

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Novica I. Boričić

DIJAGNOSTIČKI ZNAČAJ EKSPRESIJE
CITOKERATINA VISOKE MOLEKULARNE
TEŽINE I NISKE MOLEKULARNE TEŽINE U
SKVAMOCELULARNOM KARCINOMU
LARINKSA I BENIGNIM LEZIJAMA LARINKSA

Doktorska disertacija

Beograd, 2023

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Novica I. Boričić

UTILITY OF HIGH MOLECULAR WEIGHT AND
LOW MOLECULAR WEIGHT CYTOKERATINS IN
DIAGNOSTICS OF LARYNGEAL SQUAMOUS
CELL CARCINOMA AND BENIGN LARYNGEAL
LESIONS

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023

Mentor: Prof. dr Tatjana Terzić, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu.

Članovi Komisije:

1. Prof. dr Jovica Milovanović, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu.
2. Prof. dr Biserka Vukomanović Đurđević, Medicinski fakultet Vojnomedicinske Akademije, Univerzitet odbrane u Beogradu.
3. Prof. dr Duško Dunderović, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu.

Datum odbrane:

Zahvaljujem se svom mentoru, prof. dr Tatjani Terzić koja mi je mudrim savetima pomogla da napišem doktorsku disertaciju, pomogla da osmislim temu rada koji je objavljen iz doktorske disertacije i učestvovala u pisanju rada u hodu ispravljajući sve potencijalne greške. Posebnu zahvalnost dugujem svom ocu, prof. dr Ivanu Boričiću, koji je bio uz mene, zajedno sa mnom pregledao sve slučajeve koji su uključeni u doktorat i objavljen rad, kontrolisao imunohistohemijska bojenja, pomogao mi da odaberem reprezentativne slučajeve za slikanje i svojim znanjem me vodio kroz pisanje disertacije i rada. Zahvaljujem se prof. dr Jovici Milovanoviću i prof. dr Aleksandru Triviću koji su mi obezbedili materijal za pisanje rada i doktorske disertacije i svojim savetima pomogli da se rad objavi i disertacija privede kraju. Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Ivanu Soldatoviću, koji je uradio statističku analizu podataka, pomogao mi da izdvojim najznačajnije rezultate i svojim znanjem i iskustvom mi pomogao da rešim sve nedoumice koje sam imao oko pisanja rada i disertacije i objavljivanja rada. Bez njihovog usmeravanja, podrške, i pomoći, ne bih stigao do cilja.

Ogromnu zahvalnost dugujem kolektivu Instituta za patologiju, naročito laborantkinji Gordani Martić koja mi je brzo, predano i savesno, u svoje slobodno vreme, imunohistohemijski obojila sve pločice.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici, kćerki Maši i sinu Saši koji me svakodnevno čine boljim čovekom, koji su mi dali snagu i motiv da sve što započnem i završim, da bih mogao da budem posvećen onome što najviše volim – da budem njihov tata. Supruzi Danijeli hvala na ogromnom strpljenju, posvećenosti i velikoj ljubavi koja mi je bila vetar u leđa. Zahvaljujem se mojoj mami Zdenki i bratu Mladenu koji su uvek bili tu za mene, i sa mnogo razumevanja pružali безусловnu podršku.

Maslov doktorske disertacije: DIJAGNOSTIČKI ZNAČAJ EKSPRESIJE CITOKERATINA VISOKE MOLEKULARNE TEŽINE I NISKE MOLEKULARNE TEŽINE U SKVAMOCELULARNOM KARCINOMU LARINKSA I BENIGNIM LEZIJAMA LARINKSA.

Apstrakt: Ne postoji pouzdan imunohistohemijski (IHH) marker za dijagnostikovanje skvamocelularnog karcinoma larinksa (SCC) ili dijagnostikovanje i gradiranje displazija larinksa. Cilj našeg rada je da ispitamo dijagnostičku vrednost CK8, CK10, CK13 i CK17 u diferencijalnoj dijagnostici SCC larinksa, displazija larinksa i benignih lezija larinksa; da ispitamo korisnost navedenih IHH markera u određivanju statusa linija resekcije; da ispitamo korelaciju ovih markera sa stadijumom tumora i sa prisustvom metastaza SCC u limfnim čvorovima. U ovu retrospektivnu studiju su bila uključena 163 pacijenta, hirurški lečena u periodu između 2010. i 2020. godine, sa postavljenim dijagnozama: polipa larinksa, papiloma larinksa, papilarne keratoze larinksa, displazija larinksa niskog i visokog gradusa i SCC larinksa. Obavljeno je imunohistohemijsko bojenje monoklonskim antitelima na CK8, CK10, CK13 i CK17. Dva iskusna patologa su semikvantitativno skorovala IHH pozitivnost. Analiziran je dijagnostički i prognostički značaj imunohistohemijskih markera. CK13 se pokazao kao dijagnostički značajan marker za razlikovanje SCC larinksa od benignih lezija larinksa (senzitivnost 100,0%, specifičnost 67,3%) kao i za razlikovanje displazija larinksa od benignih lezija larinksa (senzitivnost 100,0%, specifičnost 67,3%). CK17, sa senzitivnošću od 78,3% i specifičnošću od 67,3%, pokazao se kao dijagnostički značajan za razlikovanje SCC larinksa od displazija larinksa. CK10, sa senzitivnošću od 80,0% i specifičnošću od 61,1%, može se koristiti za razlikovanje displazija niskog gradusa od displazija visokog gradusa. Gubitak ekspresije CK13 je pouzdan dijagnostički alat za određivanje statusa linija resekcije. Nije uočena korelacija između ekspresije CK8, CK10, CK13 i CK18 i stadijuma tumora i prisustva metastaza u limfnim čvorovima. Uočena je negativna korelacija između ekspresije CK17 i gradusa tumora. Uočena je korelacija između ekspresije CK17 i CK8 i dubine invazije tumora.

Ključne reči: Skvamocelularni karcinoma larinksa, displazija larinksa, polip larinksa, papilom larinksa, papilarna keratoza larinksa, citokeratini, imunohistohemija, linije resekcije.

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Biologija tumora i oksidativna oboljenja

UDK br:

Title of doctoral dissertation: UTILITY OF HIGH MOLECULAR WEIGHT AND LOW MOLECULAR WEIGHT CYTOKERATINS IN DIAGNOSTICS OF LARYNGEAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA AND BENIGN LARYNGEAL LESIONS

Abstract: There are no reliable immunohistochemical markers for diagnosing laryngeal squamous cell carcinoma (SCC) or diagnosing and grading laryngeal dysplasia. We aimed to evaluate the diagnostic utility of CK8, CK10, CK13, and CK17 in benign laryngeal lesions, laryngeal dysplasia, and laryngeal SCC; to evaluate diagnostic utility of these markers in determining resection margins, and to examine if correlation exist between expression of these IHC markers and tumor stage and metastasis of SCC in lymph nodes. This retrospective study included 163 patients diagnosed with laryngeal papilloma, laryngeal polyps, keratosis papillaris laryngis, laryngeal dysplasia, and laryngeal SCC who underwent surgical treatment between 2010 and 2020. Immunohistochemistry (IHC) was carried out using specific monoclonal antibodies against CK8, CK10, CK13, and CK17. Two experienced pathologists performed semi-quantitative scoring of IHC positivity. The diagnostic and prognostic significance of the markers was analyzed. CK13 showed a sensitivity of 100% and a specificity of 67.3% for distinguishing between laryngeal SCC and benign lesions. CK17 showed a sensitivity of 78.3% and specificity of 57.1% for the detection of laryngeal SCC vs. laryngeal dysplasia. CK10 showed a sensitivity of 80.0% for discriminating between low-grade and high-grade dysplasia, and a specificity of 61.1%. Loss of CK13 expression is a reliable diagnostic tool for determining resection lines. There is no correlation between CK8, CK10, CK13 and CK8 expression and tumor stage. There is no correlation between CK8, CK10, CK13 and CK17 expression and metastasis in lymph nodes.

Keywords: Laryngeal carcinoma, Laryngeal dysplasia, Laryngeal polyp, Laryngeal papilloma, Keratosis papillaris laryngis, Cytokeratins, Immunohistochemistry, Resection margins.

Scientific field: Medicine.

Precise scientific field: Tumor biology and oxidative diseases

UDK number:

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. ISTORIJSKI ASPEKT TUMORA LARINKSA.....	1
1.2. FUNKCIONALNA ANATOMIJA I EMBRIOLOGIJA LARINKSA	3
1.2.1. Embriologija larinksa	4
1.2.2. Histologija larinksa.....	4
1.3. LEZIJE I TUMORI LARINKSA	5
1.3.1. Polip larinksa	5
1.3.2. Papilomi larinksa	7
1.3.3. Papilarna keratoza larinksa.....	10
1.3.4. Displazija larinksa	12
1.3.5. Skvamocelularni karcinom larinksa	20
1.4. Citokeratini	27
1.4.1. Citokeratin 8	27
1.4.2. Citokeratin 10	28
1.4.3. Citokeratin 13	28
1.4.4. Citokeratin 17	29
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	31
3. MATERIJAL I METODE	32
3.1. Selekcija ispitanika i odabir materijala:.....	32
3.2. Histološka obrada tkiva	32
3.3. Imunohistohemijska obrada tkiva.....	33
3.4. Statistička obrada podataka	36
4. REZULTATI	38
4.1. SLAGANJE OCENJIVAČA	40
4.1.1. Slaganje ocenjivača za CK8	40
4.1.2. Slaganje ocenjivača za CK10	40
4.1.3. Slaganje ocenjivača za CK13	41
4.1.4. Slaganje ocenjivača za CK17	42
4.2. IMUNOHISTOHEMIJSKA EKSPRESIJA CK8, CK10, CK13 I CK17 U NORMALNOM EPITELU LARINKSA, BENIGNIM LEZIJAMA LARINKSA, DISPLAZIJAMA LARINKSA I SKVAMOCELULARNOM KARCINOMU LARINKSA	43
4.2.1. Imunohistohemijska ekspresija CK8, CK10, CK13 i CK17 u normalnom epitelu larinksa.....	43
4.2.2. Imunohistohemijska ekspresija CK8, CK10, CK13 i CK17 u benignim lezijama larinksa	49
4.2.3. Imunohistohemijska ekspresija CK8, CK10, CK13 i CK17 u polipima larinksa.....	50

4.2.4. Imunohistohemijska ekspresija CK8, CK10, CK13 i CK17 u papilomima larinksa.....	56
4.2.5. Imunohistohemijska ekspresija CK8, CK10, CK13 i CK17 u papilarnoj keratozi larinksa.....	62
4.2.6. Imunohistohemijska ekspresija CK8, CK10, CK13 i CK17 u displazijama larinksa.....	68
4.2.7. Imunohistohemijska ekspresija CK8, CK10, CK13 i CK17 u displazijama larinksa niskog gradusa..	68
4.1.8. Imunohistohemijska ekspresija CK8, CK10, CK13 i CK17 u displazijama larinksa visokog gradusa	74
4.2.9. Imunohistohemijska ekspresija CK8, CK10, CK13 i CK17 u skvamocelularnom karcinomu larinksa	80
4.3. DIJAGNOSTIČKA VREDNOST CK8, CK10, CK13 I CK17 U DIFERENCIJALNOJ DIJAGNOSTICI SKVAMOCELULARNOG KARCINOMA LARINKSA I BENIGNIH LEZIJA LARINKSA.....	88
4.4. DIJAGNOSTIČKA VREDNOST CK8, CK10, CD13 I CK17 U DIFERENCIJALNOJ DIJAGNOSTICI DISPLAZIJA LARINKSA I BENIGNIH LEZIJA LARINKSA.....	90
4.5. DIJAGNOSTIČKA VREDNOST CK8, CK10, CD13 I CK17 U DIFERENCIJALNOJ DIJAGNOSTICI DISPLAZIJA LARINKSA NISKOG GRADUSA I DISPLAZIJA LARINKSA VISOKOG GRADUSA.....	92
4.6. DIJAGNOSTIČKA VREDNOST CK8, CK10, CD13 I CK17 U DIFERENCIJALNOJ DIJAGNOSTICI DISPLAZIJA LARINKSA I SKVAMOCELULARNOG KARCINOMA LARINKSA .	94
4.7. POVEZANOST EKSPRESIJE CITOKERATINA CK8, CK10, CK13 I CK17 U SKVAMOCELULARNOM KARCINOMU LARINKSA SA GRADUSOM TUMORA	96
4.8. POVEZANOST EKSPRESIJE CITOKERATINA CK8, CK10, CK13 I CK17 U SKVAMOCELULARNOM KARCINOMU LARINKSA SA STADIJUMOM TUMORA.....	98
4.9. POVEZANOST EKSPRESIJE CITOKERATINA CK8, CK10, CK13 I CK17 U SKVAMOCELULARNOM KARCINOMU LARINKSA SA PRISUSTVOM METASTAZA U LIMFNIM ČVOROVIMA	100
4.10. POVEZANOST EKSPRESIJE CITOKERATINA CK8, CK10, CK13 I CK17 U SKVAMOCELULARNOM KARCINOMU LARINKSA SA DUBINOM INVAZIJE TUMORA	102
5. DISKUSIJA.....	104
6. ZAKLJUČCI:	110
7. LITERATURA.....	112

1. UVOD

Skvamocelularni karcinom larinksa je drugi po učestalosti maligni tumor respiratornog trakta, odmah iza karcinoma pluća (1, 2) i predstavlja petinu svih malignih tumora regije glave i vrata (3). Sirova stopa oboljevanja od karcinoma larinksa u svetu je 4,1 na 100000 za muškarce i 0,63 na 100000 za žene (4). Prema poslednjim dostupnim podacima, za 2014. godinu, u centralnoj Srbiji je sirova stopa oboljevanja za muškarce bila 3,3 na 100000, a za žene 0,5 na 100000. U 2014. godini, u centralnoj Srbiji, kod muškaraca je postavljeno 400 patohistoloških dijagnoza karcinoma larinksa, od 460 prijavljenih slučajeva (87%), a kod žena je postavljena 51 patohistološka dijagnoza skvamocelularnog karcinoma larinksa, od ukupno prijavljenih 61 slučaja (83%) (5).

Dijagnoza skvamocelularnog karcinoma larinksa se postavlja uzimanjem biopsije promene. Dijagnoza se u najvećem broju slučajeva postavlja na osnovu morfoloških karakteristika, pri čemu se koristi bojenje hematoksilin-eozin (HE), ali postoji određeni broj dijagnostički vrlo zahtevnih slučajeva. Diferencijalno dijagnostički tada u obzir dolaze sledeće lezije: displazija niskog i visokog gradusa, papilom, papilomatoza, papilarna keratoza larinksa. Neophodno je pravovremeno postaviti pouzdanu i preciznu dijagnozu bilo maligne, bilo benigne lezije, jer se terapijski pristup značajno razlikuje kao i kvalitet života nakon terapije. Kod pacijenata sa tumorom u stadijumu T1 i T2 mogu se primeniti konzervacione hirurške tehnike da bi se očuvala funkcija govora, dok se kod pacijenata sa tumorom u stadijumu T3 i T4 primenjuju agresivne hirurške tehnike poput laringektomije u kombinaciji sa radioterapijom i/ili hemioterapijom. Preživljavanje pacijenata zavisi od stadijuma tumora. Šanse za preživljavanje su veće kod tumora koji su otkriveni u ranoj fazi (T1 i T2), uz stopu izlečenja do 80-90%. Prognoza je lošija kod viših stadijuma tumora, pa preživljavanje pada na 40% kod pacijenata u stadijumu IV bolesti na prezentaciji. Nakon agresivnih terapijskih pristupa se značajno smanjuje i kvalitet života pacijenata, prvenstveno zbog disfonije (6)

Primena odgovarajućih imunohistohemijskih markera za postavljanje pouzdane i pravovremene dijagnoze skvamocelularnog karcinoma larinksa je od suštinske važnosti za pacijenta zbog započinjanja adekvatne terapije na vreme i očuvanja kvaliteta života. Trenutno ne postoji imunohistohemijski obrazac koji je pouzdan za dijagnostiku karcinoma larinksa, a imunohistohemijska bojenja nisu detaljno ispitivana u benignim lezijama larinksa.

