo rano uzrokuju promuklost te se obično rano dijagnosticiraju. Subglotičko područje najuži je dio grkljana, ali ovdje se simptomi jave relativno kasno kad tumor dovoljno naraste i svojim rastom počne djelovati na funkciju gutanja i disanja. Prvi simptom je obično hripanje pri disanju koje je osobito čujno pri udisaju, a praćeno je uvlačenjem juguluma, supraklavikularnih jama, interkostalnih prostora i epigastrija.

Kada se lumen dišnoga puta jako suzi pojavi se i respiracijska insuficijencija (1). Tumori koji se protežu kroz 2 ili više etaža larinksa nazivamo transglotičnim tumorima (1).

### **1.2.1. Epidemiologija karcinoma grkljana**

Karcinom grkljana predstavlja važan javnozdravstveni problem te je najčešći karcinom među planocelularnim karcinomima glave i vrata (2). Prema podacima Međunarodne agencije za istraživanje raka, koja je dio Svjetske zdravstvene organizacije Ujedinjenih naroda, u Europi je u 2012. godini registrirano 39901 novootkrivenih bolesnika s karcinomom grkljana, stopa incidencije je 4,4/100000 stanovnika, a stopa mortaliteta je 2,1/100000 stanovnika (3).

Prema podacima Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo u 2013. godini u Hrvatskoj je registrirano 302 novootkrivenih bolesnika s karcinomom grkljana (prema MKB šifra C32), stopa incidencije 7.0/100 000 stanovnika. Muškarci oboljevaju češće od žena, zbog rasprostranjenije navike pušenja i češće redovite konzumacije većih količina alkoholnih pića. Prema podacima Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo u 2013. godini u Hrvatskoj je registrirano 284 novootkrivenih bolesnika među muškarcima te 18 novootkrivenih bolesnika među ženama, stopa incidencije je 13,7/100000 stanovnika za muškarce te 0,8/100000 stanovnika za žene (4). Prema svemu navedenom, karcinom grkljana u Hrvatskoj i svijetu se češće javlja kod muške populacije (2, 4).

### **1.2.2. Etiologija karcinoma grkljana**

Najvažniji etiološki čimbenici u razvoju karcinoma grkljana su pušenje i konzumiranje alkoholnih pića. Rizik od pojave tumora grkljana se povećava s ranijim početkom pušenja, ovisi o broju cigareta dnevno, duljini pušenja te udruženosti s drugim rizičnim čimbenicima. Najopasniji je kombinirani učinak konzumacije alkohola i duhanskog dima koji osim karcinoma grkljana mogu uzrokovati i pojavu tumora usne šupljine, jezika i usana (5,6).

Među čimbenicima koji također mogu potaknuti taj proces su kronične bolesti kao što su kronični laringitis, laringotraheitis, faringitis, laringofaringealni refluks i gastroezofagealna refluksna bolest (6,7). Infekcija *grla* HPV virusom također povećava rizik od nastanka karcinoma grkljana (8).

Karcinom grkljana se može razviti kao posljedica maligne transformacije nekih prekanceroznih lezija grkljana kao što su leukoplakija, eritroplakija i keratoza (2, 9).

Osobe koje su na radnom mjestu izložene materijalima poput azbesta, nikla, sumporne kiseline, ugljene prašine, cementa, formaldehida i sl. češće oboljevaju od karcinoma grkljana (10). Rizičnoj skupini također pripadaju bolesnici sa smanjenim imunitetom (npr. oboljeli od AIDS-a) (11).

### **1.2.3. Dijagnostički postupci kod tumora grkljana**

Zloćudni tumor makroskopski izgleda kao neravni infiltrat ili kao ulkus neravnih rubova i dna. Karcinom i papilom mogu makroskopski izgledati podjednako (1).

Dijagnostički postupak kod sumnje na tumor grkljana započinje sa detaljnom anamnezom i kliničkim pregledom. Pregled uključuje inspekciju koja se provodi pomoću fiberoptičkog laringoskopa ili metodom indirektne laringoskopije te palpaciju. Klinički nalaz potvrđuje se biopsijom koja se obično uzima tijekom mikrolaringoskopije (1,12).

Nakon postavljanja dijagnoze karcinoma grkljana neophodno je utvrditi veličinu i proširenost tumora. Metastaze tumora grkljana pojavljuju se najčešće u limfnim čvorovima vrata. Metoda izbora za utvrđivanje broja suspektih limfnih čvorova je ultrazvuk. Suspekti limfni čvorovi mogu se punktirati radi citološke analize. Ukoliko je potrebno za procjenu proširenosti primarnog tumora i zahvaćenosti okolnih struktura mogu se dodatno koristiti CT, MSCT, MR, PET-CT(1, 12).

### **1.2.4. TNM klasifikacija tumora grkljana**

Nakon dijagnostičke obrade te prije početka terapije bolest se klasificira prema TNM klasifikaciji. Klasifikacija veličine primarnog tumora grkljana (T) razlikuje se ovisno o lokalizaciji. Klasifikacija regionalnih metastaza (N) i udaljenih metastaza (M) jedinstvena je za sve planocelularne karcinome glave i vrata.

#### ***Klasifikacija Veličine primarnog tumora (T)***

TX – primarni tumor se ne može odrediti

T0 – nema znakova primarnog tumora

Tis – Carcinoma in situ

### ***Supraglotis***

T1 – tumor ograničen na jednu podjedinicu supraglotisa uz normalnu mobilnost glasnice.

T2 – tumor zahvaća sluznicu više od jedne podjedinice supraglotisa ili glotisa ili regije u neposrednoj blizini bez fiksacije hemilarinksa.

T3 tumor ograničen na larinks s fiksacijom hemilarinksa i/ili infiltracijom postkrikoidne regije, preepiglotskog ili paraglotskog prostora, i/ili s manjom erozijom tiroidne hrskavice.

T4 tumor prolazi kroz tiroidnu hrskavicu, i/ili infiltrira okolne strukture. (13)

### ***Glottis***

T1 – tumor ograničen na jednu glasnicu uz normalnu mobilnost glasnice.

T1a – tumor ograničen na jednu glasnicu

T1b – tumor zahvaća obje glasnice

T2 – tumor se širi na supraglotis i/ili subglottis, i/ili prisutna poremećena mobilnost glasnice.

T3 – tumor ograničen na larinks s fiksacijom hemilarinksa i/ili infiltracijom paraglotskog prostora, i/ili s manjom erozijom tiroidne hrskavice.

T4 – tumor prolazi kroz tiroidnu hrskavicu ili infiltrira okolne strukture. (13)

### ***Subglottis***

T1 – tumor ograničen na subglottis

T2 – tumor se širi na jednu ili obje glasnice uz normalnu ili poremećenu mobilnost glasnice

T3 – tumor ograničen na larinks s fiksacijom glasnice

T4 – tumor prolazi kroz krikoidnu ili tiroidnu hrskavicu, i/ili infiltrira okolne strukture (13)

***Klasifikacija regionalnih metastaza (N) prema TNM klasifikaciji.***

NX – regionalni limfni čvorovi se ne mogu odrediti

N0 – nema vidljivih regionalnih metastaza

N1 – metastaza u jednom ipsilateralnom limfnom čvoru manja od 3 cm

N2 – metastaza u jednom ipsilateralnom limfnom čvoru veća od 3 cm, a manja od 6 cm ili više metastaza u ipsilateralnim limfnim čvorovima manjih od 6 cm, metastaza u obostranim ili kontralateralnim limfnim čvorovima manja od 6 cm

N2a – metastaza je u jednom ipsilateralnom limfnom čvoru većem od 3 cm ali ne većem od 6 cm u najvećem promjeru

N2b – metastaze su u više ipsilateralnih čvorova ne većim od 6 cm u najvećem promjeru

N2c – metastaze su bilateralne ili kontralateralne ne većih promjera od 6 cm

N3 – metastaze u limfnom čvoru većeg promjera od 6 cm (13)

***Klasifikacija udaljenih metastaza (M) prema TNM klasifikaciji***

MX – udaljene metastaze se ne mogu odrediti

M0 – nema udaljenih metastaza

M1 – postoje udaljene metastaze (13)

**1.2.5. Terapija tumora grkljana**

Terapija karcinoma grkljana uključuje kiruršku resekciju, kemoterapiju, radioterapiju. U novije vrijeme kod određenih bolesnika primjenjuje se i biološka terapija ili imunoterapija.

Odluka o terapiji donosi se na osnovi patohistološke analize i TNM klasifikacije

Kirurški tretman podrazumijeva zahvate na grkljanu i okolnom tkivu te po potrebi, kod prisutnosti regionalnih metastaza, i disekciju vrata. U nekim slučajevima je dovoljno odstraniti dio ili cijelu glasnicu, a u nekim slučajevima je potrebna totalna laringektomija.

Kod parcijalne laringektomije odstranjuje se dio grkljana koji je zahvaćen tumorom te se nastoji sačuvati zdravi dio. Totalna laringektomija je indicirana kod bolesnika s velikim tumorima (T3 i T4 stadiji prema TNM klasifikaciji). U ovom slučaju grkljan se odstranjuje u potpunosti zajedno sa jezičnom kosti (1, 12, 14).

Parcijalna laringektomija omogućava djelomično ili potpuno očuvanje funkcija grkljana što znači da se bolesnici nakon operacije hrane prirodnim putem, dišu te mogu govoriti. Totalna laringektomija dovodi do gubitka funkcije govora čime značajno remeti kvalitetu života bolesnika. Postoje tri metode kojima se može omogućiti govor bez grkljana.

To su učenje ezofagealnog govora, govor uz pomoć ugrađene proteze i govor uz pomoć elektrolarinksa (15).

Prisutnost metastaza u regionalnim limfnim čvorovima je indikacija za disekciju vrata koja može biti radikalna, modificirana i selektivna. Kod radikalne disekcije odstranjuju se limfni čvorovi od I. do V. regije, m. sternocleidomastoideus, n. accessorius i v. jugularis interna. Kod modificirane disekcije odstranjuju se limfni čvorovi od I. do V. regije, ali se sačuva barem jedna od struktura vrata (m. sternocleidomastoideus, n. accessorius ili v. jugularis interna). Kod selektivne disekcije odstranjuju se limfni čvorovi od II. do V. ili od II. do IV. regije (1, 16).

Radioterapija se može primjeniti prije kirurškog tretmana kako bi se smanjila veličina tumora. Također se primjenjuje i poslije kirurškog liječenja samostalno ili u kombinaciji sa kemoterapijom. Radioterapija uzrokuje određene nuspojave kao što su suhoća ili pretjerano slinjenje, dermatitisi, gljivične infekcije sluznice usne šupljine, disfagija.

U liječenju karcinoma grkljana kemoterapija se najčešće primjenjuje konkomitantno odnosno u kombinaciji sa radioterapijom nakon kirurškog tretmana. Također, može se primjenjivati i neoadjuvantno u svrhu smanjenja veličine tumora prije kirurškog liječenja. Kod bolesnika sa uznapredovalim inoperabilnim karcinomom grkljana kemoterapija ima palijativnu svrhu.

Unatoč terapijskim postupcima koji su danas na raspolaganju, rezultati liječenja karcinoma grkljana i dalje nisu zadovoljavajući. Prilikom istraživanja su određeni markeri koji igraju ulogu u onkogenezi tumora grkljana. Prvo su istraženi p53, Ki67, a zatim EGFR. p53 je regulacijski protein koji sprječava replikaciju oštećene DNK te potiče apoptozu stanica sa oštećenom DNK. Mutiran ili inaktivan p53 dopušta stanicama s oštećenom DNK diobu i preživljavanje i tako vodi nastanku tumora. Antigen Ki67 je nuklearni protein koji je potreban za staničnu proliferaciju. Također, potreban je za transkripciju ribosomske RNK, te njegova inaktivacija uzrokuje inhibiciju sinteze ribosomske RNK.

Za razliku od p53 i Ki67 EGFR nudi i potencijalne terapijske mogućnosti primjenom anti-EGFR monoklonalnih protutijela kod EGFR pozitivnih tumora.

### **1.2.6. Prognoza tumora grkljana**

Prognoza tumora grkljana ovisi o nekoliko čimbenika:

a). O veličini tumora;

Najbolju prognozu imaju tumori lokalizirani u glotisu. To se može objasniti time da se oni rano dijagnosticiraju jer se kod njih kao rani simptom javlja promuklost. Također glotički tumori se sporije šire u okolinu jer imaju oskudnu limfnu i krvnu opskrbu. Supraglotički tumori imaju lošu prognozu jer se kasno dijagnosticiraju.

Simptomi tumora supraglotičke regije su nespecifični te oni brže i lakše metastaziraju u regionalne limfne čvorove i šire se izvan grkljana na okolne strukture hipofarinksa. Tumori subglotičkog područja također imaju lošu prognozu jer je tumor u vrijeme postavljanja dijagnoze velik te se brzo širi u donje vratne i paratrahealne limfne čvorove (1,17).

b) O histološkom stupnju diferenciranosti;

Tumori koji su dobro diferencirani imaju bolju prognozu od slabo diferenciranih, koji češće metastaziraju u regionalne limfne čvorove (18, 19).



c). O dubini invazije;

Tumori kod kojih se vidi invazija zdravog tkiva imaju lošiju prognozu. Karcinomi kod kojih je prisutna perineuralna invazija, perivaskularna invazija te ekstrakapsularno širenje tumora u metastatskom limfnom čvoru imaju lošiju prognozu (18, 19).

d). O ekspresiji tumorskih markera;

Povećana ekspresija p53, Ki67, EGFR-a također je povezana sa lošijom prognozom, agresivnijom rastom tumora, smanjenim preživljenjem bolesnika te rezistencijom tumora na radioterapiju (20).

### **1.3. Receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR)**

EGFR je transmembranski glikoprotein koji se nalazi na staničnoj membrani epitelnih stanica te ima važnu ulogu u komunikaciji stanice s izvanstaničnim prostorom i održavanju stanične homeostaze. EGFR (ErbB1, HER1) je jedan od 4 članova ErbB/HER obitelji receptora tirozin-kinaze. Ostali članovi su HER2/neu (ErbB2), HER3 (ErbB3) i HER 4(ErbB4) (20).

Svaki EGFR receptor građen je od vanstanične, transmembranske te unutarstanične domene. Vanstanična domena veže ligande, a unutarstanična kinazna domena aktivira signalne putove. EGFR veže različite ligande uključujući epidermalni faktor rasta (EGF), amfiregulin (AR), transformirajući faktor rasta  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) itd (21).

Vežanje liganda izaziva homodimerizaciju ili heterodimerizaciju EGFR sa ostalim ErbB/HER receptorima (npr., HER2, HER3 i HER4) te uzrokuje autofosforilaciju tirozinskih ostataka unutarstanične kinazne domene. Fosforilacija tirozinskih ostataka aktivira tri glavna signalna puta uključujući MAPK/ERK signalni put, PI3K/AKT/mTOR signalni put te JAK2/STAT3 signalni put(20, 21).

Neprimjerena i trajna stimulacija ovih puteva potiče staničnu proliferaciju i angiogenezu, olakšava tumorsku invaziju, metastaziranje, inhibira apoptozu te konačno uzrokuje rezistenciju tumora na kemoterapiju i radioterapiju (20, 21).

Abnormalna aktivacija EGFR puta je zajednički čimbenik za različite vrste epitelnih tumora uključujući zloćudne tumore pluća, jednjaka, debelog crijeva, kože i dr (20).

#### **1.3.1. EGFR kod tumora grkljana**

Prekomjerna ekspresija EGFR-a je prisutna kod većine (do 90%) planocelularnih karcinoma glave i vrata. EGFR i njegov ligand TGF- $\alpha$  su se pokazali kao biomarkeri loše prognoze bolesti i smanjenog preživljenja (20).

Broj kopija EGFR gena je povećan kod do 58% planocelularnih karcinoma glave i vrata te je prediktivan čimbenik maligne transformacije kod prekanceroznih lezija (22).

Pretrage imunohistokemije su pokazale da je ekspresija EGFR-a povećana kod planocelularnih karcinoma grkljana. Osim toga ekspresija EGFR-a je veća kod slabodiferenciranih tumora u usporedbi sa dobrodiferenciranim tumorima (22).

EGFR pozitivni tumori grkljana pokazuju rezistenciju na kemoterapiju i radioterapiju, ranije i češće recidiviraju, brže metastaziraju te imaju lošiju prognozu u odnosu na EGFR negativne tumore (22, 23).

Prognostička vrijednost EGFR-a može biti povećana analizom ekspresije ostalih članova obitelji ErbB/HER receptora. Tumori koji su također i HER2, HER3 i HER4 pozitivni imaju bolju prognozu jer rjeđe recidiviraju za razliku od onih koji su EGFR pozitivni ali su HER2, HER3 i HER4 negativni (22, 23, 24).

S obzirom na centralnu ulogu EGFR-a u biologiji tumora, članovi EGFR obitelji te njihovi signalni putevi su perspektivni ciljevi za terapiju planocelularnog karcinoma grkljana. Današnje kliničke studije proučavaju rezultate upotrebe monoklonalnih protutijela i inhibitora tirozin kinaze u terapiji EGFR pozitivnih tumora (24, 25, 26, 27).

## **2. Hipoteza rada**

Hipoteza ovog istraživanja je da je veća razina ekspresije mEGFR-a prisutna kod agresivnijih tumora odnosno kod većih tumora prema TNM klasifikaciji tumora. To znači da se očekuje izraženiji mEGFR kod bolesnika koji imaju metastaze.

Također pretpostavljamo da veće vrijednosti mEGFR-a posljedično povećavaju potrebu za disekcijom vrata i zračenjem. Od navika za koje je poznato da sinergistički povećavaju mogućnost nastanka tumora glotisa smo naveli pušenje cigareta i konzumiranje alkohola.

### **3. Svrha rada**

Ciljevi ovog istraživanja su usporediti status mEGFR-a sa veličinom tumora prema TNM klasifikaciji te utvrditi imaju li pacijenti kod kojih su prisutne metastaze više ili manje izražen mEGFR. Drugi cilj ovog istraživanja je odrediti da li veće vrijednosti mEGFR-a posljedično povećavaju potrebu za disekcijom vrata i zračenjem, te ukoliko da, utvrditi izvode li se češće parcijalni ili totalni zahvati, odnosno laringektomije.

## **4. Ispitanici i metode**

### **4.1. Ispitanici**

Ovo je retrospektivno istraživanje u koje je uključeno 20 ispitanika u dobi od 53 do 81 godina (srednja dob 67,5 godina) koji su se liječili zbog planocelularnog karcinoma glotisa na Klinici za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata u Kliničkom bolničkom centru Rijeka u razdoblju od 2012. do 2014. godine.

### **4.2. Metode**

Ekspresija mEGFR-a u tumorskim stanicama određivala se pomoću imunohistokemije. Razina ekspresije mEGFR-a se opisivala kao postotak obojenih tumorskih stanica na cjelokupnom rezu preparata, 10% obojenih stanica se smatralo kao graničan pozitivan rezultat.

Tkivo za histološku analizu je dobiveno iz operativnog materijala. Za potrebe histološke analize materijal je obrađen standardnom histološkom metodom koja uključuje fiksaciju tkiva u 4% puferiranom formalinu tijekom 24 sata i uklapanje u parafinske blokove, rezanje na debljinu 3 do 5  $\mu\text{m}$  i bojenje standardnom metodom hemalaun-eozin (HE). U imunohistokemijskoj analizi korišteni su dodatni prerezi tkiva. Ekspresija mEGFR-a analizirana je upotrebom monoklonskih protutijela (monoklonalni mišji; klon EGFR.25; kod NCL-EGFR-384; Novocastra, Njemačka).

Razina ekspresije mEGFR-a bilježena je u obliku postotka imunoreaktivnih stanica na temelju kojeg su ispitanici svrstani u skupine:

- 0, za odsutnost reakcije
- 1, za blago izraženo obojenje u više od 10% pozitivnih stanica
- 2, za umjereno izraženo obojenje u više od 10% pozitivnih stanica
- 3, za intenzivno izraženo obojenje u više od 10% pozitivnih stanica (28).

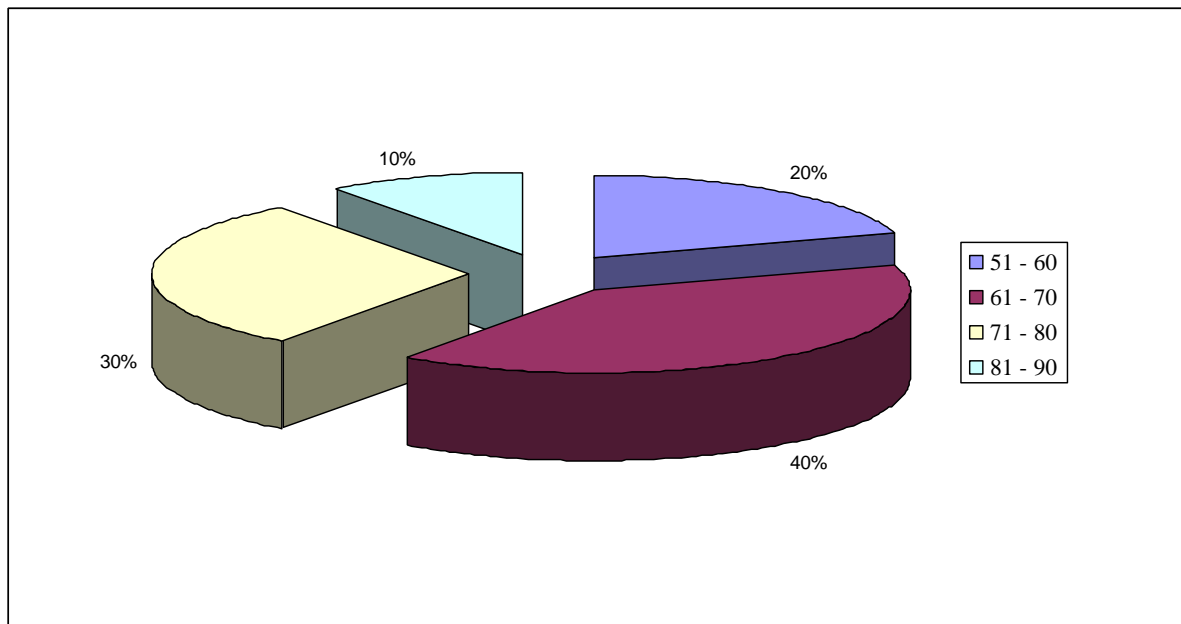
### **4.3. Statistička analiza**

Računalni program Dell Statistica, v.12 (2015) je korišten pri statističkoj obradi podataka. Za statističku analizu korištene su deskriptivne statističke metode te neparametrijski testovi: Mann Whitney U test uparenih te Spearmanov test korelacije. Rezultati koji su se smatrali statistički značajni bili su oni s vrijednosti  $p < 0,05$ .

## 5. Rezultati

### 5.1. Opis uzorka

Uzorak je obuhvatio 20 ispitanika, od čega 19 muškaraca (95%) i 1 žena (5%)<sup>1</sup>. Prosječna dob ispitanika u uzorku iznosila je  $67,5 \pm 9,1$  godina starosti, uz raspon 53 – 81 godine starosti, te je u istraživanju najviše bilo pacijenata starosti od 61 do 70 godina (slika 1.).