1.1. ISTORIJSKI ASPEKT TUMORA LARINKSA

Tumori larinksa se pominju prvi put u antičkom dobu (7). Asklepijad iz Bitinije (124-40 BC) je bio prvi antički lekar koji je predložio laringektomiju, ili traheotomiju kod pacijenata koje je gušila tumorska masa u larinksu (8). Italijanski lekar Marcellus Donatus je u šesnaestom veku u svojim delima opisao izrasline u larinksu nalik bradavicama. Tvrdio je da opisane izrasline nisu česte u populaciji (7). Francuski lekar Joseph Lieutad (1703-1780.) prvi je u istoriji tumore larinksa, koje je opisao kao velike polipoidne tvorevine, proglasio za uzrok smrti (9). Sve do 19. veka, tumori larinksa su se retko pominjali. Infektivne bolesti, prvenstveno krup i difterija su bile najzastupljenije u patologiji larinksa (10). Prosečan životni vek je bio suviše kratak da bi se razvila neoplazma larinksa, a medicinske tehnike nisu bile dovoljno razvijene ni za dijagnostiku, ni za terapiju tumora larinksa (10). Ryland je u svom delu "Bolesti i povrede traheje i larinksa" iz 1837. godine od ukupno 300 stranica samo 8 stranica posvetio malignim i benignim tumorima larinksa (10). Trousseau i Belloc su 1839. godine objavili knjigu "Laryngeal Phtisis". U svom delu su definisali pojmove "phtisis" i sarkom larinksa. Termin "Phtisis" su definisali kao hronični poremećaj larinksa koji može dovesti do pojave tuberkuloze ili smrti (10). Termin sarkom larinksa su koristili za leziju za koju nisu mogli da utvrde da

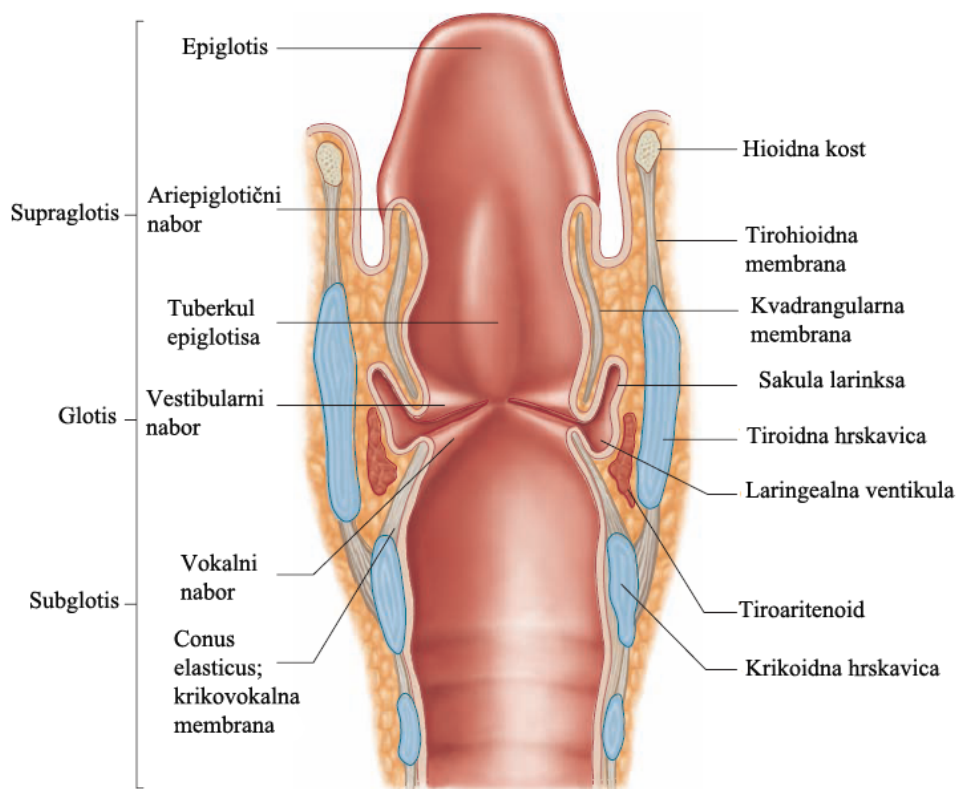
li je benigna ili maligna po biološkom ponašanju (10). Ova dva naučnika su prvi shvatili da je klasifikacija lezija na osnovu makroskopskih osobina neadekvatna i da treba razviti novi način klasifikovanja lezija larinksa (10).

Prekretnica u laringologiji je bilo otkriće laringoskopa. Opisano je mnogo pokušaja da se vizuelizuje larinks. Postoje podaci da su stari Rimljani koristili uglačane komade metala, ili uglačanu oštricu noža, da bi pregledali oralne šupljine (11). Od antičkog doba je bilo još mnogo pokušaja da se pregleda larinks, ali se za izumitelja laringoskopa smatra operiski pevač Manuel Gracia. Ovaj španski bariton je 1855. godine objavio rad "Observations on the Human Voice", u kome je predstavio svoj način posmatranja glasnih žica pomoću dva ogledala i usmerene sunčeve svetlosti (12). Sa razvitkom laringoskopije otvorile su se nove dijagnostičke i terapijske mogućnosti. Morell Mackenzie, poznati britanski laringolog napisao je 1871. godine knjigu o izraslinama na larinksu, u kojoj je tumore larinksa klasifikovao na: "papilomata"- benigne epitelne izrasline, "fibromata" - fibrocelularne ili mukozne polipe, "myxomata" - cistične tumore, "sarcomata", - vretenasto ćelijske, "adenomata", i "angiomata"(10). MacKenzie je 1887. godine bio pozvan da operiše nemačkog princa Frederika, koji je patio od disfonije i kome je laringoskopski uočena promena na glasnim žicama (13). Promena je više puta uklanjana, ali je stalno recidivirala (13). Hirurški materijal se u to doba nije regularno slao na patohistološku analizu. Patohistološka analiza je tada služila da se na osnovu nje odluči hoće li pacijent biti podvrgnut operaciji, a operacije larinksa su u to vreme imale vrlo visok mortalitet (14). MacKenzie je laringoskopski uklonio deo tumora koji je poslat čuvenom patologu Virchow-u na patohistološku analizu. Virchow je u nalazu napisao da je u pitanju benigna promena, koju je nazvao "pachydermia verrucosa laryngis"(15). Mackenzie se složio sa čuvenim patologom, jer je na osnovu laringoskopije, stekao isti takav utisak (16). Frederik nije operisan, a preminuo je 1888. godine. Obavljena je obdukcija i utvrđeno je da je bolovao od karcinoma larinksa sa metastazama u limfnim čvorovima (16).

Napredak u klasifikaciji tumora larinksa je ubrzo napravljen. Krajem devetnaestog veka tumori larinksa su klasifikovani na karcinome i sarkome (17). Sarkomi su se češće javljali kod muškaraca. Opisani su kao mase nepravilnog, papilarnog izgleda. Sarkome je karakterisao spor rast i izazivanje obimne destrukcije larinksa (7). Karcinomi su se delili na dve podgrupe: ekstrinzične i intrinzične karcinome (7). Podela je bila napravljena na osnovu anatomske lokalizacije na kojoj se javljaju i na osnovu kliničkog ponašanja. Za intrinzične karcinome bilo je karakteristično da se javljaju na glasnim žicama, tiroidnom uglu i ventrikulima (7). Odlikovao ih je papularan izgled, što je bilo svojstveno sarkomima (7). U ranim stadijumima bolesti bilo ih je vrlo teško razlikovati od sarkoma. U kasnim stadijumima bolesti bilo ih je moguće razlikovati, jer su karcinomi ulcerisali, duboko invadirali čitav larinks i metastazirali u limfne čvorove (7). Karakteristična mesta javljanja ekstrinzičnih karcinoma su bila: epiglotis, interaritenoidni i ariepiglotisni nabori. Osnovna karakteristika ekstrinzičnih karcinoma je bila brz rast i brzo širenje na farinks, tonzile i nepce (7). Felix Semon, prvi laringealni hirurg u Londonu, prepoznao je 1906. godine pušenje kao faktor rizika za nastanak karcinoma larinksa (18).

1.2. FUNKCIONALNA ANATOMIJA I EMBRIOLOGIJA LARINKSA

Larinks je hrskavični organ koji je deo respiratornog trakta. Larinks se sastoji od mukoznih membrana koje su presavijene preko fibroznog i hrskavičnog skeleta (19). Sastavljen je od hrskavica, fibroznih opni, mišića i sluzokože. Nalazi se u srednjem delu prednje regije vrata, ispod podjezične kosti, iznad dušnika. Iza larinksa se nalazi farinks, a sa bočnih strana larinksa nalaze se levi i desni režnjevi štitne žlezde. U odnosu na kičmeni stub, pruža se od vratnog pršljena C3 do vratnog pršljena C7 (20). Sa gornje strane se otvara ka laringealnom delu farinksa, dok se sa donje strane nastavlja na traheju. Dužina larinksa merena od gornje granice gornjeg tiroidnog ureza do donje granice krikoidne hrskavice iznosi od 28mm do 44mm (21). Za muškarce je prosečna dužina larinksa 36.5mm a za žene 30.6mm (21). Larinks se deli na tri regije: supraglotis, glotis i subglotis (22) (slika1).



Slika 1: Anatomske strukture larinksa (Modifikovano prema Standing S: Gray's anatomy, ed 40, Edinburgh, 2009, Elsevier Churchill Livingstone, p 582).

Supraglotis se proteže od donje površine epiglotisa do vestibularnih nabora (lažne glasne žice) (23). Glotis je regija u kojoj se nalaze glasne žice, prostor između glasnih žica (rima glottidis) i prostor ispod glasnih žica visine 1cm (23). Pruža se od prednje komisure do procesusa vokalisa aritenoidne hrskavice (24). Subglotis je prostor koji se nalazi između donje granice glotisa i donje granice krikoidne hrskavice (22). Supraglotis se deli na 5 regiona: suprahoidni epiglotis, infrahoidni epiglotis, laringealnu površinu ariepiglotisnih nabora, aritenoid i lažne glasne žice. Larinks se snabdeva krvlju putem *arteriae laryngealis superior* i *arteriae laryngelais inferior*. Venska drenaža se obavlja putem *venae laryngealis superior* koja se drenira u unutrašnju jugularnu venu i putem *venae laryngelais inferior* koja se preko leve brahiocefalične vene drenira u donju tiroidnu venu (22).

U larinksu postoje tri potencijalna prostora koja formiraju laringealne hrskavice, ligamenti i odgovarajuće membrane: preepiglotisni prostor, paraglotisni prostor i subglotisni prostor (6). Pre-

epiglotisni prostor je prostor ispunjen masnim tkivom koji se nalazi između epiglotisa, tiroidne hrskavice i tiroidne membrane. U preepiglotisni prostor često invadiraju uznapredovali tumori supraglotisne regije (6). Paraglotisni prostor se nalazi između glasnih žica i tiroidne hrskavice. U paraglotisnom prostoru se nalaze masno i vezivno tkivo. U ovaj prostor invadiraju uznapredovali tumori glotisne regije (6). Paraglotisni prostor komunicira sa preepiglotisnim prostorom kaudalno. Subglotisni prostor se nalazi između konusa elastikusa, mukoze subglotisnog regiona i Broyle-ovog ligamenta (6).

Kao što je pomenuto, larinks se dominantno sastoji od hrskavica i vezivnog tkiva. Vezivno tkivo larinksa se organizuje u nekoliko vezivno-tkivnih barijera koje sprečavaju širenje tumora larinksa. *Conus elasticus* je membrana koja leži ispod sluzokože koja povezuje krikoidnu hrskavicu sa tiroidnom i aritenoidnom hrskavicom (6). Sastoji se od gustog vezivnog tkiva koje je bogato elastičnim vlaknima. *Conus elasticus* sprečava širenje tumora iz glotisnog u subglotisni region (6). Kvadrangularna membrana se pruža između aritenoidne hrskavice i epiglotisa i sprečava širenje tumora iz supraglotisne u glotisnu regiju (6). Beitler i saradnici su 1975. godine opisali dve periventrikularne membrane, centralnu i perifernu, koje sprečavaju širenje tumora iz paraglotisne regije (25).

Iako hrskavična i vezivno-tkivna struktura larinksa sprečavaju širenje tumora van granica larinksa, postoje i „slabe tačke“ u građi larinksa, kroz koje tumori mogu da se šire van granica larinksa. Tiroaritenoidni zjap je prostor koji se nalazi između aritenoidne i tiroidne hrskavice, kroz koji tumor može da se širi posteriorno (26). Tačka u kojoj se prave glasne žice spajaju sa hrskavicom naziva se Broyle-ovog ligament i predstavlja slabu tačku, kroz koju mogu da se šire tumori iz preepiglotisnog prostora (27). Tumori još mogu da se šire kroz krikotiroidne i tiroidne membrane, kao i kroz hrskavice larinksa (6).

1.2.1. Embriologija larinksa

Embrionalno poreklo supraglotisa se razlikuje od embrionalnog porekla glotisa i subglotisa.

Supraglotis je nastao od bukofaringealnog primordijuma, koji je nastao od trećeg i četvrtog branhijskog luka iz koga su nastali i orofarinks i usna šupljina (28). Supraglotis je bogat limfnim sudovima koji se dreniraju u limfne čvorove na obe strane II, III i IV nivoa vrata, pa zbog toga karcinomi larinksa koji nastaju u supraglotisnoj regiji često daju metastaze limfatičnim putem (29).

Glotis i subglotis su nastali iz dve lateralne brazde traheobronhijskog primordijuma, koje su nastale od šestog branhijskog luka, iz koga su nastali i pluća i trahea (28). Limfni sudovi glotisa i subglotisa su retki i dreniraju se unilateralno u IV nivo limfnih čvorova vrata i to u prelaringealne i pretrahealne limfne čvorove, pa zbog toga karcinomi larinksa, koji nastaju u glotisnoj i subglotisnoj regiji, ne daju često metastaze u limfne čvorove (29).

1.2.2. Histologija larinksa

U mukozni larinksa se javljaju tri tipa epitela: pločastoslojeviti epitel bez orožavanja, pseudoslojeviti epitel respiratornog tipa i epitel prelaznog tipa. Epiglotis i prave glasne žice su prekrivene pločastoslojevitim epitelom bez orožavanja. Ventrikule, subglotis i lažne glasne žice prekriva pseudoslojeviti epitel respiratornog tipa (30). Epitel prelaznog tipa se nalazi između pločastoslojevitog epitela pravih glasnih žica i respiratornog epitela i supraglotisa. Epitel prelaznog tipa čine bazaloidne, ili nezrele ćelije pločastoslojevitog epitela (30). U ovom epitelu se ne primećuje sazrevanje epitelnih ćelija i ćelije pokazuju povećan nukleo-citoplazmatski odnos. U donje dve trećine epiglotisa, u submukozni ventrikula i u subglotisu se nalaze seromucinozne žlezde. Najbrojnije su u lažnim glasnim žicama (30). Larinks je organ koji se sastoji od hrskavica. Epiglotis, kuneiformna i kornikulatna

hrskavica su hrskavice elastičnog tipa. Tiroidna, krikoidna i aritenoidna hrskavica su hrskavice hijalinog tipa. Hijalina hrskavica u larinksu može da u procesu starenja kalcifikuje i/ili osifikuje.