**Slika 1. Starost ispitanika koji su sudjelovali u istraživanju izražena u postocima.**

Medijan preživljenja u skupini iznosio je 29,5 mjeseci<sup>2</sup>, s interkvartilnim rasponom 27 – 40 mjeseci i rasponom 24 – 52 mjeseca.

Prikupljeni su bili podaci o lokalizaciji tumora, postojanju lokalnih metastaza, vrsti operativnog zahvata, postoperativnim postupcima (disekcija vrata, zračenje), pojavi recidiva te o postojanju rizičnih ponašanja (pušenje, alkohol) za nastanak tumora. Podaci su sumarno prikazani tablicom 1.

<sup>1</sup> Iz razloga neuravnoteženosti uzorka u ovoj varijabli nisu rađene usporedbe prema spolu.

<sup>2</sup> Varijabla preživljenja nije normalno raspodijeljena pa se prikazuje medijanom i interkvartilnim rasponom.



**Tablica 1. Obilježja bolesti u promatranoj skupini ispitanika.**

<i>Opisna varijabla</i>	<i>frekvencija</i>	<i>% udio</i>
Lokalizacija tumora (lijeva/desna/obje glasnice)	2/3/15	10% / 15% / 75%
Postojanje lokalnih metastaza (ne/da)	14/6	70% / 30%
Vrsta operativnog zahvata - laringektomija (parcijalna / totalna/ nije učinjena)	9/9/2	45% / 45% / 10%
Disekcija vrata (ne/da)	17/3	85% / 15%
Zračenje (ne/da)	9/11	45% / 55%
Pojava recidiva (ne/da)	17/3	85% / 15%
Pušenje (ne/da)	5/15	25% / 75%
Alkohol (ne/da)	5/15	25% / 75%

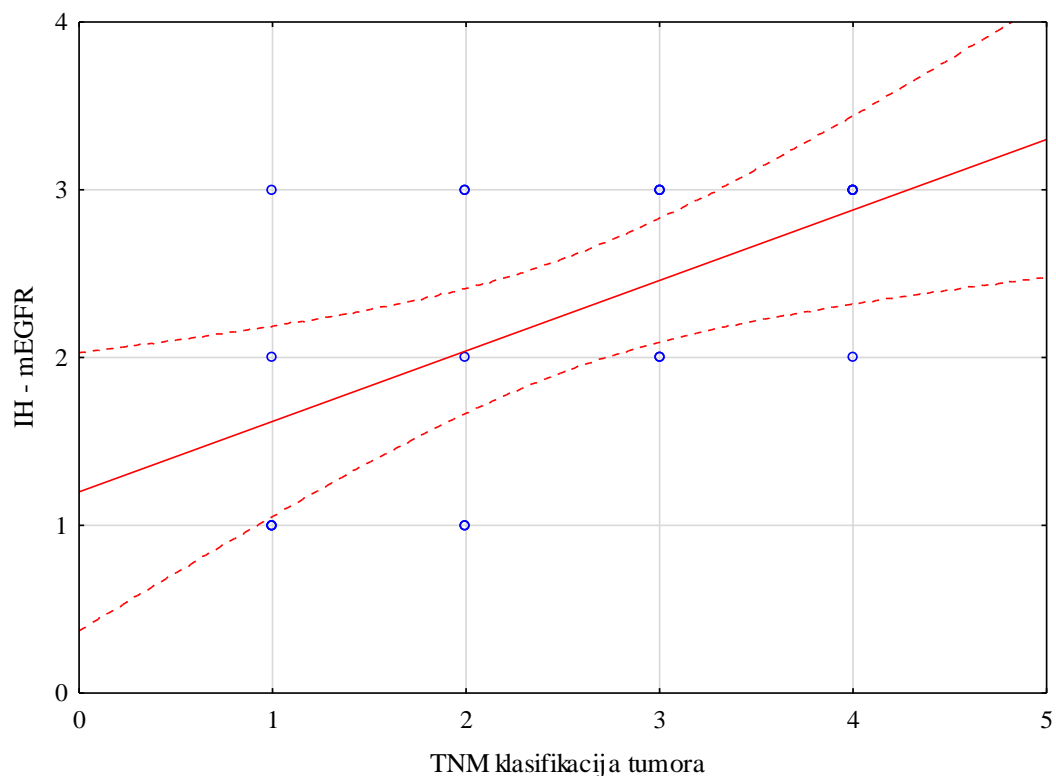
## **5.2. Analiza obilježja tumora u uzorku ispitanika**

Podaci o statusu tumora prema TNM klasifikaciji, skupinama karcinoma (rani i kasni) te o statusu mEGFR-a prikazani su tablicom 2. U rane karcinome smo uključili pacijente sa T1 stadijem (T1a i T1b) i T2 stadijem te u kasne karcinome pacijente sa T3 i T4 stadijem.

**Tablica 2. Obilježja tumora u promatranoj skupini ispitanika.**

<i>Opisna varijabla</i>	<i>Frekvencija</i>	<i>% udio</i>
TNM klasifikacija tumora prema veličini (1/2/3/4)	5/5/5/5	25% / 25% / 25% / 25%
Skupine karcinoma (rani/kasni)	10/10	50% / 50%
Status membranskog EGFR-a (1/2/3)	5/5/10	25% / 25% / 50%

Povezanost veličine tumora prema TNM klasifikaciji sa statusom mEGFR-a istražena je korelacijskom analizom. Rezultat je pokazao da je povezanost bila pozitivna (veći TNM je bio povezan s većim vrijednostima EGFR-a) (Spearman koeficijent korelacije  $r=0,55$ ) i visoko statistički značajna ( $p=0,009$ ) (slika 2.).

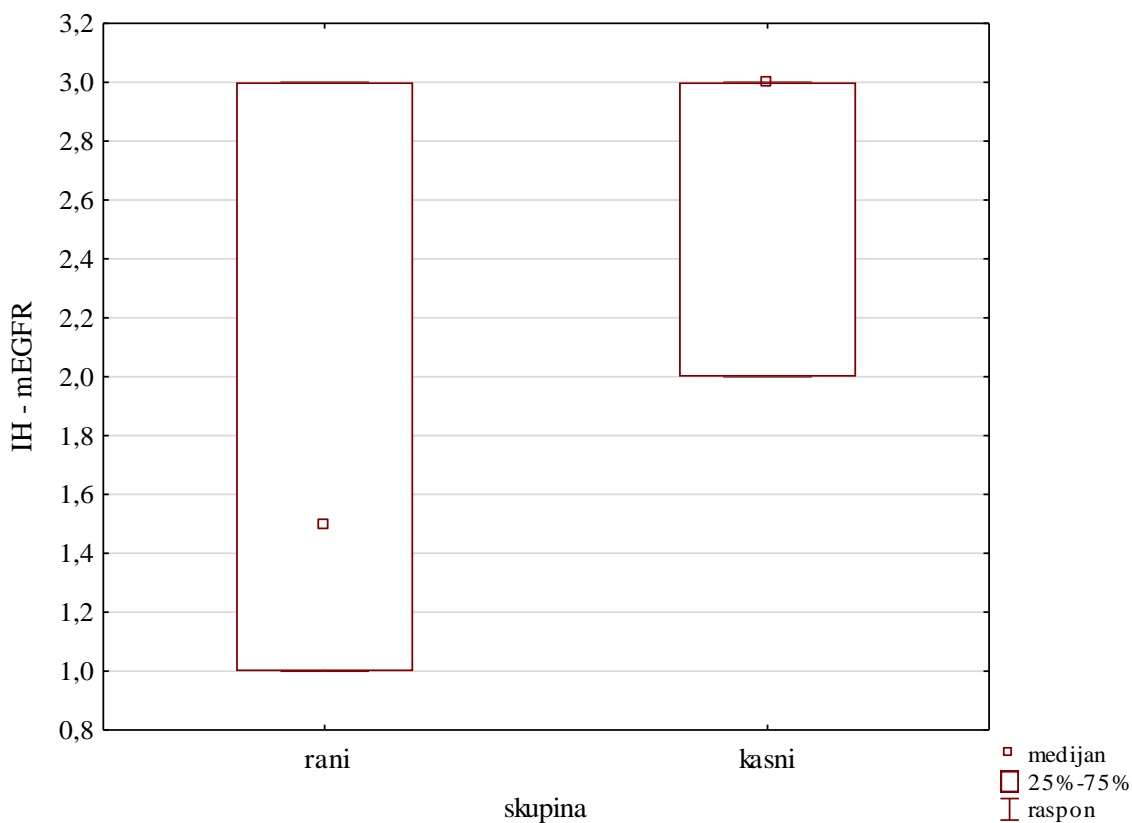


**Slika 2. Korelacijski dijagram za povezanost veličine tumora prema TNM klasifikaciji sa statusom mEGFR-a. Ucrtan je regresijski pravac s 95% intervalom pouzdanosti.**

Usporedba vrijednosti mEGFR-a prema skupinama tumora (rani/kasni), pokazala je da je vrijednost mEGFR-a statistički bila značajno viša u skupini kasnih karcinoma (tablica 3., slika 3.).

**Tablica 3. Podaci usporedbe mEGFR-a u skupinama karcinoma (rani/kasni). Prikazane su vrijednosti medijana sa interkvartilnim rasponom u skupinama. Vrijednosti su usporedene Mann-Whitney U testom.**

	Rani karcinomi (n=10)	Kasni karcinomi (n=10)	Mann-Whitney U test	
			Z	P
IH-mEGFR	1,5 (1-3)	3 (2-3)	-2,22	0,026