1.3. LEZIJE I TUMORI LARINKSA

1.3.1. Polip larinksa

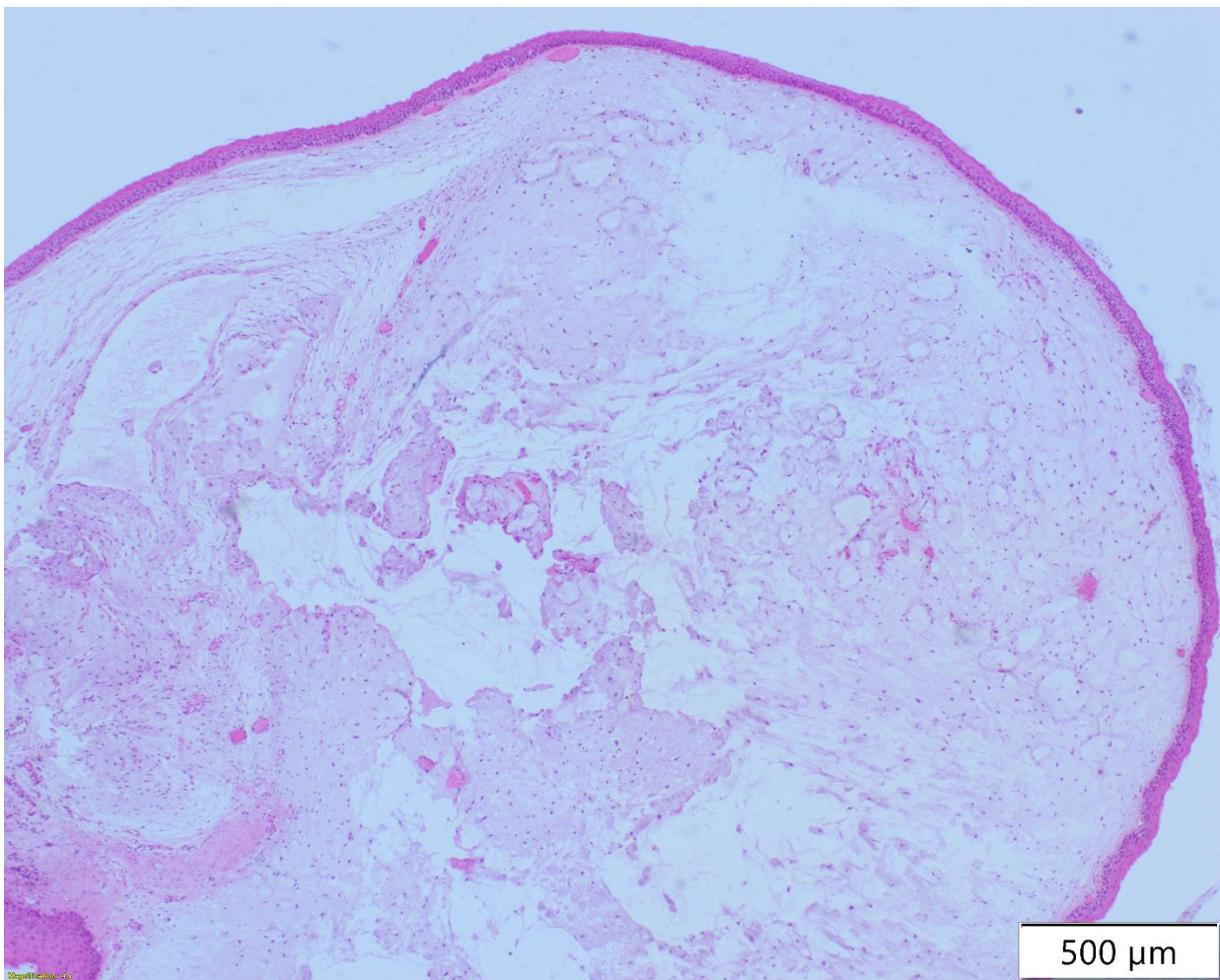
Polipi larinksa su neneoplastične lezije larinksa nastale kao posledica reakcije strome na infekciju i/ili traumu (30). Uglavnom nastaju na anteriornoj trećini glasne žice. Najčešće su unilateralni, ali mogu biti i bilateralni (31). Polipi larinksa su relativno česti u opštoj populaciji, sa prevalencijom od 2,9% do 16,9% u populaciji koja se javila lekaru zbog problema sa glasom (32, 33, 34). U studijama koje su rađene na opštoj populaciji, prevalencija polipa larinksa je niža i iznosi 1.31% (35). Polipi se javljaju u mlađoj populaciji, u uzrastu od tridesete do šezdesete godine života (36). Studije novijeg datuma, koje su rađene na opštoj populaciji, ukazuju da je učestalost pojave polipa jednaka i u muškoj i u ženskoj populaciji, za razliku od starijih studija koje su ukazivale da su polipi češći u ženskoj populaciji (35). Klinički se manifestuju promuklošću i promenom osobina glasa, takozvanim "pucanjem glasa". Veliki polipi mogu izazvati respiratornu opstrukciju, ili simptome slične astmi (37). Na kliničkom pregledu se manifestuju kao pedunkularni ili sesilni izraštaji, glatke površine, providni, žute ili sive boje (30). Glavni etiološki faktor za nastanak polipa larinksa je fonetska trauma, zatim slede hronične infekcije (laringitis), alkoholizam, pušenje, hipotiroidizam, gastroezofagealni refluks (38). *Polymerase chain reaction* (PCR) metodom detektovan je *Helicobacter pylori* u polipima larinksa, mada njegova uloga u nastanku polipa još nije razjašnjena (39).

Patohistološka slika polipa

Makroskopski, polipi larinksa su sesilne ili pedunkularne lezije, meke ili gumaste konzistencije, dimenzija od nekoliko milimetara do 15 milimetara, glatke i sjajne površine (30). Glavna promena u patogenezi polipa larinksa je nakupljanje tečnosti u Reinke-ovom prostoru (30). To je prostor koji se nalazi u glasnim žicama između vokalnog ligamenta i mukoze (40). U Reinke-ovom prostoru se nalaze snopovi rastresitog vezivnog tkiva koji se pružaju paralelno sa ivicama glasnih žica. U Reinke-ovom prostoru nema krvnih sudova (40).

Postoji pet histoloških podtipova polipa larinksa (30):

1. Edematozno miksoidni - u kome se vidi submukozno nakupljanje svetlo plavog ili ružičastog materijala u slabocelularnoj stromi varijabilne vaskularizacije (Slika 2).



Slika 2: Polip larinksa, HEx40

2. Fibrozni - u kome se vidi umereno celularna stroma, koju čine uniformne ovalne ili vretenaste ćelije. U stromi se vidi nakupljanje manje ili veće količine fibroznog tkiva.
3. Vaskularni - u submukozi se vide brojni dilatirani vaskularni prostori bez krvarenja.
4. Hijalni - u submukozi, u blizini krvnih sudova, se vidi nakupljanje acelularne mase roze boje.
5. Mešoviti tip - ima osobine prethodno nabrojnih vrsta polipa.

U epitelu polipa larinksa se vide različite promene: atrofija, hiperplazija, hiperkeratoza, a displazija i invazivni karcinom se jako retko mogu uočiti (41, 42).

Elektronskom mikroskopijom je uočeno da je u 20% ispitivanih polipa epitelna komponenta bez razlika u odnosu na epitel larinksa, dok su u 80% ispitivanih polipa larinksa vide se sledeće promene: hiperplazija epitela; epitelne ćelije su glatke površine i ravne bez mikroizraštaja; proširene su intercelularne veze i ispunjene amorfnim materijalom, što dovodi do poremećaja građe dezmozoma (38).

Lečenje polipa larinksa

Injekcije steroida, fonoterapija i hirurško uklanjanje lezije su terapijske opcije za polipe larinksa (43). Fonomikrohirurgija je najčešća izabrana opcija za uklanjanje ovih lezija (44). Neke studije su ukazale da fonoterapija daje dobre rezultate i da uz adekvatnu fonoterapiju lezije mogu da se smanje, pa se

fonoterapija koristi i pre hirurškog zahvata i nakon hirurškog zahvata (45). Nakon hirurškog uklanjanja, stopa rekurencije je oko 10% (46).

1.3.2. Papilomi larinksa

Papilom je dobroćudni epitelni tumor resičastog izgleda, izazvan infekcijom virusom humanog papiloma (HPV). Papilom se sastoji od fibrovaskularnog jezgra, koje je prekriveno pločastoslojevitim epitelom bez orožavanja (44).

Papilom larinksa je izazvan infekcijom virusom humanog papiloma (HPV) i to najčešće tipovima 6 i 11, mada su opisani i slučajevi infekcije tipom 18 (47). Papilom larinksa je najčešći benigni tumor larinksa (48). Iako se smatra najčešćim benignim tumorom larinksa, papilom je redak tumor, sa incidencijom od 4,3/100000 kod dece i 1,8/100000 kod odraslih u Sjedinjenim Državama.

Nisu dostupni podaci o incidenciji papiloma larinksa u Srbiji (49). Nasuprot podacima o niskoj incidenciji, DNK virusa humanog papiloma je detektovana u sluznici gornjih respiratornih puteva zdrave dece i adolescenata, sa prevalencijom od 1,9% (50). Ovi podaci sugerišu da su u patogenezu papiloma larinksa uključeni i drugi faktori osim infekcije HPV, prvenstveno poremećaji imunog sistema, poput neadekvatne proizvodnje antitela na HPV (51) ili smanjenog odgovora Langerhansovih ćelija na stimulaciju IL-36 γ (52).

Papilomi larinksa vrlo često recidiviraju, pa se zbog toga u poslednje vreme često koristi izraz rekurentna respiratorna papilomatoza, umesto papilomatoza larinksa (48). Papilomi larinksa imaju bimodalnu starosnu distribuciju, pa se, prema uzrastu pacijenta, dele na juvenilne i adultne (48). Prema kliničkom toku papilomatoze mogu biti agresivne i neagresivne, a po broju promena solitarne i multiple (48). Juvenilna papilomatoza je agresivni oblik bolesti, u kome je mnogo češća pojava multiplih tumora, pa suštinski postoje samo dva osnovna oblika bolesti: juvenilna papilomatoza i adultna papilomatoza (31).

Juvenilna rekurentna respiratorna papilomatoza

Juvenilna papilomatoza je oblik bolesti koji se javlja u detinjstvu i adolescenciji. Najčešće se dijagnostikuje kod dece mlađe od 2 godine (31). Bolest se prenosi prilikom porođaja, kada dete prolazi kroz inficirani genitalni trakt majke (53). Većina majki dece sa rekurentnom respiratornom papilomatozom ima serološki dokazanu infekciju HPV, ali samo mali broj majki je imalo vidljive genitalne kondilome (54). Izazivači bolesti su virusi humanog papiloma, tipovi 6 i 11, s tim što je dokazano da je HPV tip 11 povezan sa agresivnijim tokom bolesti (55). U poslednje vreme je dokazano, da je raniji početak bolesti veći faktor rizika za razvoj agresivnije bolesti od tipa virusa (56). Starosna granica između juvenilne i adultne papilomatoze nije precizno određena, ali najčešće se smatra da je to dvadeseta godina (57). Bolest se klinički se manifestuje promuklošću, stridorom i otežanim disanjem. Ova bolest je drugi najčešći uzrok hronične promuklosti kod dece (58). Veliki papilomi mogu da dovedu do teške dispneje. Operativno odstranjivanje tumora je terapija izbora. S obzirom da je stopa rekurencije preko 50%, najveći broj pacijenata biva podvrgnut operativnim zahvatima najmanje tri puta do izlečenja (59). Podaci o ishodu juvenilne respiratorne papilomatoze su različiti. Po nekim autorima većina pacijenata bude izlečena od sedme do desete godine života (60), dok po drugim autorima najveći broj pacijenata bude izlečen do puberteta, ali u 20% slučajeva bolest se ponovo javlja u odraslom dobu (31). Kao što je već pomenuto, juvenilna papilomatoza je agresivniji oblik bolesti i u 22,1% slučajeva može da progredira u difuznu laringotrahealnu papilomatozu sa zahvatanjem donjeg respiratornog trakta (61). Kao posledica ovog oblika bolesti, moguća je i progresija bolesti u skvamocelularni karcinom pluća i skvamocelularni karcinom regije glave i vrata (62).

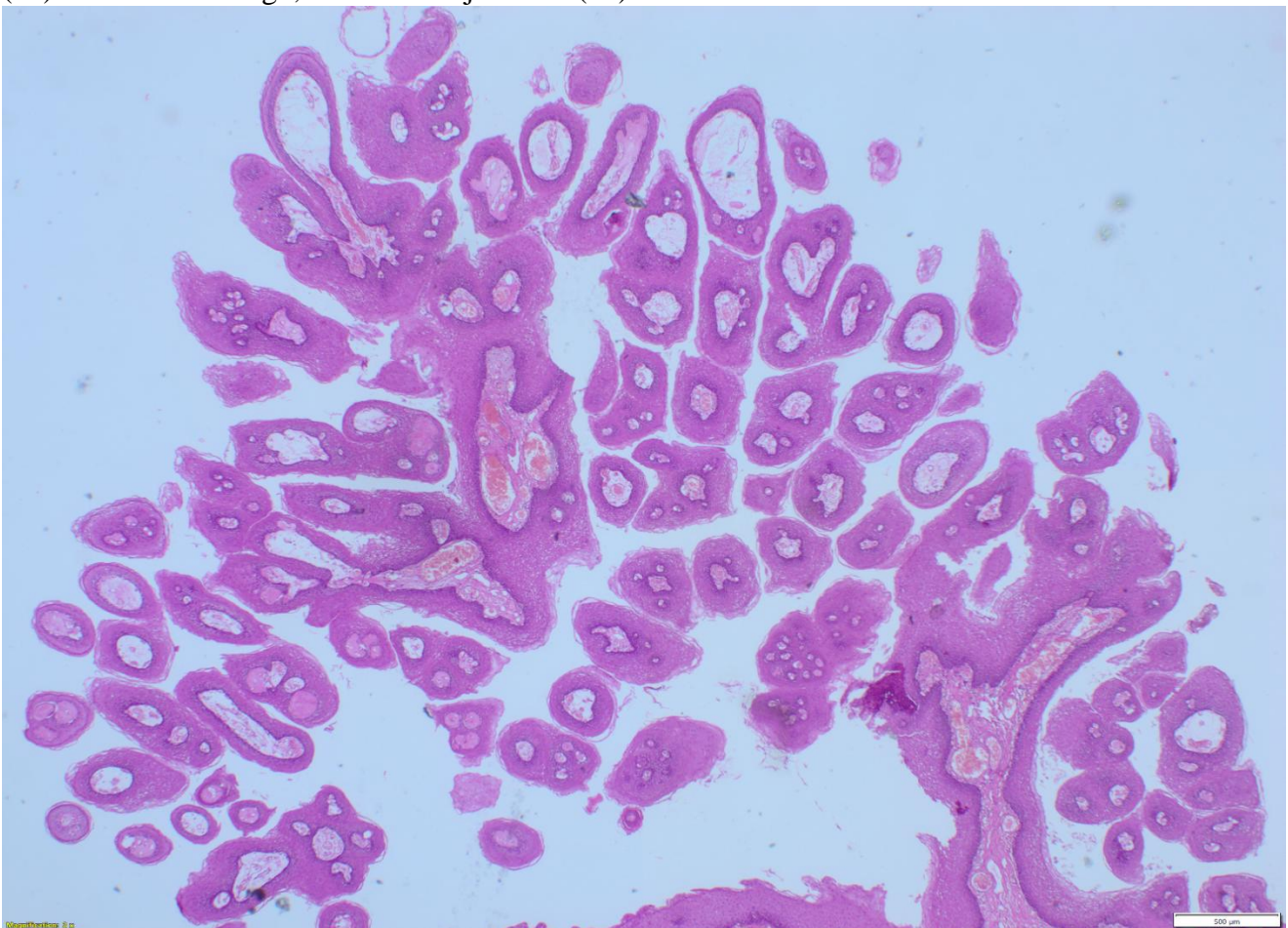
Adultna rekurentna respiratorna papilomatoza

Adultna rekurentna respiratorna papilomatoza se karakteriše pojavom papiloma uglavnom na larinksu, a retko bolest može da se proširi na nazofarinks, traheobronhijalno stablo i plućni parenhim (63).

Ako se bolest javi prvi put posle dvadesete godine, smatra se da je to adultna rekurentna respiratorna papilomatoza, a ako se javi posle dvadesete godine, a pacijent je ranije bolovao od juvenilne rekurentne respiratorne papilomatoze, smatra se da je u pitanju recidiv juvenilne rekurentne respiratorne papilomatoze (57). Muškarci češće oboljevaju od žena (58). Bolest se prenosi seksualnum putem, oralnim kontaktom sa inficiranim genitalijama (64). Kod odraslih papilomi su najčešće solitarni, a rekurentni tok bolesti nije čest (65). Klinički simptomi su promuklost, hronični kašalj, česte infekcije gornjeg respiratornog trakta, dispneja (65). Metoda izbora za lečenje je hirurško uklanjanje tumora, a u poslednje vreme, kao dodatna terapija se apliciraju i antivirusni lekovi, pa je remisija bolesti prisutna u preko 70% slučajeva (66). Postoje podaci da 3-7% papiloma može da maligno alteriše u skvamocelularni karcinom (67).

Patohistološka slika

Papilom larinksa se sastoji od fibrovaskularnog jezgra koje je prekriveno pločastoslojevitim epitelom bez orožavanja (30) (Slika 3). U fibrovaskularnom jezgru se mogu uočiti znaci inflamacije. U epitelu se mogu videti hiperkeratoza, ortokeratoza i parkeratoza (30). Obično nema izražene displazije u epitelu (30). Koilociti se mogu, ali i ne moraju uočiti (30).



Slika 3: Papilom larinksa, HEx20

Ukoliko se vide znaci atipije poput hiperplazije bazalnih ćelija, izraženih nukleolusa, varijacije oblika i veličine jedara, očekuje se recidiv bolesti (68). Znaci inflamacije u epitelu mogu se često uočiti. Imunohistohemijsko bojenje na p16 je negativno.

1.3.3. Papilarna keratoza larinksa

Papilarna keratoza larinksa je resičasta, tumorolika, neneoplastična lezija laringealne sluznice, koja se javlja kod odraslih osoba (68). Etiologija je nejasna: utvrđeno je da ne postoji povezanost sa virusnim infekcijama, ali se smatra da pušenje predstavlja predisponirajući faktor za nastanak lezije (69). Javlja se u odrasloj populaciji, uglavnom kao solitarna lezija i uglavnom ne recidivira (68). Papilarna keratoza larinksa uglavnom nastaje na glasnicama, najčešće u vidu solitarne lezije, retko veće od 2 cm (70, 71, 72). Maligni potencijal ove promene je nizak, ali ipak postoji (73). Neki autori smatraju da je maligni potencijal ovih lezija veći od malignog potencijala displazija epitela larinksa (74).

Patohistološka slika

Papilarna keratoza larinksa je resičasta promena. Resica se sastoji od fibrovaskularnog jezgra koje je prekriveno epitelom jasnog papilarnog izgleda sa jako izraženom ortokeratozom ili parakeratozom, po čemu se razlikuju od papiloma (68) (Slika 4). U stratum granulozumu, neposredno ispod hiperkeratotičnog dela, često se uočavaju relativno brojne, uniformne keratohijalinske granule (68). U stromi se može uočiti i zapaljenje koje je blagog ili umerenog intenziteta (68).



Slika 4: Papilarna keratoza larinksa, HEx4

U papilarnoj keratozi larinksa se može uočiti i displazija epitela, koja se onda gradira na uobičajen način, a u nalazu se navodi da je u pitanju papilarna keratoza larinksa sa displazijom odgovarajućeg

stepena (68). Diferencijalno dijagnostički u obzir dolaze veruka vulgaris i verukozni karcinom larinksa (75). Verukozni karcinom larinksa je patohistološki vrlo sličan papilarnoj keratozi, a može se razlikovati po prisustvu keratohijalinskih granula u površnom sloju epitela, koje su relativno brojne u papilarnoj keratozi, dok ih kod verukoznog karcinoma nema (76). Takođe je zapaljenje u stromi kod verukoznog karcinoma jakog stepena, dok je kod papilarne keratoze lakog intenziteta, najviše umerenog intenziteta (76).

1.3.4. Displazija larinksa

Displazija larinksa je skup arhitektonskih i citoloških promena u epitelu, koje nastaju kao posledica nakupljanja genetskih promena, koje se mogu povezati sa povećanom verovatnoćom progresije do nastanka skvamocelularnog karcinoma (1). U literaturi ne postoje precizni i pouzdani podaci o incidenciji displazije larinksa. Može se pronaći podatak da je incidencija displazija larinksa 10,2 na 100000 stanovnika za muškarce i 2,1 na 100000 žena, i da je prosečna starost pacijenata 60 godina (77). Ovi podaci se odnose se na pojam laringealne keratoze. Laringealna keratoza je makroskopski pojam koji je neprecizno definisan. Pod laringealnom keratozom se podrazumeva klinički vidljiv beli keratotični plak. To je pojam koji se koristio simultano sa pojmom leukoplakija i obuhvatao je sve promene istog makroskopskog izgleda, bez obzira na histološko prisustvo ili odsustvo displazije. Podaci o incidenciji displazije na evropskom kontinentu još uvek nisu objavljeni (78).

Najvažniji faktori rizika za nastanak displazije larinksa su pušenje i prekomerna konzumacija alkohola, kao i faktori rizika povezani sa zanimanjem (79). Rizik za nastanak displazije larinksa se povećava sa brojem popušanih cigara tokom dana. Nekoliko istraživanja se bavilo ovom temom. Muller i Khron su u svom istraživanju pušače podelili na lake (do 10 cigareta dnevno), umerene (do 20 cigareta dnevno) i teške (preko 20 cigareta dnevno). Zaključili su da displazija ili karcinom larinksa nastaju kod 4,2% nepušača, 12,5% "lakih" pušača, 22,9% "umerenih" pušača i 44,7% "teških pušača". Uočili su i da se rizik za nastanak displazije i skvamocelularnog karcinoma smanjuje sa prestankom pušenja, ali ne nestaje u potpunosti, jer je 12,5% osoba koje su ostavile pušenje u poslednjih 5 godina obolelo od displazije larinksa ili karcinoma larinksa (81). Auerbach i saradnici su uočili da od displazije larinksa ili *carcinoma in situ* larinksa oboli 10,2% lakih pušača (manje od jedne kutije cigareta dnevno), 15,8% umerenih pušača (dve kutije cigareta dnevno) i 18,4% teških pušača (više od 2 kutije cigareta dnevno) (82). Takođe je potvrđeno da pušenje i konzumacija alkohola kumulativno povećavaju rizik za nastanak displazije larinksa (83). Postoje različita mišljenja o gastroezofagealnom refluksu kao faktoru rizika za nastanak displazije larinksa. Jedna studija je pokazala da gastroezofagealni refluks nije faktor rizika za nastanak displazija larinksa (84), dok je druga studija novijeg datuma pokazala da postoji umerena povezanost između gastroezofagealnog refluksa i nastanka prekanceroznih lezija larinksa (85). HPV ima ulogu u patogenezi oko 10% displazija larinksa i te displazije su nastale na terenu rekurentne respiratorne papilomatoze (80). U jednoj studiji, rađenoj na malom broju ispitanika, HPV je detektovan u 6,7% slučajeva displazije larinksa (86), dok u novijoj studiji rađenoj na većem broju ispitanika nije detektovan ni u jednom slučaju displazije larinksa (87).

Klinička slika

Displazija larinksa se najčešće javlja na glasnim žicama. Najčešće se lezija javlja na jednoj glasnoj žici, ali može da zahvati i obe glasne žice. Simptomi displazije larinksa su raznoliki i nespecifični: promena kvaliteta glasa, promuklost i hronični kašalj. Ako se displazija nalazi u glotisnoj i supraglotisnoj regiji, najčešće nema simptoma i displazija se otkriva slučajno, prilikom rutinskih pregleda kod ORL specijaliste. Ukoliko simptomi postoje, najčešće su blagi na početku bolesti i perzistiraju nekoliko nedelja do nekoliko meseci pre nego što pacijent dođe na pregled (48).

Laringoskopski se displazija manifestuje nespecifičnim i raznolikim nalazima. Manifestuje se u formi leukoplakije, eritroleukoplakije, kao egzofitna masa ili kao hiperkeratotična lezija (30). Video-laringo-storbo-skopija (VLS) nije pokazala efikasnost u diferencijalnoj dijagnostici displazije i lezija sa sličnom prezentacijom (88). Pouzdanu i definitivnu dijagnozu postavlja patolog nakon biopsije lezije.

Patohistološka slika

Svaki epitel ima uređenu građu. U pločastoslojevitim epitelima razlikuju se tri sloja: bazalni, spinozni i površni sloj. Ni epitel larinksa nije izuzetak. U bazalnom sloju se nalaze ćelije male veličine, oskudne citoplazme, ovoidnog jedra, koje su perpendikularno orjentisane prema površini. Spinozni sloj je nadeblji sloj epitela larinksa i nalazi se iznad bazalnog sloja. Spinozni sloj se sastoji od krupnijih ćelija nego što su ćelije bazalnog sloja, koje imaju okruglo jedro vezikularnog hromatina i obilnu eozinofilnu citoplazmu. Površni sloj čine pljosnate ćelije sa malim jedrom kondenzovanog hromatina.

U displaziji je poremećena opisana uređena građa epitela i vide se dve vrste promena : arhitektonske i citološke promene. Arhitektonske promene (atipija) su posledica povećanog umnožavanja i poremećenog sazrevanja epitelnih ćelija. U arhitektonske promene spadaju: povećanje celularnosti površnih slojeva epitela, zbijanje ćelija sa gubitkom polariteta, poremećaj stratifikacije, produžavanje epidermalnih papila u pravcu submukoze (što može biti i reaktivna promena); poremećaj stratifikacije, povećana mitotska aktivnost, prisustvo atipičnih mitozna, diskeratoza i paradoksalna maturacija (1).

Citološke promene (atipija) su: anizonukleoza, nuklearni pleomorfizam, poremećen (povećan) nukleo-citoplazmatski odnos, nuklearna hiperhromazija (1).

Gradiranje displazija larinksa

Postoji nekoliko sistema gradiranja displazija larinksa. Kao osnov za gradiranje displazija larinksa je uzet sistem gradiranja displazija cerviksa uterusa, gde je epitel podeljen na trećine i gradus se određuje prema broju trećina u kojima se manifestuju displastične promene (78). Ukoliko su promene prisutne samo u donjoj trećini epitela, u pitanju je displazija niskog gradusa, ukoliko su promene prisutne u donje dve trećine epitela, u pitanju je displazija umerenog gradusa i ukoliko su promene prisutne u više od donje dve trećine epitela, onda se radi o displaziji visokog gradusa. Ovakav način gradiranja displazije je modifikovan u više navrata jer se pokazao kao neadekvatan za gradiranje displazija larinksa (78).

Zbog varijacija u patohistološkoj slici, nepoznavanja patogenetskih mehanizama i nemogućnosti povezivanja gradusa displazije sa prognozom displazije gradiranje displazija larinksa nije jednostavno (78). Bilo je mnogo pokušaja da se napravi reproducibilan način gradiranja, koji ima malu varijabilnost između posmatrača, na osnovu koga može da se predvidi mogućnost rekurencije i maligne transformacije i koji će da bude opšte prihvaćen.

Istorijat gradiranja displazija larinksa

Prva klasifikacija displazija larinksa, prema kojoj su displazije gradirane na osnovu nuklearne atipije na prostu hiperplaziju, hiperplaziju sa fokalnom atipijom i karcinom *in situ* je napravljena 1963. godine od strane Kleinsasser-a (89). Sledeća klasifikacija je napravljena 1971. godine kada su Kambič i Lenart displaziju klasifikovali na prostu, atipičnu i abnormalnu hiperplaziju i na karcinom *in situ* (90). Svaka od navedenih klasifikacija je imala manjkavosti i nije bila široko prihvaćena. U narednim klasifikacijama je pokušavano da se modifikuje sistem klasifikacije displazije cerviksa uterusa. Praćeno je menjanje terminologije u patologiji displazija cerviksa i pokušano je da se uvedu termini analogni terminima koji se koriste u klasifikacijama displazija cerviksa uterusa. Za naziv cervikalna intraepitelna neoplazija, uveden 1969. godine u klasifikaciju displazija cerviksa uterusa, uveden je naziv skvamozna intraepitelna neoplazija larinksa 1976. godine. 1986. godine je uveden termin intraepitelna neoplazija larinksa (Laryngeal intraepithelial neoplasia – LIN). LIN I je bio analog displaziji niskog gradusa, LIN II displaziji umerenog gradusa, a LIN III analog displaziji visokog gradusa. Nijedan od opisanih klasifikacionih sistema nije bio pouzdan, jer su se oslanjali na sistem

gradiranja displazije cerviksa uterusa, pri čemu su različiti patogenetski mehanizmi nastanka displazija larinksa u odnosu na displazije cerviksa bili potpuno zanemareni (91). S obzirom da je postojalo više sistema gradiranja displazija larinksa, u trećem izdanju klasifikacije SZO tumora glave i vrata iz 2005. godine predstavljena su tri najviše korišćena sistema:

1. Sistem od pet kategorija: hiperplazija skvamoznih ćelija, laka displazija, umerena displazija, displazija teškog stepena i karcinom *in situ*.
2. Sistem skvamozne intraepitelne neoplazije (eng. Squamous intraepithelial neoplasia – SIN) od tri kategorije: displazija lakog stepena (hiperplazija bazalnih/parabazalnih ćelija), displazija umerenog stepena i displazija teškog stepena (u koju spada i *carcinoma in situ*).
3. Sistem od četiri kategorije Ljubljanske klasifikacije: skvamozna hiperplazija, bazalna/parabazalna hiperplazija, atipična hiperplazija i karcinom *in situ*.

Mane navedenih klasifikacija su bile velika varijabilnost između posmatrača (92) i preveliko oslanjanje na sistem klasifikacije displazija cerviksa uterusa, gde se gradus displazije određuje u odnosu na debljinu epitela u kojoj se displazija nalazi.

U odnosu na patogenezu, postoje dve vrste displazija u pločasto-slojevitom epitelu: keratinizujuće, čiji nastanak nije povezan sa infekcijom humanim papiloma virusom i nekeratinizujuće, u čijoj patogenezi je bitna infekcija humanim papiloma virusom. Uzevši u obzir navedenu činjenicu displazije cerviksa su najčešće nekeratinizujuće, a displazije larinksa su najčešće keratinizujuće (93). S obzirom na gore navedene činjenice, navedeni sistemi nisu bili najpogodniji za gradiranje keratinizujućih displazija. U keratinizujućim displazijama izražene arhitektonske i citološke promene su prisutne, vrlo često, samo u donjoj trećini pločastoslojevitog epitela, dok se u gornje dve trećine epitela vidi regularno sazrevanje ćelija. Prema tome, osim debljine epitela, veći značaj je morao biti pridodat prisustvu diskeratotičnih ćelija u celoj debljini epitela (94). Najnovija SZO klasifikacija displazije iz 2017. godine je bazirana na morfološkim kriterijumima Ljubljanske klasifikacije (Tabela 1).