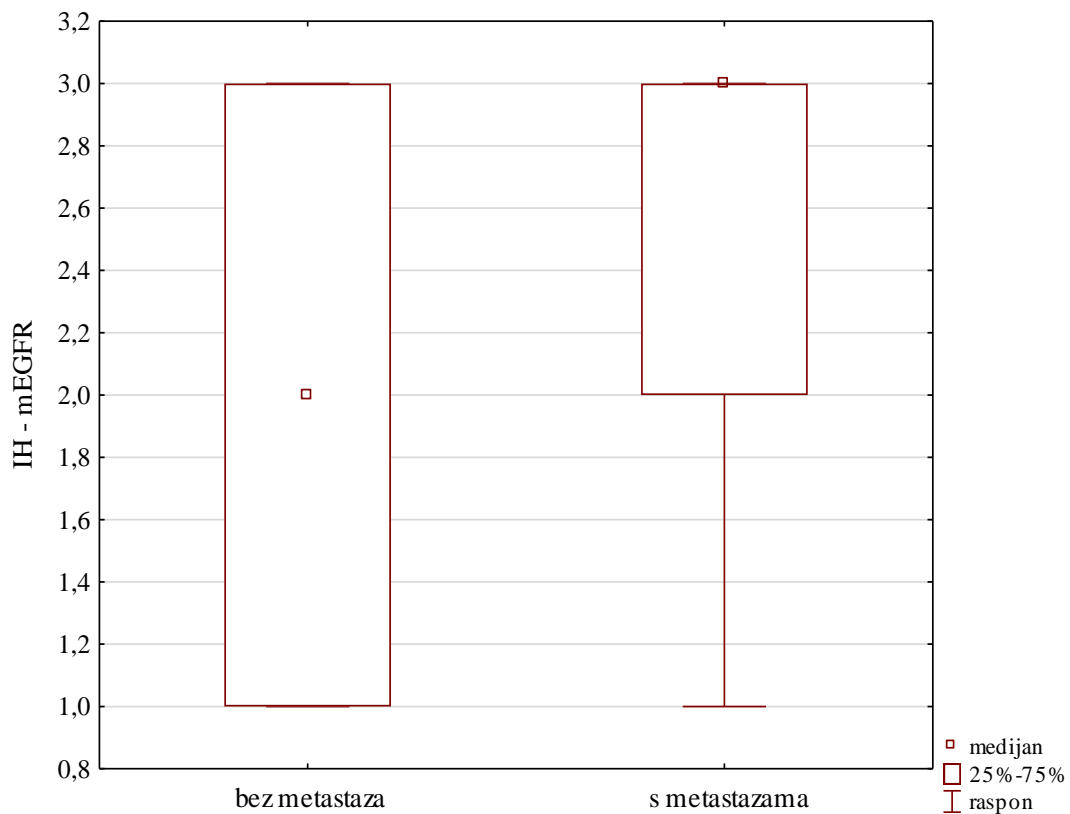


**Slika 3. Box-Whisker grafikon za opis statusa mEGFR-a u skupinama rani i kasni tumori.**

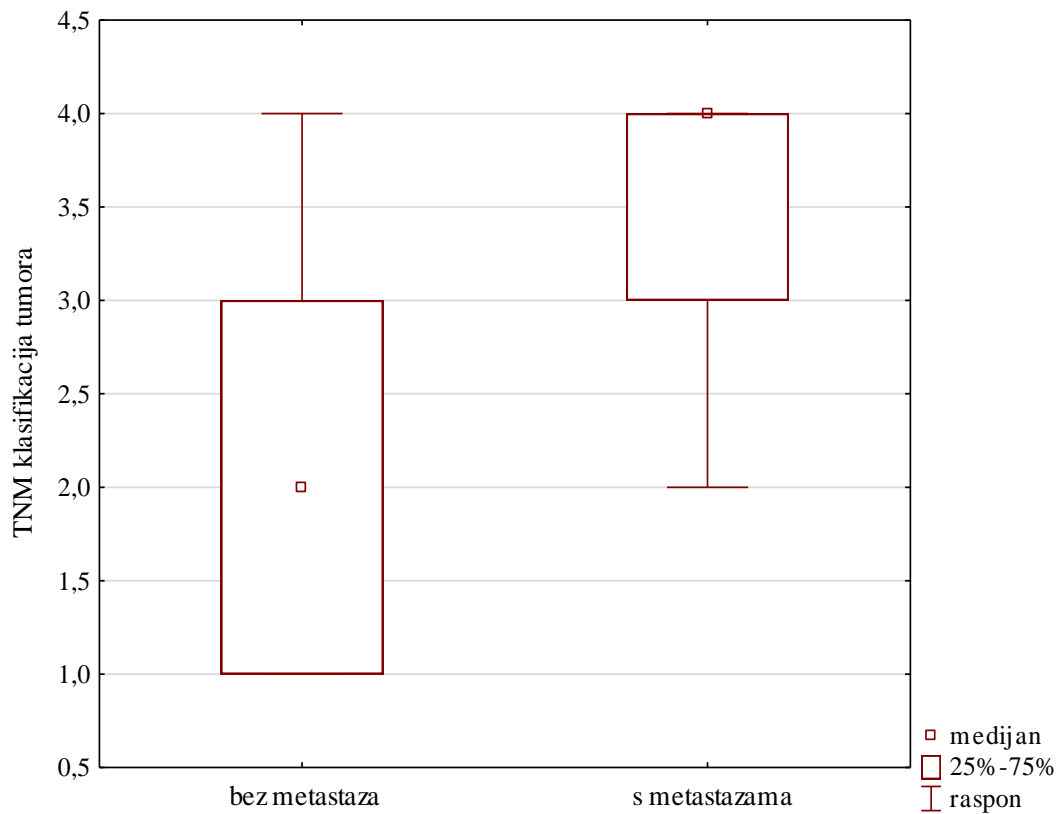
Vrijednosti mEGFR-a kod ispitanika sa metastazama bile su nešto više od vrijednosti kod ispitanika u kojih nisu nađene metastaze, no razlika nije bila statistički značajna. S druge strane, veličina tumora prema TNM klasifikaciji statistički se značajno razlikovala u istim skupinama (tablica 4., slike 4. i 5.).

**Tablica 4. Podaci usporedbe mEGFR-a i TNM klasifikacije u skupinama bez metastaza i s metastazama. Prikazane su vrijednosti medijana sa interkvartilnim rasponom u skupinama. Vrijednosti su uspoređene Mann-Whitney U testom.**

	<i>Bez metastaza (n=14)</i>	<i>S metastazama (n=6)</i>	<i>Mann-Whitney U test</i>	
			<i>Z</i>	<i>P</i>
IH-mEGFR	2 (1-3)	3 (2-3)	-0,85	0,394
TNM klasifikacija	2 (1-3)	4 (3-4)	-2,51	0,012



**Slika 4. Box-Whisker grafikon za opis statusa mEGFR-a u skupinama bez metastaza i s metastazama.**

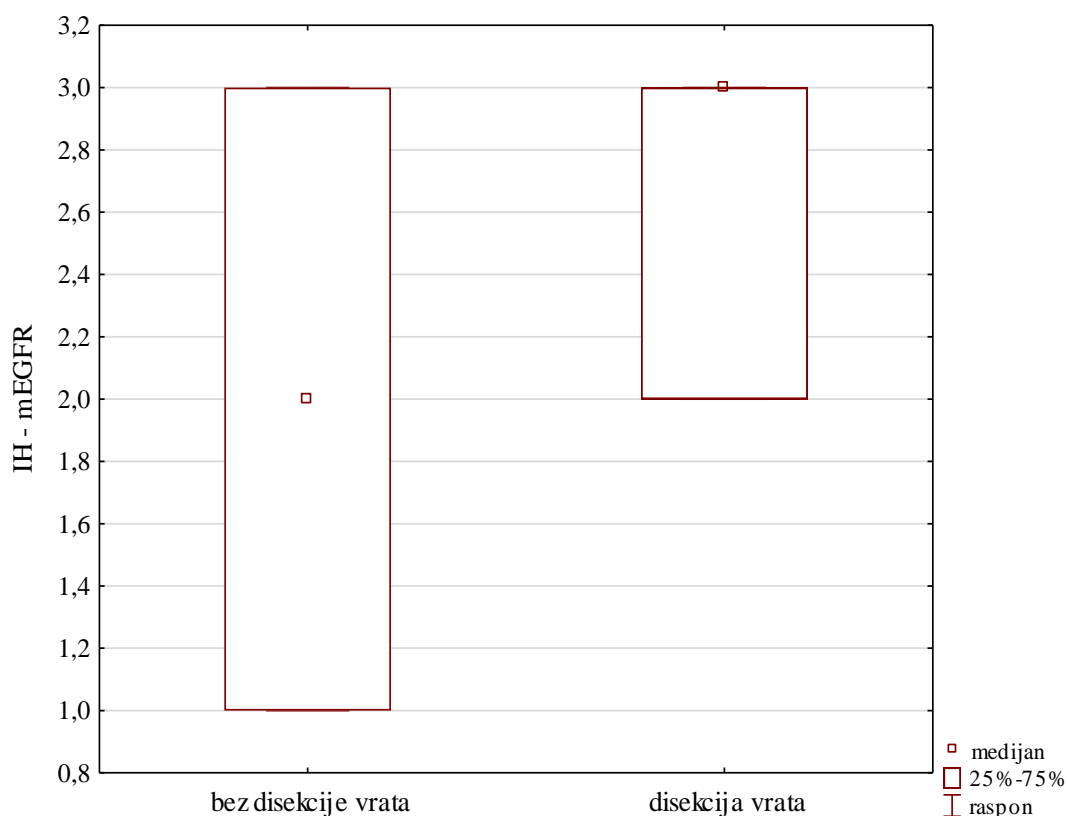


**Slika 5. Box-Whisker grafikon za opis veličine tumora prema TNM klasifikaciji u skupinama bez metastaza i s metastazama.**

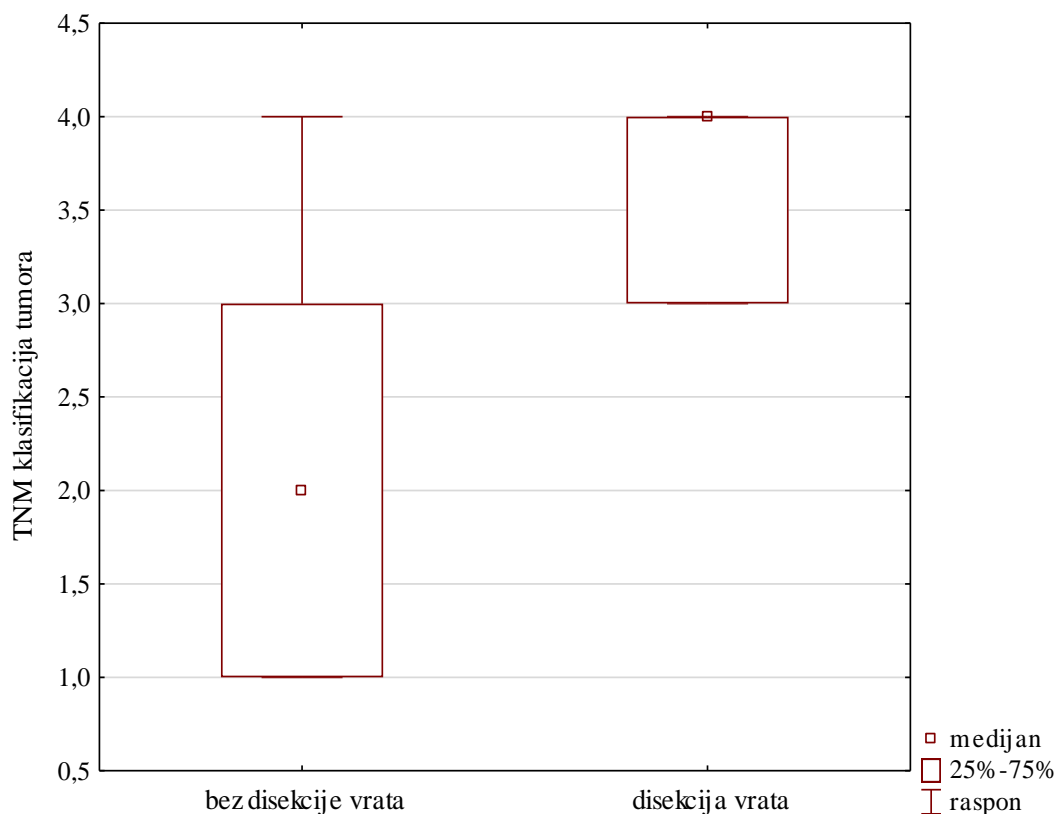
Povezanost vrijednosti mEGFR-a i veličine tumora prema TNM klasifikaciji sa potrebom da se obavi disekcija vrata opisana je tablicom 5. Kod mEGFR-a vrijednosti se nisu razlikovale statistički značajno, a kod veličine tumora prema TNM klasifikaciji, pokazalo se da su vrijednosti marginalno bile značajno veće u skupini sa obavljenom disekcijom vrata (slike 6. i 7.).