Tabela 1. Morfološki kriterijumi za klasifikaciju displazija larinksa

Displazija niskog gradusa – <i>Low-grade dysplasia</i> . Niski maligni potencijal. Spektar morfoloških promena koje obuhvataju promene od skvamozne hiperplazije do umnožavanja bazalnog i parabazalnog sloja. Promene su prisutne u donjoj trećini debljine epitela, dok gornji slojevi epitela zadržavaju maturaciju	
Arhitektonski kriterijumi	Očuvana je stratifikacija: postoji tranzicija ćelija bazalnog sloja ili umnoženih bazalnih/parabazalnih ćelija koje su upravno postavljene na bazalnu membranu u horizontalno orijentisane pljosnate ćelije u višim nivoima
	Spinozni sloj: spektar promena koje variraju od umnoženog celog spinoznog sloja, do prisustva pljosnatih ćelija samo u gornjoj polovini epitela
	Bazalne i parabazalne ćelije: spektar promena koji varira od prisustva 2 do 3 neizmenjena sloja ćelija do umnožavanja bazalnih i parabazalnih ćelija u donjoj trećini epitela.
Citološki kriterijumi	Minimalna ćelijska atipija
	Lako povećana količina citoplazme u parabazalnim ćelijama (u odnosu na bazalne ćelije), uvećana jedra, uniformna distribucija hromatina, nema međućelijskih mostova
	Retke mitoze regularnog oblika u bazalnom sloju ili u neposrednoj blizini bazalnog sloja
	Prisutne retke diskeratotične ćelije
Displazija visokog gradusa – <i>High-grade dysplasia</i> (u ovu kategoriju spadaju displazija umerenog stepena, displazija jakog stepena i karcinom <i>in situ</i>). Premaligna lezija koja predstavlja spektar promena od prisustva nezrelih ćelija koje ispunjavaju više od jedne trećine debljine epitela.	
Arhitektonski kriterijumi:	abnormalna maturacija
	različit stepen poremećaja stratifikacije i polariteta ćelija koji mogu da se vide celom debljinom epitela
	izmenjene epitelne ćelije koje zauzimaju od polovine do cele debljine epitela
	dva podtipa: nekeratinizujući (tip bazalnih ćelija) i keratinizujući (tip spinoznih ćelija)
	različit stepen poremećene morfologije papila (batičasti oblik, pružanje naniže) iz intaktnu bazalnu membranu
	nema poremećaja strome
Citološki kriterijumi:	lako vidljiva ćelijska i nuklearna atipija
	uočljive varijacije veličine i oblika ćelija,
	varijacije intenziteta bojenja, izrazita nuklearna hiperhromazija,
	uvećani i brojniji nukleolusi.
	povećan nukleo-citoplazmatski odnos, povećan broj mitozama u bazalnom i/ili suprabazalnom sloju sa atipičnim mitozama, ili bez njih
diskeratotične apoptotične ćelije u celoj debljini epitela	
Potpuni gubitak stratifikacije i polarnosti i/ili izražena citološka atipija i atipične mitoze kvalifikuju leziju za dijagnozu <i>carcinoma in situ</i> , ako se koristi sistem gradiranja sa tri gradusa	

Modifikovano prema Odell E. et al. 2021 (78).

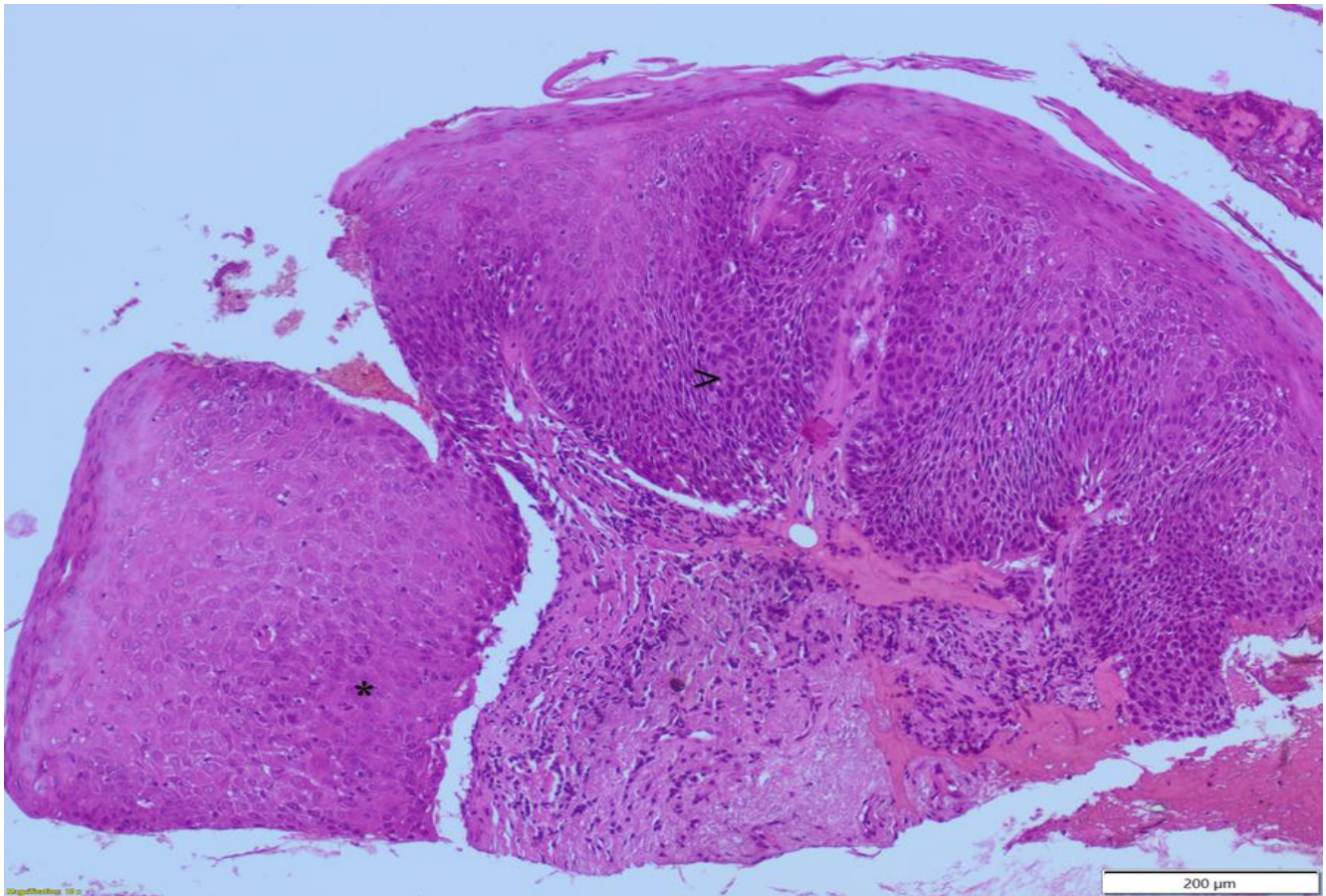
Na slikama se vide dva gradusa displazije: displazija niskog gradusa (Slika 5) u koju spadaju skvamozna hiperplazija i blaga displazija i displazija visokog gradusa (Slika 6) u koju spadaju umerena displazija, displazija visokog gradusa i karcinom *in situ*. Ovaj način gradiranja je prikladan i za gradiranje keratinizujućih displazija. Na ovaj način je pokušano da se usklade sve dosadašnje klasifikacije i da se napravi najbolja korelacija između patohistološke slike i ponašanja lezija (Tabela 2).

Tabela 2. Uporedna analiza najkorišćenijih sistema gradiranja displazija larinksa

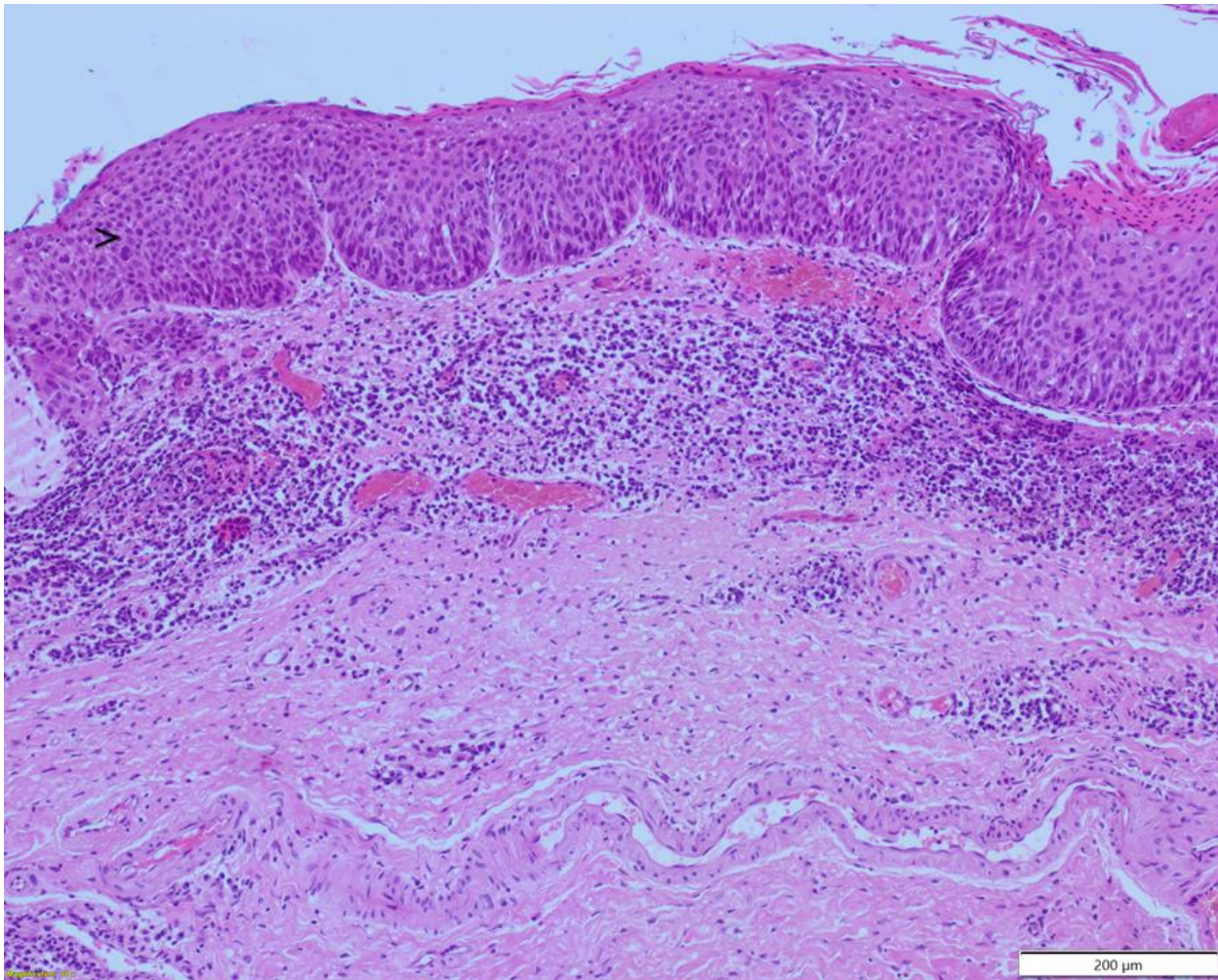
Nivo abnormalne maturacije ćelija (SZO 2005)	SZO klasifikacija 2005	SIN klasifikacija	Ljubljanska klasifikacija	Izmenjena Ljubljanska klasifikacija	SZO klasifikacija 2017
Donja 1/3	Skvamozna hiperplazija	Skvamozna hiperplazija	Skvamozna hiperplazija	Low grade SIL	Displazija niskog gradusa (<i>low-grade dysplasia</i>)
	Blaga displazija	SIN1	Bazalna/parabazalna hiperplazija		
Donja 1/3 do 1/2	Umerena displazija	SIN1 ili 2	Atipična hiperplazija	High grade SIL	Displazija visokog gradusa (<i>high-grade dysplasia</i>)
Gornja 1/2 do 3/4	Umerena displazija	SIN2			
Cela debljina epitela	Displazija visokog gradusa				
	Karcinom <i>in situ</i>		Karcinom <i>in situ</i>	Karcinom <i>in situ</i>	

Modifikovano prema Odell E. et al. 2021 (78).

Iako bolja za praktičnu primenu, ni nova klasifikacija displazija iz 2017. godine nije bez mana. Slaganje između posmatrača je bolje nego što je bio slučaj sa ranijom klasifikacijom SZO 2005., ali je i dalje na relativno niskom nivou (95). U novoj klasifikaciji su jasno odvojene lezije sa visokim malignim potencijalom, od lezija sa niskim malignim potencijalom, međutim, u grupi displazija niskog gradusa nije napravljena razlika između lezija bez malignog potencijala od lezija sa niskim malignim potencijalom (96).



Slika 5. Displazija larinksa niskog gradusa; (HE \times 100) *Normalan epitel larinksa. > Displazija niskog gradusa. Uočava se hiperplazija bazalnog i parabazalnog sloja epitela, nuklearna atipija lakog stepena, uz očuvano sazrevanje ćelija i očuvanu arhitekturu u gornje dve trećine epitela.



Slika 6. Displazija larinksa visokog gradusa; (HEx100) >U epitelu se uočava poremećaj maturacije epitelnih ćelija, delimičan gubitak polariteta i izražena ćelijska atipija.

Biološki i genetski markeri

Pouzdana imunohistohemijski markeri za razlikovanje displazija niskog i visokog gradusa ne postoje, kao ni imunohistohemijski markeri za razlikovanje displazija larinksa od lezija koje diferencijalno dijagnostički dolaze u obzir. Imunohistohemijski markeri koji su ispitivani u displazijama larinksa su uglavnom markeri koji su se pokazali korisnim u dijagnostici displazija drugih regija, prvenstveno cerviksa uterusa. Ki-67 kao dijagnostički marker nije pouzdan, jer su displazije larinksa uglavnom keratotičnog tipa i u takvim slučajevima je promena ograničena na donju trećinu epitela, gde je i inače viši proliferativni indeks, dok je u gornjim trećinama epitela očuvano sazrevanje epitelnih ćelija, sa niskim proliferativnim indeksom (94). P16 se nije pokazao kao dijagnostički koristan marker jer je najčešće negativan ili, ređe, slabo fokalno pozitivan, čak i u displazijama visokog gradusa (97). S obzirom da je p53 najčešće mutirani gen u displazijama larinksa i niskog i visokog gradusa, imunohistohemijska ekspresija p53 nije ni od dijagnostičkog, ni od prediktivnog, ni od prognostičkog značaja (98). Imunohistohemijska ekspresija NANOG, transkripcionog faktora koji ima veliku ulogu u embriogenezi, ima značajnu prediktivnu vrednost u displazijama larinksa. Zaključeno je da se NANOG eksprimira u lezijama koje maligno progrediraju u skvamocelularni karcinom i da je imunohistohemijska ekspresija NANOG statistički značajniji prediktivni faktor nego patohistološko gradiranje lezija (99). U jednoj skorašnjoj studiji otkriveno je da su mutacije u genima FGFR3 i

PIK3CA prisutne u lezijama koje progrediraju u skvamocelularni karcinom, a odsutne u lezijama koje ne progrediraju. Ista studija je pokazala da su mutacije gena JAK3, MET i FBXW7 prisutne u lezijama koje ne progrediraju u malignitet (100).

Biološko ponašanje displazija larinksa

Postoje različiti podaci o prognozi displazija larinksa. Po podacima iz jedne studije iz 2001. godine 5,7% pacijenata sa displazijom niskog gradusa, 22,5% pacijenata sa displazijom srednjeg gradusa i 28,4% pacijenata sa displazijom visokog gradusa oboli od karcinoma larinksa (101). Isenberg i saradnici su 2008. godine u istraživanje uveli grupu pacijenata bez promena na larinksu i zaključili su da kod 3,7% pacijenata bez promena na larinksu nastaje skvamocelularni karcinom larinksa, kao i da 10,1% pacijenata sa dijagnostikovanom displazijom niskog ili srednjeg gradusa oboli od karcinoma larinksa, dok 18,1% pacijenata sa inicijalno postavljenom dijagnozom displazije visokog gradusa oboli od karcinoma larinksa (102). U svom istraživanju Karatayli-Ozgursoy i saradnici su 20 godina pratili 107 pacijenata sa dijagnostikovanim displazijama larinksa. Došli su do zaključka da 15,9% pacijenata sa dijagnostikovanom displazijom niskog gradusa, 12,1% pacijenata sa dijagnostikovanom displazijom srednjeg gradusa, i 23,4% pacijenata sa dijagnostikovanom displazijom visokog gradusa oboli od karcinoma larinksa (103). Iz navedenih studija se može zaključiti da za viši gradus displazije postoji veći rizik za progresiju u skvamocelularni karcinom. Luers i saradnici su 2014. godine nakon deset godina praćenja grupe od 70 pacijenata zaključili da ne postoji statistički značajna korelacija između gradusa displazije i rizika od progresije bolesti u skvamocelularni karcinom (104), što je dijametralno suprotno od svih dosadašnjih istraživanja rađenih na tu temu. U svom sistematskom pregledu dostupne literature, Van Hulst i saradnici su objavili da je rizik od progresije u skvamocelularni karcinom od 0 do 41,7% za displaziju niskog gradusa, od 0 do 48% za displaziju srednjeg gradusa, od 14,3 do 44,4% za displaziju visokog gradusa i od 11,1 do 75% za karcinom *in situ* (105). Vremenski period potreban za progresiju bolesti od displazije do skvamocelularnog karcinoma iznosi od 25 do 65 meseci za displazije niskog gradusa, od 17 do 68 meseci za displazije srednjeg gradusa i od 10 do 192 meseca za displazije visokog gradusa i karcinom *in situ* (103).