**Tablica 5. Podaci usporedbe mEGFR-a i TNM klasifikacije u skupinama bez i sa disekcijom vrata. Prikazane su vrijednosti medijana sa interkvartilnim rasponom u skupinama. Vrijednosti su uspoređene Mann-Whitney U testom.**

	Bez disekcije vrata (n=17)	Disekcija vrata (n=3)	Mann-Whitney U test	
			Z	P
IH-mEGFR	2 (1-3)	3 (2-3)	-0,81	0,420
TNM klasifikacija	2 (1-3)	4 (3-4)	-1,86	0,063



**Slika 6. Box-Whisker grafikon za opis statusa mEGFR-a u skupini bez disekcije vrata i sa učinjenom disekcijom vrata.**

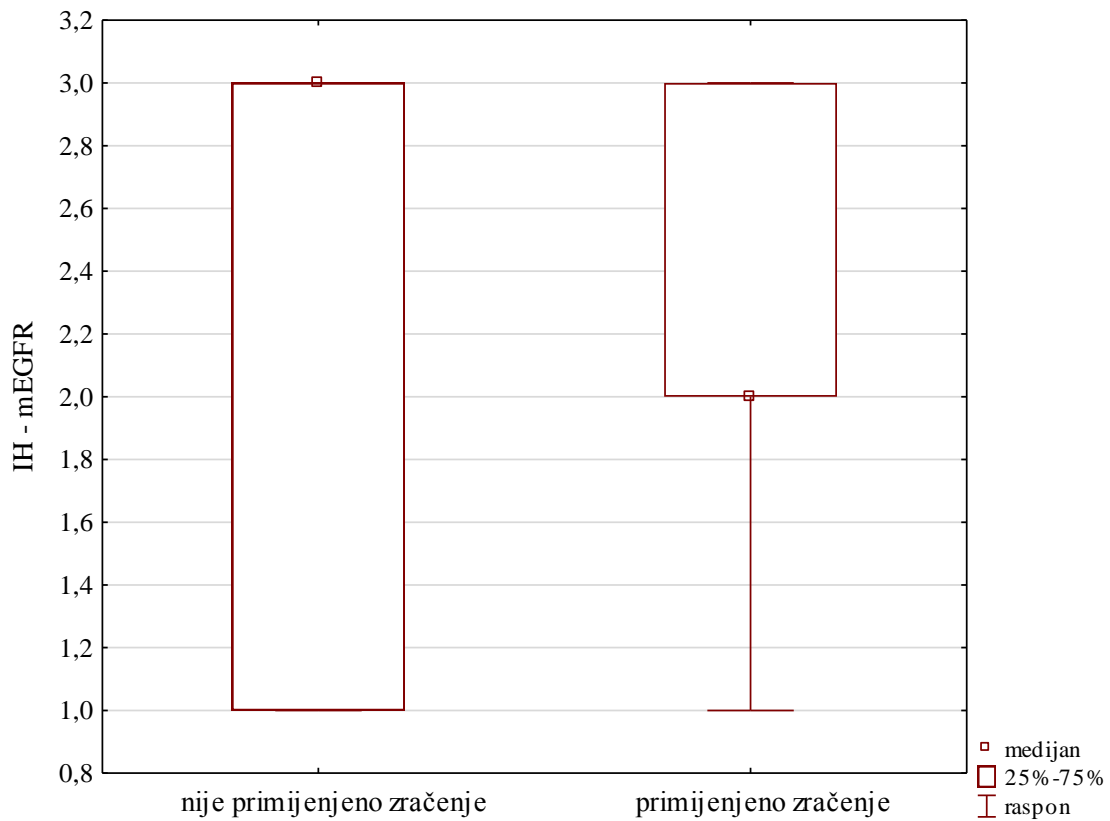


**Slika 7. Box-Whisker grafikon za opis veličine tumora prema TNM klasifikaciji u skupini bez disekcije vrata i s učinjenom disekcijom vrata.**

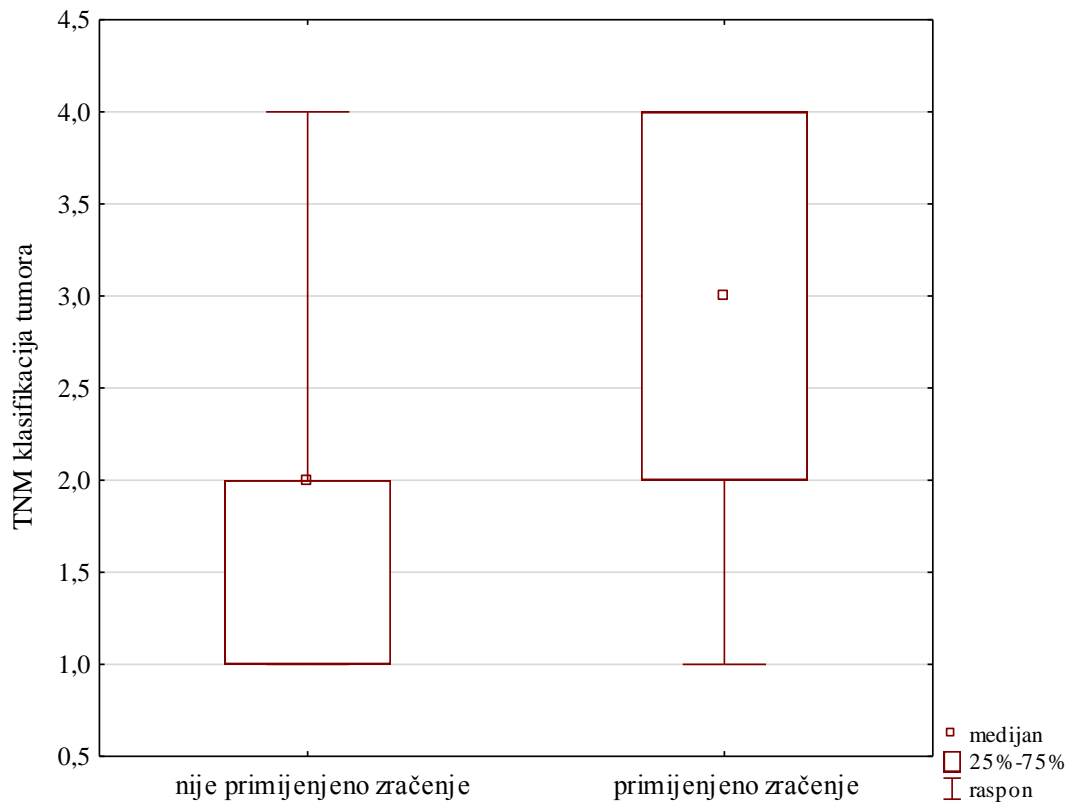
Razina mEGFR-a je bila analizirana i u skupinama s obzirom na primijenjeno postoperativno zračenje. Pokazalo se da nema statistički značajnih razlika (tablica 6.), odnosno rezultat ukazuje na zaključak da razina mEGFR-a nije bila povezana s odlučivanjem o potrebi primjene zračenja (tablica 6., slike 8. i 9.). S druge strane, TNM vrijednosti su bile u skupini kod koje je primijenjeno zračenje marginalno značajno veće nego u skupini gdje nije bila donesena odluka o zračenju.

**Tablica 6. Podaci usporedbe membranskog EGFR-a i TNM klasifikacije u skupinama bez i sa primijenjenim zračenjem. Prikazane su vrijednosti medijana sa interkvartilnim rasponom u skupinama. Vrijednosti su uspoređene Mann-Whitney U testom.**

	Bez zračenja (n=9)	Primijenjeno zračenje (n=11)	Mann-Whitney U test	
			Z	P
IH-mEGFR	3 (1-3)	2 (2-3)	-0,371	0,710
TNM klasifikacija	2 (1-2)	3 (2-4)	-1,72	0,084



**Slika 8. Box-Whisker grafikon za opis statusa membranskog EGFR-a u skupini u kojoj nije primijenjeno zračenje i skupini sa primijenjenim zračenjem.**

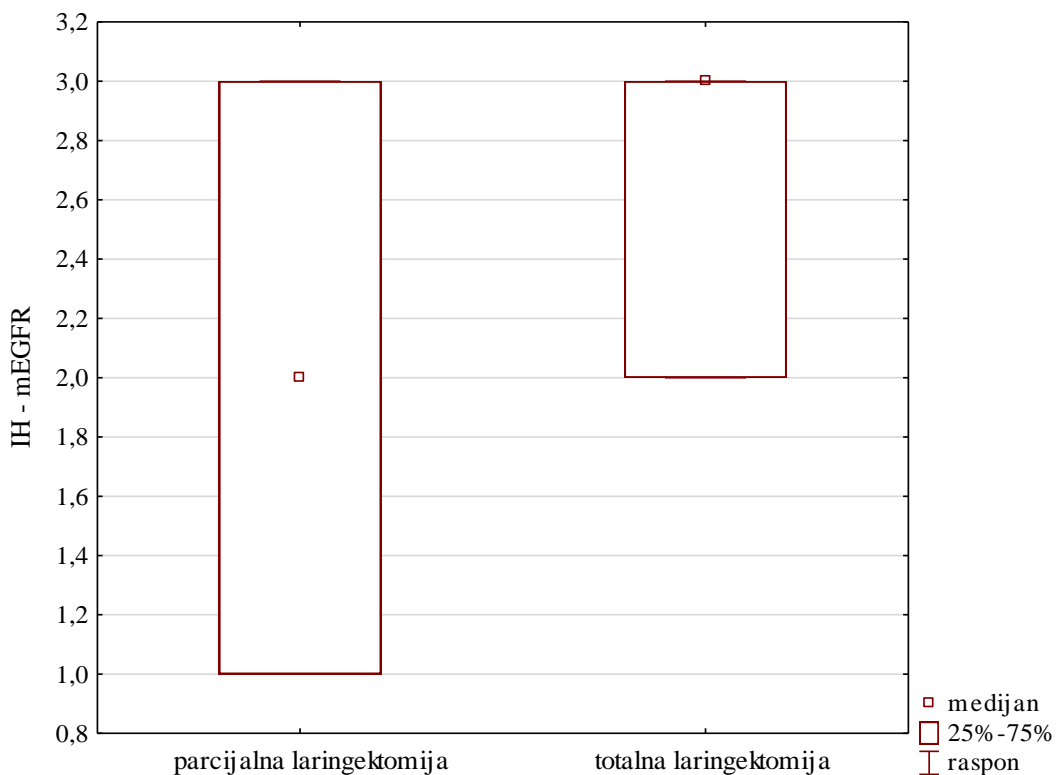


**Slika 9. Box-Whisker grafikon za opis veličine tumora prema TNM klasifikaciji u skupini u kojoj nije primijenjeno zračenje i skupini sa primijenjenim zračenjem.**

S obzirom na vrstu operacije, pokazalo se da je u skupini s učinjenom totalnom laringektomijom razina mEGFR-a bila marginalno statistički značajno viša. TNM vrijednosti pokazale su visoko statistički značajnu razliku među istim skupinama (tablica 7., slike 10. i 11.).

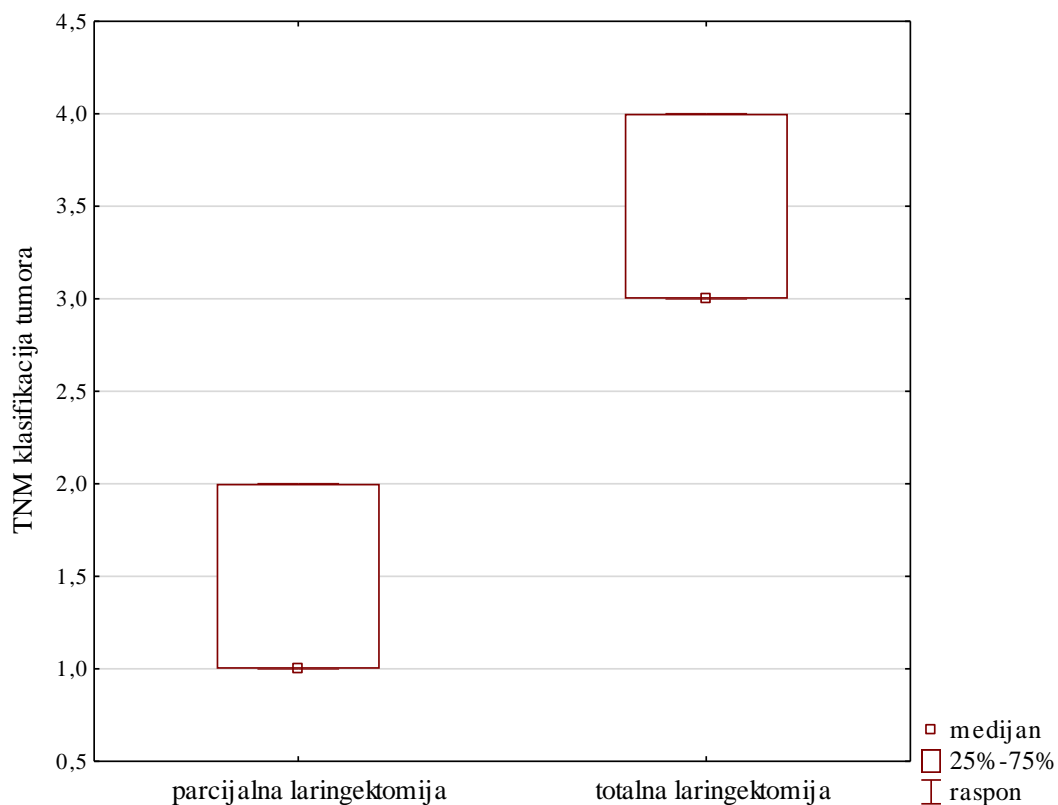
**Tablica 7. Podaci usporedbe mEGFR-a i TNM klasifikacije u skupinama bez operacije te parcijalne i totalne laringektomije. Prikazane su vrijednosti medijana sa interkvartilnim rasponom u skupinama. Vrijednosti su uspoređene Mann Whitney U testom.**

	Parcijalna laringektomija (n=9)	Totalna laringektomija (n=9)	Mann Whitney U test	
			Z	P
IH-mEGFR	2 (1-3)	3 (2-3)	-1,82	0,068
TNM klasifikacija	1 (1-2)	3 (3-4)	-3,65	<0,001



**Slika 10. Box-Whisker grafikon za opis statusa mEGFR-a u skupinama ispitanika prema tipu operacije.**





**Slika 11. Box-Whisker grafikon za opis veličine tumora prema TNM klasifikaciji u skupinama ispitanika prema tipu operacije.**

S obzirom na pojavu recidiva, pokazalo se da ni razina mEGFR-a ni vrijednosti veličine tumora prema TNM klasifikaciji nisu imali statistički značajnu razliku među ispitanicima koji nisu imali recidiv i onima kod kojih se recidiv pojavio (tablica 8.).

**Tablica 8. Podaci usporedbe membranskog EGFR-a i TNM klasifikacije u skupinama bez operacije te parcijalne i totalne laringektomije. Prikazane su vrijednosti medijana sa interkvartilnim rasponom u skupinama. Vrijednosti su uspoređene Mann Whitney U testom.**

	<i>Bez recidiva</i> (n=17)	<i>S recidivom</i> (n=3)	<i>Mann Whitney U test</i>	
			Z	P
IH-mEGFR	2 (1-3)	3 (2-3)	-0,52	0,604
TNM klasifikacija	1 (1-3)	3 (2-4)	-1,31	0,190

### 5.3 Analiza prediktivnih vrijednosti obilježja tumora za preživljenje ispitanika

Višestrukom regresijskom analizom pokušalo se otkriti prediktivnu vrijednost obilježja tumora (TNM klasifikacija, mEGFR vrijednosti, postojanje metastaza) za preživljenje ispitanika. Rezultati su prikazani tablicom 9.

**Tablica 9. Parametri višestruke regresijske analize za preživljenje ispitanika. Prikazani su regresijski koeficijenti ( $b$ ) sa svojom standardnom pogreškom ( $SE(b)$ ), podaci za njihovu statističku analizu ( $t$  i  $p$  vrijednost) te ukupni korelacijski koeficijent ( $R$ ) i prilagođeni  $R^2$ .**

Zavisna varijabla	Prediktori	$b$	$SE(b)$	$t$	$P$	$R$	$R^2$
Preživljenje /mj. (enter model)	IH-mEGFR	1,86	2,70	0,69	0,501	0,55	0,31
	TNM klasifikacija tumora	2,84	2,42	1,17	0,258		
	Postojanje metastaza	-11,57	4,96	-2,33	0,033		
Preživljenje /mj. (backward model)	TNM klasifikacija tumora	3,78	1,96	1,92	0,070	0,54	0,29
	Postojanje metastaza	-12,26	4,79	-2,56	0,020		

Rezultati enter analize (svi prediktori su bili uzeti u obzir) pokazali su da je u predikciji preživljenja od tumorskih obilježja jedino postojanje metastaza imalo samostalno značajnu ulogu. Model je imao dobar ukupni korelacijski koeficijent ( $R=0,55$ ) i odgovarajući  $R^2$  pokazao je da je 31% varijabilnosti u preživljenju objašnjeno varijacijom odabranih prediktora.

Backward analiza (eliminacija neznačajnih doprinosa na razini  $p<0,01$ ) je u rezultatu ostavila samo TNM klasifikaciju i tada je model postigao statističku značajnost ( $F=3,41$ ,  $p=0,05$ ). Model je u tom slučaju imao nešto manji ukupni korelacijski koeficijent ( $R=0,54$ ), a odgovarajući  $R^2$  pokazao je da je 29% varijabilnosti u preživljenju objašnjeno varijacijom odabranih prediktora.

Zbog uočavanja da je postojanje lokalnih metastaza imalo dobru prediktivnu vrijednost za preživljenje ispitanika, napravljena je ROC analiza za otkrivanje kriterijske vrijednosti, osjetljivosti i specifičnosti. Ova analiza potvrdila je predikcijsku vrijednost postojanja metastaza za preživljenje ispitanika ( $ROC=0,804 \pm 0,126$ ,  $p=0,016$ ), a kao kriterijsku vrijednost odredila je preživljenje  $\geq 27$  mjeseci (osjetljivost 67%, specifičnost 86%), što znači da ispitanici koji nemaju metastaze očekivano žive duže od 27 mjeseci.

## 6. Rasprava

EGFR ima važnu ulogu u regulaciji proliferacije tumorskih stanica. Ekspresija EGFR-a povećana je kod planocelularnih karcinoma glave i vrata, osobito kod tumora sa većim TNM stadijem i agresivnijim rastom. Veća razina ekspresije EGFR-a također je povezana s lošijom prognozom bolesti, smanjenim preživljenjem te rezistencijom tumora na radioterapiju. Razumijevanje signalnih puteva EGFR-a važan je korak u dobivanju podataka za postavljanje dijagnoze, odabir adekvatnog liječenja i prevenciju bolesti (29, 30). Brojna istraživanja provedena su kako bi se objasnila uloga EGFR-a i njegovih signalnih puteva u patogenezi različitih tumora kao što su karcinomi malih stanica pluća, karcinomi debelog crijeva i dojke. Međutim, nema puno istraživanja o ulozi EGFR-a kod tumora grkljana.

Jedno od prvih istraživanja u ovom području objavili su M Miyaguchi i sur. 1990. U ovom istraživanju sudjelovalo je 24 ispitanika: 5 sa zdravom sluznicom grkljana, 7 s displazijom, 7 s dobro diferenciranim karcinomom grkljana te 7 sa slabo do umjereno diferenciranim karcinomom grkljana. Povećana ekspresija EGFR-a bila je dokazana kod slučajeva s dobro, slabo i umjereno diferenciranim karcinomom ali nije bila prisutna kod ispitanika sa zdravom sluznicom i displazijom. Rezultati njihovog istraživanja su dokazali prisutnost ekspresije EGFR-a kod tumora grkljana i moguću odsutnost ekspresije EGFR-a kod premalignih lezija. Međutim, definitivni nedostatak ovog istraživanja je mali broj ispitanika (31).

M. Maurizi i sur. 1996. objavili su istraživanje koje je bilo provedeno na 140 bolesnika sa planocelularnim tumorom grkljana. Prema rezultatima njihovog istraživanja razina ekspresije EGFR izravno je povezana s povećanim rizikom od smrtnog ishoda bolesti i recidiva. Petogodišnje preživljenje je bilo 81% kod bolesnika sa EGFR negativnim tumorom grkljana te 25% kod bolesnika sa EGFR pozitivnim tumorom grkljana (32).

Slične rezultate dobili su J. R. Grandis i sur. 1998. Osim razine ekspresije EGFR-a oni su također obratili pažnju na njegov ligand, TGF- $\alpha$ . Prema rezultatima njihovog istraživanja povećana ekspresija EGFR-a i povećana razina TGF- $\alpha$  negativno utječu na preživljenje te povećavaju rizik od recidiva bolesti (33). Rezultati našeg istraživanja pokazuju kako razina mEGFR-a i vrijednosti veličine tumora, prema TNM klasifikaciji, nisu statistički značajno različiti između ispitanika koji nisu imali recidiv i onih kod kojih se recidiv pojavio. Međutim, mali broj ispitanika je nedostatak ovog istraživanja. G. Almadori i sur 1999. su objavili istraživanje o povezanosti ekspresije EGFR-a u primarnom tumoru grkljana sa pojavom metastaza u limfnim čvorovima vrata. Istraživanje se provodilo na 140 bolesnika s tumorom grkljana. Nakon kirurškog liječenja bolesnici su praćeni od 2 do 84 mjeseca. Prema rezultatima bolesnici s ekspresijom EGFR-a imali su veći rizik od pojave metastaza u limfnim čvorovima vrata. Petogodišnje preživljenje bez metastaza bilo je 66% kod ispitanika s ekspresijom EGFR2 te 15% kod ispitanika s ekspresijom EGFR1 (34). U našem istraživanju vrijednosti mEGFR-a kod ispitanika sa metastazama nešto su više od vrijednosti kod ispitanika u kojih nisu nađene metastaze, no razlika nije statistički značajna. S druge strane, veličina tumora prema TNM klasifikaciji statistički se značajno razlikuje u istim skupinama. Međutim, analizom prediktivne vrijednosti tumorskih obilježja (TNM klasifikacija, mEGFR vrijednosti postojanja metastaza) zaključili smo da je kod naših ispitanika jedino postojanje metastaza imalo samostalno značajnu ulogu. Prema rezultatima našeg istraživanja ispitanici koji nemaju metastaze očekivano žive duže od 27 mjeseci. L. Rucci i sur. obratili su pažnju na ekspresiju EGFR-a i p53 kod tumora glotisa kod bolesnika sa T1 i T2 stadijem bolesti prema TNM klasifikaciji te također usporedili ekspresiju tumorskih markera kod zahvaćanja prednje i stražnje komisure. Rezultati njihovog istraživanja objavljeni su 2004. u časopisu „Acta Otolaryngologica“. U istraživanju je sudjelovalo 45 ispitanika: 15 s tumorom koji je zahvatio stražnju komisuru i 30 s tumorom koji je zahvatio prednju komisuru.