Lečenje i prevencija displazija larinksa

Lečenje displazija larinksa je isto kao lečenje karcinoma glotisa u ranoj fazi (106). Za slučajeve displazije niskog i srednjeg gradusa preporučuje se kliničko praćenje pacijenta i eventualno ponavljanje biopsije (105). Kada su u pitanju displazije visokog gradusa preporučuje se hirurško lečenje. U najvećem broju evropskih zemalja, lezija se uklanja metodom transoralne laserske mikrohirurgije. U Sjedinjenim Državama se umesto transoralne laserske mikrohirurgije praktikuje korišćenje angiolitičkih lasera (106). Ukoliko nakon hirurške intervencije dođe do recidiva bolesti, ili ako kod pacijenta postoje multiple promene, u terapiju se uvode i radioterapijski protokoli (107). Radioterapija se takođe primenjuje kod pacijenata kod kojih postoji ozbiljan rizik za uvođenje u anesteziju i kod pacijenata koji ne mogu da prekinu sa pušenjem (107). Pojedini autori čak i preferiraju radioterapiju, jer je nakon radioterapije značajno niža pojava perzistentne disfonije nego nakon laserske hirurgije (108). Nakon terapijske intervencije, neophodno je praćenje pacijenata. Preporuke su da se pacijenti sa displazijom niskog ili srednjeg gradusa prate najmanje 6 meseci, a da se pacijenti sa displazijom visokog gradusa prate 5 godina (109). U poslednje vreme se koristi metformin u terapiji displazija larinksa. Metformin se uzima pre i posle operacije, utiče na metabolizam tumorske mikrosredine i nakon primene metformina recidivi displastičnih lezija larinksa su ređi (110). Po svim literaturnim podacima, prestanak pušenja je najvažniji faktor prevencije za nastanak prekanceroznih lezija larinksa, kao i za sprečavanje nastanka recidiva nakon tretmana displazije (111).

1.3.5. Skvamocelularni karcinom larinksa

Skvamocelularni karcinom je maligni tumor epitela koji ima skvamoznu diferencijaciju (1). Skvamocelularni karcinom larinksa je drugi po učestalosti maligni tumor respiratornog trakta, odmah iza karcinoma pluća (1, 2) i predstavlja petinu svih malignih tumora regije glave i vrata (3). Sirova stopa oboljevanja od karcinoma larinksa u svetu je 4,1 na 100000 za muškarce i 0,63 na 100000 za žene (4). Prema poslednjim dostupnim podacima, za 2014. godinu, u centralnoj Srbiji je sirova stopa oboljevanja za muškarce bila 3,3 na 100000 a za žene 0,5 na 100000. U 2014. godini u centralnoj Srbiji, kod muškaraca je postavljeno 400 patohistoloških dijagnoza karcinoma larinksa, od 460 prijavljenih slučajeva (87%), a kod žena je postavljena 51 patohistološka dijagnoza skvamocelularnog karcinoma larinksa, od ukupno prijavljenog 61 slučaja (83%) (5). Skvamocelularni karcinom larinksa nastaje najčešće posle šezdesete godine (112), a najveći broj obolelih je u osmoj deceniji života (113). Postoje podaci da su zabeleženi slučajevi skvamocelularnog karcinoma larinksa i u dečijem uzrastu (114). Muškarci češće oboljevaju od žena (115), ali je poslednjih godina sve više žena obolelih od skvamocelularnog karcinoma larinksa, što se pripisuje, pre svega povećanoj prevalenciji pušenja duvana u ženskoj populaciji (116). Po poslednjim podacima, petogodišnje preživljavanje je 63%, što je za 2% manje od petogodišnjeg preživljavanja pre 40 godina (117).

Glavni faktori rizika za nastanak skvamocelularnog karcinoma larinksa su pušenje cigareta i konzumacija alkohola. Dužina pušačkog staža i broj popušanih cigareta povećavaju rizik od nastanka skvamocelularnog karcinoma larinksa. Umereni pušači imaju 10 do 15 puta povećan rizik nego nepušači, a teški pušači imaju čak 30 puta veći rizik nego nepušači (118, 119). Kod bivših pušača, tek nakon 15 godina od prestanka pušenja rizik od nastanka skvamocelularnog karcinoma larinksa se izjednačava sa rizikom kod nepušača (119).

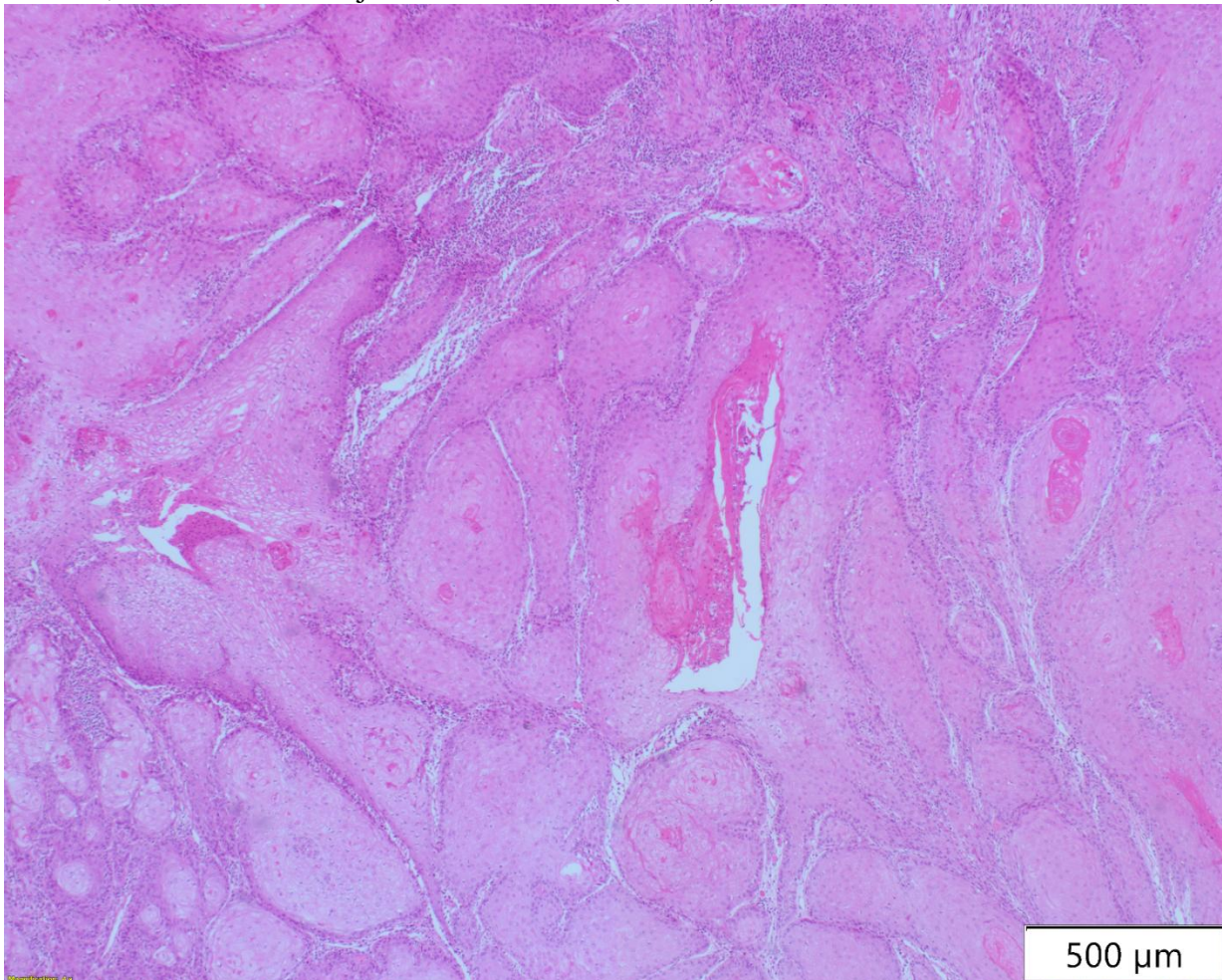
Konzumacija alkohola je značajan faktor rizika, ali ipak manje značajan nego pušenje. Rizik za nastanak karcinoma larinksa je 3,8 puta veći kod pušača nego kod teških alkoholičara (konzumacija više od 8 pića tokom dana) nepušača (120). Dokazano je da konzumacija alkohola i pušenje cigareta imaju kumulativni efekat za povećanje rizika od nastanka skvamocelularnog karcinoma larinksa (120). Osim duvanskog dima i alkohola, postoji još manje značajnih faktora rizika. Izloženost azbestu je faktor rizika i zaključeno je da je potrebno bar 27 godina izloženosti azbestu za nastanak skvamocelularnog karcinoma larinksa i da je prosečno vreme od prvog izlaganja azbestu do pojave klinički manifestnog tumora u proseku 30 godina (121). Profesionalna izloženost agensima poput policikličkih aromatičnih ugljovodonika i prašine koja se stvara u tekstilnoj industriji takođe povećava rizik za nastanak skvamocelularnog karcinoma larinksa (122). Konzumacija crvenog mesa predstavlja faktor rizika, dok unošenje namirnica koje su bogate biljnim vlaknima ima protektivan efekat (123, 124). U jednoj metaanalitičkoj studiji, u kojoj su obrađeni podaci skupljeni od 1964. do 2015. godine, zaključeno je da je 30% skvamocelularnih karcinoma larinksa povezano sa infekcijom HPV (125). Druge studije su pokazale da je uloga HPV u kancerogenezi karcinoma larinksa nejasna, jer metodi detekcije HPV korišćeni u prethodnim studijama (detekcija p16 u tumorskom tkivu) ne ukazuje na povezanost tumora sa prisustvom humanog papiloma virusa (126, 127). Postoje različita mišljenja o gastroezofagealnom refluksu kao faktoru rizika za nastanak skvamocelularnog karcinoma larinksa. Jedna studija je pokazala da gastroezofagealni refluks nije faktor rizika (84), dok je druga studija novijeg datuma pokazala da postoji umerena povezanost između gastroezofagealnog refluksa i nastanka prekanceroznih lezija i skvamocelularnog karcinoma larinksa. (85).

Skvamocelularni karcinom larinksa se najčešće javlja u supraglotisnoj regiji larinksa, potom u glotisnoj regiji i najređe u subglotisnoj regiji larinksa (128). Simptomi zavise od regije u kojoj se tumor nalazi. Tumori koji se nalaze u glotisnoj regiji manifestuju se simptomima poput promuklosti u ranom stadijumu bolesti (113). Za razliku od tumora glotisne regije, tumori supraglotisne regije postaju simptomatski u kasnijem stadijumu bolesti i obično se manifestuju bolom, disfagijom i promuklošću

(113). Makroskopski izgled skvamocelularnog karcinoma larinksa je nespecifičan. Može izgledati kao ravan tumor izdignutih ivica, kao egzofitni, endofitni, ili papilarni tumor, sa ulceracijom ili bez nje (129).

Patohistološka slika

Skvamocelularni karcinom je tumor koji ima skvamoznu diferencijaciju i ima invazivni rast. Osobine skvamozne diferencijacije su prisustvo keratinizacije (sa formiranjem keratinskih perli ili bez njih) i prisustvo intercelularnih mostova (1). Znaci invazije su narušen integritet bazalne membrane, odnosno prisustvo pojedinačnih tumorskih ćelija, grupa tumorskih ćelija i ostrva tumorskih ćelija u subepitelnoj stromi (130). Invaziju prate poremećaji arhitekture strome poput dezmoplastične reakcije strome na tumorske ćelije, ili stvaranje granulomatozne reakcije na keratin sa prisustvom džinovskih multijedarnih ćelija tipa oko stranog tela (30). Znaci invazije su i prisustvo tumorskih ćelija u krvnim sudovima (intravaskularna invazija) i prisustvo tumorskih ćelija oko nerava (perineuralna invazija) (30). Skvamocelularni karcinom larinksa se gradira na dobro diferentovani, srednje diferentovani i loše diferentovan prema sličnosti sa normalim epitelom, stepenu ćelijskog pleomorfizma, broju mitoza i prisustvu patoloških mitoza (1). Dobro diferentovani karcinom po morfološkim osobinama liči na normalan pločasto-slojeviti epitel. Sastoji se od velikih keratinocita sa obilnom eozinofilnom citoplazmom, bazalnih ćelija koje su obično raspoređene po periferiji tumora; prisutni su međućelijski mostovi, fokusi keratinizacije i mitoze su retke (Slika 7).



Slika 7: Dobro diferentovani skvamocelularni karcinom larinksa (HEx40)

Prisustvo keratinizacije nije ključan patohistološki znak koji ukazuje na dobro diferentovani skvamocelularni karcinom larinksa (1). U srednje diferentovanom skvamocelularnom karcinomu se uočava izraženiji ćelijski pleomorfizam, fokusi keratinizacije su ređi, mitoze su brojnije, a uočavaju se i patološke mitoze (1). U slabo diferentovanom skvamocelularnom karcinomu se uočava još izraženiji ćelijski pleomorfizam, ćelije izgleda bazalnih ćelija su jako brojne, ili dominiraju, fokusi keratinizacije su retki, ili ih nema uopšte, međućelijski mostovi su retki, ili ih nema uopšte, mitoze su jako brojne bilo patološke, bilo normalne (1).

Imunohistohemijski markeri

Ne postoje imunohistohemijski markeri koji su specifični za skvamocelularni karcinom larinksa (1). Skvamocelularni karcinom larinksa eksprimira citokeratine i obrazac ekspresije citokeratina zavisi od stepena diferencijacije tumora (130). Dobro diferentovani karcinomi ekspimiraju citokeratine koje eksprimira i normalan pločasto slojeviti epitel larinksa (citokeratini visoke molekularne težine) dok slabo diferentovani karcinomi pokazuju ekspresiju citokeratina niske molekularne težine (131). Smatra se da tumori sa većim procentom ćelija pozitivnih na Ki-67 (viši proliferativni indeks) češće metastaziraju u limfne čvorove (132). P16 može da bude pozitivan u skvamocelularnom karcinomu larinksa, ali je dokazano da ne ukazuje na prisustvo HPV u tumorskim ćelijama (126, 127). U jednoj studiji je uočeno da se EGFR više eksprimira u tumorima koji su slabije diferentovani i da je ekspresija EGFR povezana sa kraćim preživljavanjem (133). Uočeno je da se CK17 eksprimira u skvamocelularnom karcinomu larinksa, ali se ne eksprimira u normalnom epitelu larinksa, pa je CK17 predložen kao potencijalni dijagnostički marker (134).

Patohistološki prognostički parametri.

Diferencijacija

Postoje različita mišljenja o značaju diferencijacije skvamocelularnog karcinoma larinksa. Postoje stavovi da su slabije diferentovani tumori agresivnijeg biološkog ponašanja, dok istovremeno postoje stavovi da diferencijacija ne utiče na biološko ponašanje tumora. Glavni kamen spoticanja je vrlo subjektivno određivanje gradusa karcinoma (1)

Invazivni front tumora

Tumor može da raste infiltrativno, ekspanzivno ili da pokazuje kombinaciju ova dva tipa rasta. Smatra se da bolju prognozu imaju tumori koji rastu ekspanzivno (ostrva tumorskog tkiva koja pokazuju vrlo jasno definisanu granicu u odnosu na okolno tkivo) (135, 136).

Vaskularna i perineuralna invazija

Vaskularna invazija predstavlja prisustvo tumorskih ćelija u krvnim i limfnim sudovima dok perineuralna invazija predstavlja prisustvo tumorskih ćelija u nervu i/ili okolini nerva. Tumori u kojima postoji vaskularna i perineuralna invazija češće recidiviraju i češće metastaziraju u limfne čvorove i češće daju udaljene metastaze (1).

Ekstrakapsularno širenje metastaza iz limfnimih čvorova

Ekstrakapsularno širenje je penetracija tumora kroz kapsulu limfnog čvora u okolno tkivo i može biti makroskopsko (vidljivo golim okom) i mikroskopsko (vidljivo isključivo pod mikroskopom) (137). Pojava ekstrakapsularnog širenja predstavlja loš prognostički faktor, jer karcinomi sa ekstrakapsularnim širenjem metastaza imaju veću stopu rekurencije i češće daju udaljene metastaze (1).

Linije resekcije

Čistim linijama resekcije se smatraju linije resekcije na kojima nema invazivnog karcinoma, karcinoma *in situ* niti displazije (1). Postoje različita mišljenja o dovoljnoj udaljenosti linija resekcije od tumora. Neki autori smatraju da je dovoljno da linije resekcije budu udaljene 5mm od tumora, dok drugi autori smatraju da je dovoljna udaljenost od tumora 2mm (1). Po našem saznanju ne postoji imunohistohemijski marker koji bi se mogao koristiti za određivanje linija resekcije. Čiste linije resekcije se smatraju boljim prognostičkim faktorom i pacijenti sa tumorima koji nisu bili na linijama resekcije duže preživljavaju, a kod takvih pacijenata su ređi recidivi tumora (138).

Klinički prognostički faktori

Stadijum

Stadijum tumora je najvažniji prognostički faktor za skvamocelularni karcinom larinksa i stadijumi se određuju na osnovu TNM klasifikacije (139).

TNM klasifikacija tumora larinksa (139)

T Primarni tumor

Tx Ne može se proceniti da li ima tumora

T0 Nema dokaza o postojanju primarnog tumora

Tis *carcinoma in situ*

Supraglotis

T1 Tumor ograničen na jedno mesto u supraglotisu, uz normalnu pokretljivost glasne žice

T2 Tumor invadira mukozu više od jednog dela supraglotisa ili glotisa, ili regiona izvan supraglotisa (npr. mukozu baze jezika, vaskulu ili medijalni zid piriformnog sinusa), a da pri tom ne fiksira larinks.

T3 Tumor ograničen na larinks i fiksira glasne žice i/ili invadira bilo šta od sledećeg: postkrikoidni region, pre-epiglotisni prostor, paraepiglotisni prostor, unutrašnji korteks tiroidne hrskavice.

T4a Tumor probija tiroidinu hrskavicu i/ili invadira tkivo izvan larinksa, npr. traheju, meka tkiva vrata uključujući duboke/spoljašnje mišiće jezika, štitnu žlezdu, ezofagus

T4b Tumor invadira prevertebralni prostor, ili strukture medijastinuma ili obavija karotidnu arteriju.

Glotis

T1 Tumor ograničen na glasnu žicu(e) (može da zahvata anteriornu ili posteriornu komisuru), uz normalnu pokretljivost glasne žice.

T1a - Tumor zahvata jednu glasnu žicu.

T1b- Tumor zahvata obe glasne žice.

T2 Tumor se širi na supraglotis i/ili subglotis sa ili bez poremećene pokretljivosti glasne žice.

T3 Tumor ograničen na larinks sa fiksiranjem glasne žice i/ili invadira supraglotisni prostor i/ili unutrašnji korteks tiroidne hrskavice.

T4a Tumor probija spoljašnji korteks tiroidne hrskavice i/ili invadira tkivo izvan larinksa, npr. traheju, meka tkiva vrata uključujući duboke/spoljašnje mišiće jezika, štitnu žlezdu, ezofagus.

T4b Tumor invadira prevertebralni prostor ili strukture medijastinuma ili obavija karotidnu arteriju.

Subglotis

T1 Tumor ograničen na subglotis

T2 Tumor se širi na glasnu žicu(e), koje su očuvane ili poremećene pokretljivošću.

T3 Tumor ograničen na larinks sa fiksiranim glasnim žicama.

T4a Tumor probija krikoidnu ili tiroidinu hrskavicu i/ili invadira tkivo izvan larinksa, npr. traheju, meka tkiva vrata uključujući duboke/spoljašnje mišiće jezika, štitnu žlezdu, ezofagus

T4b Tumor invadira prevertebralni prostor ili strukture medijastinuma ili obavija karotidnu arteriju.

N – Regionalni limfni čvorovi (limfni čvorovi vrata)

NX Ne mogu se proceniti regionalni limfni čvorovi

NO Nema metastaza u regionalnim limfnim čvorovima

N1 Metastaza u jednom ipsilateralnom limfnom čvoru čiji je najveći prečnik ≤ 3 cm

N2 Metastaze opisane ipod kao N2a, N2b, ili N2c

N2a Metastaza u jednom ipsilateralnom limfnom čvoru čiji je najveći prečnik veći od 3cm, a ≤ 6 cm.

N2b Metastaze u multiplim ipsilateralnim limfnim čvorovima čiji je najveći prečnik ≤ 6 cm.

N2c Metastazeu bilateralnim ili kontralateralnim limfnim čvorovima čiji je najveći prečnik ≤ 6 cm.

N3 Metastaze u limfnom čvoru čiji je najveći prečnik veći od 6cm.

Napomena: Limfni čvorovi srednje linije se smatraju ipsilateralnim

M – Udaljene metastaze

M0 Bez udaljenih metastaza

M1 Prisutne udaljene metastaze

Stadijumi

Stadijum 0	Tis	N0	M0
Stadijum I	T1	N0	M0
Stadijum II	T2	N0	M0
Stadijum III	T1-2	N1	M0
	T3	N0-1	M0
Stadijum IVA	T1-3	N2	M0
	T4a	N0-2	M0
Stadijum IVB	T4b	bilo koji N	M0
	Bilo koji T	N3	M0
Stadijum IVC	Bilo koji T	bilo koji N	M1

Lokalizacija.

Lokalizacija tumora predstavlja bitan prognostički faktor. Karcinom može biti lokalizovan u supraglotisnoj, glotisnoj i subglotisnoj regiji.

Skvamocelularni karcinom supraglotisne regije

Skvamocelularni karcinom supraglotisne regije zahvata strukturu supraglotisa: epiglotis (laringealnu i lingvalnu površinu), ariepiglotični nabor, aritenoide, lažne glasne žice i ventrikule (30). Ovi karcinomi predstavljaju oko 35% svih skvamocelularnih karcinoma larinksa (30). Najčešće se prezentuju kao ulcerisan tumor koji može da bude ravan, egzofitan, ređe papilarni, a patohistološki je najčešće srednje ili loše diferentovan (30). Najčešće se širi u preepiglotisni prostor, piriformni sinus, ili prema bazi jezika, a retko invadira tiroidnu hrskavicu (1). S obzirom da se u supraglotisnom regionu nalazi bogata mreža limfnih sudova, skvamocelularni karcinomi ove regije imaju visok potencijal da metastaziraju u limfne čvorove dok je tumor još uvek u ranom stadijumu (30). Prosečno petogodišnje preživljavanje sa skvamocelularnim karcinomom supraglotisne regije je između 65% i 75% (140).

Skvamocelularni karcinom glotisne regije

Skvamocelularni karcinom larinksa glotisne regije zahvata strukturu glotisa: prave glasne žice, prednje i zadnje komisure (30). Glotis je najčešće mesto na kome se javlja karcinom larinksa i oko 60%-65% karcinoma se javlja u ovoj regiji (30). Makroskopski, tumori ove regije nisu veliki, a patohistološki su najčešće dobro, ili srednje diferentovani (30). Skvamocelularni karcinomi regije glotisa su najčešće lokalizovani na jednoj glasnoj žici, mada u višim stadijumima bolesti mogu da se prošire na suprotnu glasnu žicu, u supraglotis, ili subglotis, a mogu i da probiju tiroidnu hrskavicu i da invadiraju meka tkiva vrata (1). U T1 stadijumu skvamocelularni karcinom glotisne regije ima odličnu prognozu i petogodišnje preživljavanje je između 82% i 96%. U stadijumu T2 petogodišnje preživljavanje je nešto niže i iznosi 51% do 85%, u stadijumu T3 je petogodišnje preživljavanje 48%-59%, a u stadijumu T4 je od 0% do 30% (141, 30).

Skvamocelularni karcinom subglotisne regije

Skvamocelularni karcinom subglotisne regije je karcinom koji zahvata region koji počinje 1cm ispod vrha ventrikule i pruža se do ivice krikoidne hrskavice. Ova lokalizacija karcinoma je najređa i do 5% karcinoma larinksa se javlja u ovoj oblasti (30). Karcinomi subglotisne regije su obično veliki i duže vreme su asimptomatski, dok se ne prezentuju simptomima opstrukcije vazdušnih puteva (30). Patohistološki su najčešće slabo diferentovani skvamocelularni karcinomi (30). Karcinomi ove regije se obično šire u zid traheje, štitnu žlezdu i ezofagus (1). Karcinomi ove regije imaju najgoru prognozu i petogodišnje preživljavanje iznosi od 0-40% (30).

Ostali faktori

Faktori koji mogu da imaju uticaj na prognozu su na prvom mestu starost pacijenta (142), potom komorbiditeti (143), opšte stanje pacijenta (142), prestanak pušenja i konzumacije alkohola (144).

Klinička slika skvamocelularnog karcinoma larinksa

Simptomi karcinoma larinksa su različiti i zavise od anatomske lokalizacije tumora (145). S obzirom da tumori supraglotisne lokalizacije češće metastaziraju i da se klinički prezentuju u uznapredovalom stadijumu bolesti, klinički se manifestuju kao tumefakcija na vratu, prigušenjem glasa, simptomima disfagije i u slučajevima kada je tumorska masa veća, simptomima opstrukcije disajnih puteva (145). Tumori glotisne lokalizacije se obično otkrivaju u ranom stadijumu, pa su prvi simptomi koje daju uglavnom vezani za promene glasa - trajna promuklost (145). Često se javljaju i bol u uvu, hronični kašalj, stridor, disfagija i hemoptizije. Tumori subglotisne lokalizacije se klinički manifestuju simptomima opstrukcije disajnih puteva (145).

Dijagnostika skvamocelularnog karcinoma larinksa

Laringoskopija fleksibilnim laringoskopom, iako dosta potcenjena, metoda je izbora kojom se najbolje vizuelizuje larinks (146). Rezultati dobijeni ovom metodom su komplementarni rezultatima dobijenim rigidnom laringoskopijom, a prednosti ove metode su to što ne zahteva uvođenje pacijenta u totalnu anesteziju (radi se u lokalnoj anesteziji), a dobije se uvid u pokretljivost glasnih žica, što nije slučaj sa endoskopijom rigidnim laringoskopom (146). Metodom laringoskopije rigidnim laringoskopom se uzima biopsija lezije. Laringoskopija rigidnim laringoskopom se obavlja u opštoj anesteziji i treba da je obavlja hirurg uz pomoć anesteziologa. Hirurg može proceniti da li se transoralnim putem može ukloniti lezija, a anesteziolog može proceniti da li su potrebne dodatne anesteziološke mere poput jet-ventilacije(146).

Neophodan je i radiološki pregled pacijenta koji uključuje snimanje pacijenta metodama kompjuterizovane tomografije (CT) ili magnetnom rezonancijom (MR), koja je bolji izbor za procenu invazije hrskavice (146). Neophodno je uraditi i rendgenski snimak grudnog koša zbog otkrivanja potencijalnih metastaza.

Na osnovu patohistološkog nalaza, pregleda laringoskopom i radioloških nalaza, tim lekara odlučuje o najboljim opcijama za lečenje pacijenta.

Terapija skvamocelularnog karcinoma larinksa

Terapija skvamocelularnog karcinoma larinksa u ranom stadijumu (T1i T2)

Stadijumi T1 i T2 se smatraju ranim stadijumima skvamocelularnog karcinoma larinksa (146). Karcinomi u T2 stadijumu imaju veći mogućnost rekurencije (146). Terapijski modaliteti koji se koriste u ranom stadijumu skvamocelularnog karcinoma larinksa su transoralna laserska mikrohirurgija (TLM) ili radio terapija (RT), ili kombinacija ova dva terapijska modaliteta (146). Odabrali najbolji terapijski pristup nije lako i postoje velike dileme pri odabiru optimalnog terapijskog pristupa. Najbolji terapijski pristup treba da omogući najduže preživljavanje i da nakon njega funkcije glasa i gutanja budu najoptimalnije očuvane. Postoje podaci da je petogodišnje preživljavanje vrlo slično nakon radioterapije kao jedine terapijske procedure u odnosu na lasersku mikrohirurgiju kao jedini terapijski modalitet (147). U studijama je procenjivan i kvalitet glasa i ocenjeno je da je kvalitet glasa bolji nakon radioterapije kao terapije izbora (148). U poslednje vreme su ovi rezultati dovedeni u pitanje. U jednoj studiji novijeg datuma upoređeno je petogodišnje preživljanje nakon radioterapije kao jedinog terapijskog modaliteta i hirurgije kao jedinog terapijskog modaliteta i kombinacije hirurgije i radioterapije. Došlo se do zaključka da je petogodišnje preživljavanje bolje nakon TLM (90%) nego

nakon radioterapije (83%) a da postoji vrlo mala razlika u petogodišnjem preživljavanju između TLM (90%) i kombinacije TLM i RT (91%) (149). Mnoge studije koje se bave ovom problematikom su u toku i izgledno je da će se u budućnosti pronaći optimalan tretman skvamocelularnog karcinoma u ranom stadijumu.

Terapija skvamocelularnog karcinoma u T3 stadijumu

Postoji nekoliko terapijskih opcija za lečenje skvamocelularnog karcinoma u stadijumu T3. Ove opcije obuhvataju totalnu laringektomiju, koja je do sredine osamdesetih bila terapija izbora, zatim, radioterapiju, hemioterapiju ili neku od kombinacija ovih terapijskih modaliteta (146). Najveća dilema oko izbora terapije je naći optimalnu terapijski pristup koji će obezbediti najduže preživljavanje i najbolji kvalitet života. U nekoliko studija koje su istraživale stavove pacijenata izvedeni su zaključci da je pacijentima bitniji kvalitet života u odnosu na dužinu preživljavanja (150, 151). Kombinovana radioterapija sa primenom hemioterapeutika, ili sa primenom Cetuksimaba (monoklonalno antitelo koje blokira receptor za epidermalni faktor rasta (eng Epidermal Growth Factor Receptor – EGFR)), daje najbolje rezultate u očuvanju funkcije larinksa, dok je nakon totalne laringektomije najbolje petogodišnje preživljavanje (146). Totalna laringektomija je terapija izbora za pacijente koji imaju poremećaj funkcije larinksa i farinksa i fiksiranu glasnu žicu (146). Za pacijente kojima bolest nije diseminovana na strukture vrata, adjuvantna terapija nije potrebna (146). Neinvazivna terapija koja podrazumeva kombinaciju radioterapije sa Cetuksimabom je metod izbora za pacijente koji imaju bolest lokalizovanu na larinks, bez infiltracije hrskavice, bez opstrukcije vazdušnih puteva, koji su dobrog opšteg stanja, bez komorbiditeta (146).

Terapija skvamocelularnog karcinoma u T4 stadijumu

Terapija izbora za skvamocelularni karcinom larinksa u T4 stadijumu je laringektomija (146). Radioterapija ne utiče na tumore koji su invadirali hrskavicu. Opcije su ili parcijalna laringektomija kod manjih tumora, ili totalna laringektomija za veće tumore (146).