Rezultati su pokazali veću učestalost povećane ekspresije EGFR-a kod lokalizacije tumora na stražnjoj komisuri glotisa (10 od 15 ispitanika, 66,7%). Učestalost povećane ekspresije EGFR-a kod lokalizacije tumora na prednjoj komisuri bila je 10/30 ispitanika (33,3%). Međutim nisu bile pronađene značajne razlike u ekspresiji p53 s obzirom na lokalizaciju. Osim toga znanstvenici su istraživali povezanost pušenja cigareta i konzumiranja alkohola s pojavom planocelularnog karcinoma glotisa te su dokazali da je incidencija tumora glotisa češća kod bolesnika koji puše cigarete i konzumiraju alkohol, a osobito je jak njihov sinergistički učinak (35). Naši rezultati, kao i rezultati prijašnjih istraživanja, govore u prilog tome da je karcinom glotisa češći kod populacije koja konzumira cigarete ili alkohol ili i jedno i drugo zajedno. Od 20 ispitanika 75% (15 ispitanika) je konzumiralo cigarete, 75% (15 ispitanika) je konzumiralo alkohol dok je 60% ispitanika konzumiralo i alkohol i cigarete.

Novije studije također su pokazale povezanost povećane ekspresije EGFR-a s lošijom prognozom bolesti, agresivnijim rastom tumora i smanjenim preživljenjem. C. R. Bradford i suradnici 2014. su objavili svoje istraživanje u časopisu „Laryngoscope“. Cilj njihovog istraživanja bio je utvrditi utjecaj ekspresije tumorskih markera na prognozu proširenog karcinoma grkljana. Naime, osim EGFR-a u istraživanje su uključili i druge markere kao što su ciklin D1, CD24, MDM2, PCNA, p53, survivin, Bcl-xL, Bcl-2, BAK. Rezultati ovog istraživanja su pokazali da je povećana ekspresija EGFR-a povezana s lošijom prognozom bolesti odnosno smanjenim preživljenjem te lošijim odgovorom na radioterapiju i kemoterapiju (30).

H. Simsek i sur. istraživali su utjecaj ekspresije EGFR, cerbB2, p16 i p53 na razvoj i prognozu tumora grkljana kod bolesnika u Turskoj te su rezultate svog istraživanja objavili 2014. u časopisu „Turkish Journal of medical science“. U istraživanju je sudjelovalo 92 ispitanika. Povećana ekspresija EGFR-a i cerbB2 bila je utvrđena kod agresivnijih tumora koji su brže napredovali prema kasnijim TNM stadijima.

Osim toga pokazalo se da bolju prognozu imaju tumori glotisa u odnosu na subglotičke i supraglotičke regije koji brže invadiraju limfne žile i metastaziruju u limfne čvorove vrata (36). Također, rezultati našeg istraživanja pokazuju da je veći TNM povezan s većim vrijednostima EGFR-a, odnosno usporedba vrijednosti mEGFR-a prema skupinama tumora pokazuje da je vrijednost mEGFR-a značajno viša u skupini kasnih karcinoma.

Povećana ekspresija EGFR-a također je važan čimbenik za odabir terapije poslije kirurškog liječenja. Rezultati većine studija govore u prilog tome da je povećana ekspresija EGFR-a povezana s lošijim odgovorom pa čak i s rezistencijom na kemoterapiju i radioterapiju. K. Malecki i sur. povezali su EGFR pozitivne tumore sa slabijim odgovorom na indukcijsku kemoterapiju. Kod takvih je bolesnika posljedica slabijeg odgovora na kemoterapiju smanjena mogućnost očuvanja integriteta grkljana te njegovih osnovnih funkcija (37). Istraživanje C. R. Bradford i sur. pokazalo je povezanost povećane ekspresije EGFR-a sa slabijim odgovorom tumora na radioterapiju (30). Međutim postoje i istraživanja koja su pokazala kako povećana ekspresija EGFR-a nije prognostički čimbenik za lošiji rezultat adjuvantne radioterapije. H. Jiang i B. B. Jiang 2009. objavili su svoje istraživanje na bolesnicima u Kini. Osim EGFR-a u istraživanje su uključeni i drugi tumorski markeri kao što su PCNA i p53. Prema rezultatima njihovog istraživanja ne postoji značajna povezanost povećane ekspresije EGFR-a, PCNA i p53 i lošijeg odgovora na adjuvantnu radioterapiju. Znanstvenici također navode da nisu uočili povezanost povećane ekspresije tumorskih markera s lošijom prognozom bolesti i smanjenim preživljenjem (38). U našoj studiji nismo istraživali postoji li povezanost povišene vrijednosti mEGFR-a s lošijim odgovorom na radioterapiju, nego smo pokušali odgovoriti na pitanje; da li ekspresija mEGFR-a povećava potrebu za radioterapijom, totalnom laringektomijom i disekcijom vrata. Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da razina mEGFR-a kod naših ispitanika nije povezana sa odlučivanjem o potrebi primjene zračenja.

S druge strane, TNM vrijednosti su u skupini kod koje je primjenjeno zračenje veće nego u skupini gdje nije primjenjeno zračenje. S obzirom na vrstu operacije, pokazalo se da je kod naših ispitanika, u skupini sa učinjenom totalnom laringektomijom, razina mEGFR-a značajno viša. Istraživanje potrebe za disekcijom vrata kod naših pacijenata pokazalo je da povećane m-EGFR vrijednosti nisu povezane sa povećanom potrebom za disekcijom vrata, ali potreba za disekcijom vrata je veća kod pacijenata sa većim TNM stadijem.

Novija istraživanja su usmjerena na proučavanje odnosa amplifikacije gena sa povećanom ekspresijom EGFR-a. Uloga amplifikacije gena kao uzroka povećane ekspresije EGFR-a nije u potpunosti jasna. T. Braut i sur. 2012. su objavili rezultate studije u kojoj se istražuje genska amplifikacija EGFR-a u atipičnim hiperplazijama glotisa. Genska amplifikacija nije bila pronađena u jednostavnim i abnormalnim hiperplazijama, ali je bila otkrivena u dvije visoko rizične atipične hiperplastične lezije glotisa. Otkrivanje EGFR genske amplifikacije moglo bi stoga pridonjeti u analizi prekanceroznih lezija glotisa te poboljšati mogućnosti liječenja i praćenja takvih lezija (39). Osim membranskog bojenja od važnosti je analiza citoplazmatskog bojenja EGFR-a. Prema rezultatima studije T. Braut i sur. lokalizacija EGFR-a kao i genska amplifikacija mogu imati važnu ulogu u karcinogenozi tumora grkljana. Povećana ekspresija cEGFR-a u kombinaciji sa genskom amplifikacijom mogla bi pridonjeti probiru pacijenata kod kojih bi anti-EGFR terapija mogla biti efektivna, no svakako su potrebna daljnja istraživanja (40). Perspektivan smjer za istraživanje je proučavanje ekspresije nuklearnog EGFR-a. EGFR koji se nalazi u jezgri povezan je s agresivnijim tijekom bolesti, smanjenim preživljenjem, rezistencijom na kemoterapiju, radioterapiju te na terapiju monoklonalnim protutijelima kao što su gefitinib i cetuximab (41).

Ciljana anti-EGFR terapija monoklonalnim protutijelima pokazala se efikasnom kod tumora dojke, karcinoma malih stanica pluća i karcinoma kolona, ali još uvijek ne daje takve rezultate kod terapije karcinoma grkljana te je zato predmet daljnjih istraživanja.



Današnja istraživanja uglavnom su usmjerena na proučavanje terapijskih mogućnosti bolesnika s planocelularnim karcinomima grkljana koji pokazuju prekomjernu ekspresiju EGFR. Monoklono protutijelo cetuximab te inhibitor tirozin kinaze erlotinib pokazali su se kao efikasni lijekovi u terapiji EGFR pozitivnih tumora grkljana (42). Prema rezultatima istraživanja J. A. Bonnera i sur. bolesnici koji su bili na kombiniranoj terapiji cetuximabom i radioterapijom pokazali su veći postotak trogodišnjeg preživljenja (55%) u odnosu na bolesnike koji su primali samo radioterapiju (trogodišnje preživljenje bilo je 45%) (43). Međutim primjena inhibitora tirozin kinaze erlotiniba nije se pokazala efikasnom. U istraživanju na 205 ispitanika nije postojala značajna razlika u preživljenju bolesnika kod kojih se koristila kombinirana terapija cisplatinom, radioterapija te erlotinib u odnosu na bolesnike koji su primali kemoterapiju i radioterapiju (42).

Ovo područje svakako zahtijeva daljnja istraživanja kako bi se povećalo preživljenje te kvaliteta života bolesnika sa EGFR pozitivnim tumorom grkljana.

## 7. Zaključci

1. Veći TNM stadij je povezan s većim vrijednostima m-EGFR-a.
2. Vrijednosti mEGFR-a kod ispitanika sa metastazama su nešto više od vrijednosti kod ispitanika u kojih nisu nađene metastaze. S druge strane, veličina tumora prema TNM klasifikaciji se značajno razlikuje u istim skupinama.
3. Razina m-EGFR-a nije povezana sa odlučivanjem o potrebi primjene zračenja, ali TNM vrijednosti su u skupini kod koje je primjenjeno zračenje značajno veće nego u skupini gdje nije primjenjeno zračenje.
4. Uzevši u obzir vrstu operacije, pokazalo se da su u skupini sa učinjenom totalnom laringektomijom razina m-EGFR-a i TNM stadij značajno veći.
5. Razina m-EGFR-a nije povezana sa odlučivanjem o potrebi za disekcijom vrata, ali TNM vrijednosti su u skupini kod koje je provedena disekcija vrata značajno veće nego u skupini gdje nije provedena disekcija vrata.
6. Pokazalo se da razina membranskog EGFR-a i vrijednosti veličine tumora, prema TNM klasifikaciji, nisu značajno različiti među ispitanicima koji nisu imali recidiv i onima kod kojih se recidiv pojavio.
7. Prekomjerna ekspresija mEGFR-a može biti prisutna kod karcinoma glotisa te je povezana sa lošijom prognozom i smanjenim preživljenjem. U svrhu poboljšanja mogućnosti terapije i kvalitete života bolesnika potrebna su daljnja istraživanja.

## 8. Sažetak

**Cilj:** Ciljevi ovog istraživanja bile su usporediti status mEGFR-a sa veličinom tumora glotisa prema TNM klasifikaciji, istražiti imaju li pacijenti kod kojih su prisutne metastaze više ili manje izražen mEGFR, te odrediti da li veće vrijednosti mEGFR-a povećavaju potrebu za disekcijom vrata i zračenjem, ako i da, utvrditi izvode li se češće totalne zahvate, laringektomije kod viših vrijednosti mEGFR-a.

**Ispitanici i metode:** Ovo je retrospektivno istraživanje u koje je bilo uključeno 20 ispitanika u dobi od 53 do 81 godina koji su se liječili zbog planocelularnog karcinoma glotisa u KBC-u Rijeka. Ekspresija mEGFR-a u tumorskim stanicama određivala se pomoću imunohistokemije.

**Rezultati:** Rezultati su pokazali da je veći TNM povezan s većim vrijednostima mEGFR-a. Usporedba vrijednosti mEGFR-a prema skupinama tumora, pokazala je da je vrijednost mEGFR-a bila statistički značajno viša kod kasnih karcinoma. Vrijednosti mEGFR-a kod ispitanika sa metastazama bile su više od vrijednosti kod ispitanika bez metastaza, no razlika nije bila statistički značajna. Razina m-EGFR-a nije bila povezana sa odlučivanjem o potrebi za disekcijom vrata. S obzirom na vrstu operacije, pokazalo se da je u skupini s učinjenom totalnom laringektomijom razina mEGFR-a bila je statistički značajno viša. Razina mEGFR-a nije bila povezana s odlučivanjem o potrebi primjene zračenja.

**Zaključak:** Ekspresija mEGFR-a povezana je sa lošijom prognozom bolesti te su potrebna daljnja istraživanja kako bi se poboljšale mogućnosti terapije, preživljenje te kvaliteta života bolesnika.

**Ključne riječi:** *biomarkeri tumora grkljana, mEGFR, tumor grkljana, terapija tumora grkljana, TNM stadij*

## 9. Summary

**Aim:** The aims of this study were to compare mEGFR status with glottic tumor TNM classification, to determine whether patients who present metastases have more or less expressed mEGFR, and to determine whether higher expression of mEGFR increases the need for neck dissection and radiation, if yes, to determine whether total laryngectomy is more often performed due to increased mEGFR.

**Patients and Methods:** This is a retrospective study which included 20 patients aged 53-81 years who were treated for glottic squamous cell carcinoma at the Clinical Hospital Center Rijeka. mEGFR expression level in tumor cells was measured by immunohistochemistry.

**Results:** The results showed that the higher TNM was associated with higher expression of mEGFR. Comparison of mEGFR expression with tumor groups showed that mEGFR expression was significantly higher in advanced glottic cancer. mEGFR expression in patients with metastases was higher than mEGFR expression in patients without metastases, but the difference was not statistically significant (due to the small sample size further research is needed). m-EGFR expression was not associated with the decision if neck dissection is needed. Considering the type of operation, it was obvious that in the group with undergone total laryngectomy mEGFR expression was significantly higher. mEGFR expression was not associated with the decision if radiation is needed.

**Conclusion:** The expression of mEGFR is associated with a worse prognosis and further research is needed in order to improve the abilities of treatment, survival and quality of life in patients with glottic cancer.

**Key words:** *laryngeal tumor biomarkers, mEGFR, laryngeal cancer, laryngeal cancer therapy, TNM stage*

## 10. Literatura

1. Bumber Ž, Katić V, Nikšić-Ibančić M, Pegan B, Petric V, Sprem N i sur. Otorinolaringologija, Zagreb, 2004: 251 – 279.
2. Chatziavramidis A, Tsinaslanidou Z, Valeri R i sur. Brush Cytology with Immunocytochemical Evaluation of VEGF Expression versus Biopsy in Clinically Precancerous Laryngeal Lesions: Can We Diagnose Laryngeal Cancer Only with Brush Cytology? Analytical Cellular Pathology 2015; 2015: 1 – 8.
3. Laryngeal cancer. Estimated incidence, mortality and prevalence for both sexes, 2012. Available at: <http://eco.iarc.fr/eucan/Cancer.aspx?Cancer=17>
4. Incidencija raka u Hrvatskoj 2013. Bilten br. 38. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Registar za rak. Zagreb 2015: 19-24.
5. Lampri ES, Chondrogiannis G, Ioachim E i sur. Biomarkers of head and neck cancer, tools or a gordian knot? Int J Clin Exp Med 2015; 8(7): 10340-10357.
6. Vaezi MF, Sepi M, Qadeer MA i sur. Laryngeal Cancer and Gastroesophageal Reflux Disease: A Case-Control Study. The American Journal of Medicine 2006; 119 (9): 768 – 776.
7. Deganello A, Meccariello G, Parrinello G i sur. Laryngopharyngeal Reflux and Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. Austin J Cancer Clin Res 2015; 2(1): 1 – 5.
8. Wang Y, Springer S, Mulvey CL i sur. Detection of somatic mutations and HPV in the saliva and plasma of patients with head and neck squamous cell carcinomas. Sci Transl Med 2015; 7: 1 – 16.
9. Hakeem AH, Hakeem IH, Pradhan SA. Premalignant lesions of the larynx and their management. Otorhinolaryngology clinics: international journal 2010; 2 (3): 161 – 165.

10. Santi I, Kroll LE, Dietz A i sur. Occupation and educational inequalities in laryngeal cancer: the use of a job index. *BMC Public Health* 2013; 13: str. 1 – 10.
11. Simard EP, Pfeiffer RM, Engels EA. Spectrum of cancer risk late after AIDS in the United States. *Arch Intern Med* 2010; 170(15): 1337–1345. Preuzeto sa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
12. Marur S, Forastiere AA. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. Symposium on neoplastic hematology and medical oncology. *Mayo Clin Proc.* March 2016: 386 – 396.
13. Patel SG., Shah JP. TNM Staging of Cancers of the Head and Neck: Striving for Uniformity Among Diversity. *A Cancer Journal for Clinicians* 2005; 55: 242 – 258.
14. Laccourreye O, Malinvaud D, Ménard M i sur. Otorhinolaryngologists' personal treatment preferences (total laryngectomy or laryngeal preservation) when faced with advanced stage laryngeal cancer. *European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck diseases* 2014; 131: 339–343.
15. Serra A, Di Mauro P, Spataro D i sur. Post-laryngectomy voice rehabilitation with voice prosthesis: 15 years experience of the ENT Clinic of University of Catania. Retrospective data analysis and literature review. *Acta otorhinolaryngologica italica* 2015; 35: 412-419.
16. Teymoortash A, Werner JA. Current advances in diagnosis and surgical treatment of lymph node metastasis in head and neck cancer. *GMS Current Topics in Otorhinolaryngology - Head and Neck Surgery* 2012; 11: 1 – 23.
17. Issa MR, Samuels SE, Bellile E i sur. Tumor Volumes and Prognosis in Laryngeal Cancer *Cancers* 2015; 7: 2236–2261.
18. Fletcher CDM, ur. *Diagnostic Histopathology of tumors.* London: Churchill Livingstone 2000: 150-238.

19. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, ur. World Health Organization Classification of tumors. Pathology and genetics of Head and Neck Tumors. Lyon: IARC Press 2005: 107-208.
20. Grandis JR, Sok JC. Signaling through the epidermal growth factor receptor during the development of malignancy. *Pharmacol Ther.* 2004; 102(1): 37–46.
21. Warner BM, Grandis J. Emerging Molecular Targets in the Treatment of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Targeting oral cancer,* 2016: 163 – 195.
22. Kontos CK, Adamopoulos PG, Scorilas A. Molecular Biomarkers of Laryngeal Cancer. *Biomarkers in Cancer, Biomarkers in Disease: Methods, Discoveries and Applications,* 2015: 891 – 919.
23. Szentkúti G, Dános K, Brauswetter D, Kiszner i sur. Correlations Between Prognosis and Regional Biomarker Profiles in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Pathol. Oncol. Res.* 2015; 21: 643–650.
24. Useros JM, Garcia-Foncillas J. The challenge of blocking a wider family members of EGFR against head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncology* 2015; 51: 423–430.
25. Li Z, Yang Z, Passaniti A i sur. A positive feedback loop involving EGFR/Akt/mTORC1 and KK/NF- $\kappa$ B regulates head and neck squamous cell carcinoma proliferation. *Oncotarget, Advance Publications* 2016: 1 – 15.
26. Singh T, Gupta NA, Xu S i sur. Honokiol inhibits the growth of head and neck squamous cell carcinoma by targeting epidermal growth factor receptor. *Oncotarget* 2015; 6(25): 21268 – 21282.

27. Rödel F, Balermipas P. Anti-epidermal growth factor receptor immunotherapy in combination with cisplatin chemoradiation for patients with advanced head and neck carcinoma—biological and clinical limitations of the triple treatment. *Transl Cancer Res* 2016; 1 – 4.
28. Kontić M, Milovanović J, Čolović Z i sur. Epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in patients with laryngeal squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2015; 272(2): 401 – 405.
29. Nijkamp MM, Span PN, Terhaard CHJ i sur. Epidermal growth factor receptor expression in laryngeal cancer predicts the effect of hypoxia modification as an additive to accelerated radiotherapy in a randomised controlled trial. *European Journal of Cancer* 2013; 49: 3202–3209.
30. Bradford C R, Kumar B, Bellile E i sur. Biomarkers in Advanced Larynx Cancer. *Laryngoscope* 2014; 124(1): 179–187.
31. Miyaguchi M, Olofsson J, Hellquist HB. Expression of Epidermal Growth Factor Receptor in Laryngeal Dysplasia and Carcinoma. *Acta Oto-Laryngologica* 1990; 110(3 – 4): 319 – 313.
32. Maurizi M, Almadori G, Ferrandina G i sur. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in laryngeal squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer* 1996; 74: 1253 – 1257.
33. Grandis JR, Melhem MF, Gooding WE i sur. Levels of TGF- $\alpha$  and EGFR Protein in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Patient Survival. *Journal of the National Cancer Institute* 1998; 90 (11): 824 – 832.
34. Almadori G, Cadoni G, Galli J i sur.. Epidermal growth factor receptor expression in primary laryngeal cancer: an independent prognostic factor of neck node relapse. *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)* 1999; 84: 188–191.



35. Rucci L, Bocciolini C, Franchi A i sur. Epidermal growth factor receptor and p53 Expression in T1 – T2 glottic cancer involving the anterior or posterior commissure. *Acta Otolaryngol* 2004; 124: 102 – 106.
36. Simsek H, Han U, Onal B i sur. The expression of EGFR, CerbB2, p16, and p53 and their relationship with conventional parameters in squamous cell carcinoma of the larynx. *Turkish journal of medical science*, Vol 44, 2014; 411 – 416.
37. Małeckki K, Głinski B, Mucha-Małecka A i sur. Prognostic and predictive significance of p53, EGFr, Ki-67 in larynx preservation treatment. *Reports of practical oncology and radiotherapy* 2010; 15: 87 – 92.
38. Jiang H, Jiang B B. P53, epidermal growth factor receptor and proliferating cell nuclear antigen in laryngeal squamous cell carcinoma are not predictive markers for the effect of adjuvant radiotherapy. *Acta Oto-Laryngologica* 2009; 129: 101 – 107.
39. Braut T, Kujundžić M, Vukelić J, Manestar D, Krstulja M, Starčević R, Grahovac B. EGFR Gene Amplification in Atypical Hyperplasia, *Coll. Antropol.* 2012; 36 (2): 87–91
40. Braut T, Krstulja M, Rukavina K, Jonjić N, Kujundžić M, Manestar D, Katunarić M M, Manestar D. Cytoplasmic EGFR staining and gene amplification in glottic cancer: a better indicator of EGFR-driven signaling? *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2014; 22(9): 674 – 680.
41. Brand TM, Iida M, Luthar N i sur. Nuclear EGFR as a molecular target in cancer. *Radiother Oncol* 2013; 108(3): 370 – 377.
42. UpToDate. Brockstein B E, Vokes E E, Eisbruch A. Locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: approaches combining chemotherapy and radiation therapy. Available at: <http://www.uptodate.com/>. Accessed: 15.05.2016

43. Bonner J A, Harari P M, Giralt J i sur. Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival The Lancet oncology 2009; 11 (1): 21-28.

## 11. Životopis

Svetlana Imbrishich rođena je u Petrozavodsku, Rusiji, 9. rujna 1984. godine. Osnovno i srednje obrazovanje stječe u jezičnoj gimnaziji br. 17 u Petrozavodsku. U isto vrijeme 1991. godine upisuje te 1998. završava glazbenu školu K. E. Rautio u Petrozavodsku (smjer klavir). 2001. godine upisuje povijesni fakultet Sveučilišta u Petrozavodsku, koji završava 2008. (smjer povijest Finske i skandinavskih zemalja). Tijekom studiranja zamrzava 2 godine koje provodi na razmijeni u Stockholmu gdje studira skandinavsku lingvistiku, povijest, kulturu, mitologiju i arheologiju.

2010. upisuje Studij medicine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci. Tijekom studiranja sudjeluje kao aktivni sudionik na 5. i 6. studentskim kongresima neuroznanosti „Neuri“, na 6. i 7. studentskim kongresima „Prehrana i klinička dijetoterapija“, na 12. kongresu „Diatransplant“, na kongresu studenata i mladih doktora „Medicon“ u Tuzli (2016.) te na internacionalnom studentskom kongresu u Grazu (2016.). Tečno govori ruski, švedski i engleski, bazično znanje finskog jezika.