1.4. Citokeratini

Citokeratini su grupa strukturnih proteina koji se nalaze u epitelu. To su heteropolimeri koji se sastoje od parova intermedijarnih filamenata. Intermedijarni filamenti su jedna od tri glavne grupe citoskeletnih filamenata kod viših eukariota. Naziv "intermedijarni" se odnosi na njihovu dužinu od 10nm, jer se po dužini nalaze između mikrofilamenta (u koje spada aktin), koji imaju dužinu od 6-8nm i mikrotubula koji imaju dužinu preko 25nm (152). Citokeratini su brojna porodica proteina i postoje čak 54 gena koji enkodiraju citokeratine (153). Citokeratini imaju vrlo precizno definisan obrazac ekspresije. Postoje citokeratini koji se ekspimiraju samo u određenim stadijuma diferencijacije epitelne ćelije, ili samo u određenom tipu epitela (154). Najvažnija uloga citokeratina je održavanje strukturnog integriteta ćelija, ali osim toga, učestvuju u mnogim drugim važnim procesima poput regulisanja mnogobrojnih procesa na subćelijskom nivou; učestvuju u zarastanju rana i utiču na apoptozu (154). Na osnovu molekularne težine dele se na citokeratine visoke i niske molekularne težine, a na osnovu izoelektrične tačke se dele na kisele i bazne. Uglavnom se javljaju u paru, kiseli sa baznim, ili citokeratin niske molekularne težine sa citokeratinom visoke molekularne težine. Citokeratini 9 do 19 su intermedijarni filamenti tipa I, kiselog su tipa i imaju malu molekularnu težinu koja iznosi od 40 do 56,6kDa. Keratini od 1 do 8 su bazni, pripadaju intermedijarnim filamentima tipa II i imaju veliku molekularnu težinu koja iznosi od 53 do 68kDa (155). U našem istraživanju smo ispitivali ekspresiju CK8, CK10, CK13 i CK17.

1.4.1. Citokeratin 8

Citokeratin 8 (CK8) je primarni citokeratin prostih, jednorednih epitela i nalazi se u paru sa citokeratinom 18 (CK18). Nalazi se u epitelnim ćelijama koje su sa jedne strane u kontaktu sa ekstracelularnim matriksom, a sa druge strane u kontaktu sa lumenom duktusa, ili sa spoljašnjom površinom (156). Smatra se da su upravo CK8 i CK18 prvi citokeratini koji su se pojavili u procesu evolucije, a ujedno su i prvi citokeratini koji se sintetišu u embrionu, pre procesa implantacije embriona (157). Geni koji enkodiraju CK8 nalaze se na hromozomu 12, što ga, uz CK18, razlikuje od ostalih intermedijarnih filamenata tipa I za koje se geni koji ih enkodiraju nalaze na hromozomu 7 (152). CK8/18 se ekspimiraju u cilindričnom epitelu koji oblaže duktuse, crevnom epitelu i mezotelu, ali nisu jedini par citokeratina koji se ekspimiraju u navedenim ćelijama. U hepatocitima, acinusnim ćelijama pankreasa i epitelnim ćelijama proksimalnih tubula bubrega CK8/18 postoje kao jedini par keratina (154). CK8/CK18 se mogu fokalno ekspimirati u suprabazalnom sloju nekeratinizujućeg pločastoslojevitog epitela (158). Osim u epitelnim ćelijama, CK8/CK18 se mogu ekspimirati i u mezenhimalnim ćelijama poput glatkomišićnih ćelija i fibroblasta u limfnim čvorovima (159). Primarna uloga CK8/18 nije održavanje strukturnog integriteta (160), ali njihove uloge su veoma značajne. CK8/CK18 imaju protektivnu ulogu u hepatocitima. Čuvaju hepatocite od oštećenja i stresa tako što se ponašaju kao fosfatni "sunderi" i upijaju stresom aktivirane kinaze (161). Imaju jako bitnu ulogu u očuvanju funkcije placentne barijere, tako što sprečavaju apoptozu indukovanu TNF-om (eng. Tumor Necrosis Factor) džinovskih ćelija trofoblasta (162). CK8 i CK18 osim što sprečavaju apoptozu trofoblastnih ćelija, sprečavaju i apoptozu hepatocita indukovanu preko FAS ili TNF (163). Fosforilisani CK8 i CK18 se vezuju za 14-3-3 adaptivne proteine i na taj način imaju neku od regulatornih uloga u procesu ćelijskog ciklusa (160). Iako se ne ekspimiraju u pločastoslojevitom epitelu bez patoloških promena, ekspresija CK8 je uočena u skvamocelularnom karcinomima mnogih regija. U skvamocelularnom karcinomu larinksa je uočena povećana ekspresija mRNA CK8 (164). U karcinomima orofaringealne regije, povećana imunohistohemijska ekspresija CK8 i korelira sa višim stadijumom tumora i većom dubinom invazije (165). CK8 se pokazao kao dobar imunohistohemijski marker za dijagnostikovanje skvamocelularnog karcinoma i displazija cerviksa uterusa. CK8 se

ekspirira u većem broju ćelija u leziji kako raste gradus lezije od CINI ka skvamocelularnom karcinomu (166). Prema našim saznanjima, imunohistohemijska ekspresija CK8 nije ispitivana do sada u benignim i malignim lezijama larinksa.

1.4.2. Citokeratin 10

Citokeratin 10 (CK10) je intermedijarni filament tipa I, koji se ekspirira u keratinocitima suprabazalnog sloja epiderma koji su izgubili mitotsku aktivnost. Nalazi se u paru sa citokeratinom tipa 1 i ovaj par citokeratina se smatra citokeratinima procesa diferencijacije i keratinizacije (160). Ova dva keratina prave guste snopove koji su karakteristični za suprabazalne slojeve epitela i obezbeđuju čvrstinu epitela. (154). U neizmenjenom pločastoslojevitom epitelu larinksa, samo su retke, pojedinačne suprabazalne ćelije pozitivne na CK10 (167). Osim davanja čvrstine epitelu, smatra se da CK10 ima i druge uloge. CK10 inhibira proliferaciju keratinocita i njihovu progresiju kroz ćelijski ciklus preko signalnog puta koji je zavistan od retinoblastomskog gena. Nagađa se da CK10 privremeno sprečava ćelijsku smrt keratinocita, da bi keratinociti mogli da završe proces diferencijacije (160). Mutacije gena za CK10 imaju značajnu ulogu u patogenezi epidermolitične keratoze, kožnog oboljenja koje se karakteriše stvaranjem bula (168). Poremećaj ekspresije CK10 je uočen u mnogim malignim i premalignim lezijama epiderma. Gubitak imunohistohemijske ekspresije CK10 u keratinocitima ukazuje na malignu alteraciju akničnog heilitisa (169). Povišena ekspresija mRNK CK10 je uočena u skvamocelularnom karcinomu larinksa. (164). U skvamocelularnim karcinomima oralne regije je gubitak imunohistohemijske ekspresije CK10 prediktor distalnih metastaza, a povišena ekspresija CK10 ukazuje na niži gradus karcinoma. (165). Gubitak ekspresije CK10 u keratinocitima ukazuje na malignu transformaciju epitela cerviksa uterusa (166).

1.4.3. Citokeratin 13

Citokeratin 13 (CK13) je intermedijarni filament tipa I i u paru sa citokeratinom 4 predstavlja citokeratine mukozne diferencijacije. Ekspirira se homogeno i jednakim intenzitetom u svim slojevima epitela osim u bazalnim ćelijama. Homogeno i jednakim intenzitetom se ekspirira i u urotelu, osim u kišobranskim ćelijama (eng. – umbrella cells). CK13 se ne ekspirira u epidermu i adneksalnim strukturama epiderma (154). Deficijencija CK13 je uzrok nastanka belog sunderastog nevusa (eng. white sponge nevus), benigne lezije oralne mukoze koja se klinički manifestuje sunderastim lezijama mukoze bele boje (170). Na osnovu istraživanja uloge CK13 u patogenezi belog sunderastog nevusa, zaključeno je da je CK13 neophodan za održavanje strukturnog integriteta epitela, da ima funkciju u imunološkim procesima, zatim da ima ulogu u procesu diferencijacije epitela, regulisanju metaboličkih procesa i da ima bitnu funkciju u regulisanju aktivnosti kinaza koje se aktiviraju kao odgovor na stres (170). Zaključeno je da ćelije u kojima nema ekspresije CK13 imaju veliku predispoziciju da krenu u nekontrolisanu hiperproliferaciju (170). Zaključeno je da nedostatak CK13 utiče na povećanu aktivnost ciklina E1 i E2 (171). Ciklin E se vezuje za Cdk2 u G1 fazi. Ciklin E/Cdk2 kompleks fosforiliše p27Kip1 (inhibitor ciklina D). Fosforilisani p27Kip1 se degradira, što dovodi do povećanja ekspresije ciklina A u procesu progresije u S fazu ćelijskog ciklusa (172). Poremećaj ekspresije CK13 je uočen u displazijama i skvamocelularnim karcinomima koji nastaju iz nekeratinizujućeg epitela. U skvamocelularnom karcinomu larinksa je detektovana delecija gena za CK13 LOH analizom. Pretpostavljeno je da CK13 ima ulogu tumorskog supresora (173). U karcinomima i displazijama oralne regije je detektovan gubitak imunohistohemijske ekspresije CK13 (174, 175, 165). U jednoj studiji je detektovan gubitak ekspresije u 89 od 90 skvamocelularnih karcinoma oralne regije i u 35 od 50 slučajeva displazije oralnog epitela. Zaključeno je da gubitak ekspresije u epitelu nije posledica gubitka ekspresije CK13 u ćelijama, već da je posledica povećanog

broja ćelija koje uopšte ne ekspresiraju CK13. U studiji je ispitivana ekspresija više različitih citokeratina među kojima su bili i CK10 i CK17 i zaključeno je da je CK13 najkonstantniji marker sa aberantnom ekspresijom u premalignim i malignim lezijama oralne mukoze (176). Gubitak ekspresije CK13 se pokazao i u lezijama cerviksa uterusa kao dobar dijagnostički marker za razlikovanje normalnog epitela i lezija sa malignim potencijalom (166). Molekularni mehanizmi zbog kojih je ekspresija CK13 snižena u tumorima nisu potpuno jasni, ali se pretpostavlja da važnu ulogu imaju epigenetske alteracije (177).

1.4.4. Citokeratin 17

Citokeratin 17 (CK17) je intermedijarni filament tipa I i smatra se citokeratinom mioepitelnih i bazalnih ćelija. To je citokeratin koji se ekspresira u bazocelularnim karcinomima i pilosebacealnim jedinicama, ali se ne ekspresira u normalnom epidermu (154). Ekspresira se i u znojnim žlezdama, glandularnim strukturama dojke, spoljašnjem delu dlačnog folikula, ali se ne ekspresira u nekeratinizujućem pločastoslojevitom epitelu (178). Citokeratin 17 je prisutan u fetalnom epidermu. (178). U fiziološkim procesima, CK17 se ekspresira u procesu zarastanja rana (179). Počinje da se ekspresira na ivicama rane 12 časova nakon povređivanja, i ekspresija mu je slaba. Nakon 18 sati od povređivanja ekspresija postaje jaka, da bi svoj maksimum dostigla nakon 30 časova od povređivanja (179). Ekspresija CK17 je lokalizovana na ivici povrede (179). Do dvadesete nedelje nakon povređivanja, CK17 se ekspresira u svim slojevima epitela, a nakon 7 meseci od povrede, ekspresija CK se uočava u fokusima suprabazalnog sloja (180).

Otkriveno je da CK17 ima ulogu u procesu inflamacije preko interakcije sa autoimunim regulatorom (autoimuni regulator, eng. Autoimmune regulator, AIRE) (181). Citokeratin 17 je protein koji ima mnoge uloge i uglavnom ih obavlja preko svojih interakcija sa drugim proteinima u citoplazmi (182). Nakon procesa ubikvitinacije, CK17 interaguje sa STAT 3 i stimuliše proces proliferacije ćelije (182). CK17 stimuliše proliferaciju ćelija i preko svoje interakcije sa komponentama signalne kaskade AKT/mTOR (183). U toku fosforilacije CK17 povećava se količina 14-3-3 σ regulatornog proteina u ćeliji koji se vezuje za fosforilisani CK17 i putem AKT/mTOR stimuliše proliferaciju ćelije. Kada se CK17 defosforiliše, 14-3-3 σ se translocira u nukleus gde inhibira process proliferacije ćelije (183). Uočeno je da se količina transkripcionog faktora AIRE povećava u zavisnosti od količine CK17 u ćeliji. AIRE je neophodan za pokretanje procesa tumorigeneze preko Gli-2 (181). Naime, sinteza AIRE mRNK zavisi od interakcije CK17 heterogenog ribonukleinskog proteina hnRNK P. Uočeno je, takođe, da se AIRE i CK17 translociraju u jedro gde se vezuju za specifične promotorske regione koji sadrže NF- κ B sekvencu i tako stimulišu ekspresiju proinflamatornih gena i gena koji stimulišu process ćelijske proliferacije (181). AIRE je neophodan za pokretanje procesa tumorigeneze preko Gli-2 (181). Ovo je jedinstveni primer da citokeratini, koji su inače lokalizovani u citoplazmi mogu da se lociraju u nukleusu (184). Smatra se da je CK17 neophodan za održavanje hnRNP K u citoplazmi (185). hnRNP K je protein za koji se vezuju mRNK. Da bi bio aktivan, potrebno je da se nalazi u citoplazmi, a CK17 je takođe neophodan da bi hnRNPK mogao da reguliše ekspresiju proinflamatornih RNK: CXCL11, CXCL10, CXCL9 koji su ligandi za CXCR3 (185). Interakcija CK17 sa hnRNPK je neophodna za stimulisanje rasta i proliferacije tumora od strane CXCR3. (185). Otkrivena je još jedna funkcija CK17 u ćelijskom jedru. CK17 se preko NLS (signal nuklearne lokalizacije, eng. nuclear localization signal), prenosi iz citoplazme u jedro (186). U jedru se vezuje za p27 tokom trajanja G1 faze, što sprečava da kompleks CDKN1B/P27KIP1 obavlja svoju funkciju zaustavljanja ćelijskog ciklusa (186). Uloga CK17 je ispitivana i u tumorima mezenhimalnog porekla i otkriveno je da CK17 aktivira HIF1 α (faktor 1 α indukovano hipoksijom, eng. hypoxia inducible factor 1 α) i na taj način stimuliše Wartburg-ov metabolički put i proliferaciju ćelija (187). Zapaženo je da CK17 u tumorigenezi sarkoma može imati

ulogu i u stimulisanju procesa epitelno-mezenhimne transformacije preko svoje interakcije sa komponentama AKT/mTOR signalne kaskade (188).

Ekspresija CK17 je uočena u skvamocelularnim karcinomima mnogih regija, ali je uočena i u karcinomima koji ne nastaju od pločastoslojevitog epitela kao i u sarkomima (189).

U skvamocelularnim karcinomima oralne regije je uočeno da je ekspresija CK17 povećana u malignim tumorima u odnosu na displazije i epitel bez patoloških promena (190, 191). U karcinomima oralne regije je povećana ekspresija CK17 u tumoru povezana sa većom stopom rekurencije, ali nije u korelaciji sa dužinom preživljavanja (190).

U karcinomima orofaringealne regije takođe je uočena ekspresija CK17 i pokazalo se da je ekspresija CK17 loš prognostički faktor za skvamocelularni karcinom ove regije (192). Smatra se da je CK17 dijagnostički značajan marker za skvamocelularni karcinom larinksa (134).

U keratinocitima kože se ne eksprimira CK17, ali se zato eksprimira u skvamocelularnom karcinomu kože (193).

U displazijama i skvamocelularnom karcinomu cerviksa uterusa je takođe uočena ekspresija CK17, koji se smatra korisnim dijagnostičkim markerom, ali ne i prognostičkim markerom (194, 195).

Ekspresija CK17 u tumorima ovarijuma (196), adenokarcinomima pluća (197), pankreasa (198), žučne kese (199), planocelularnom karcinomu ezofagusa (200), adenokarcinomu želuca (201) i kolona (202) se smatra lošim prognostičkim znakom i povezana je sa kraćim preživljavanjem i prisustvom metastaza u limfnim čvorovima. Smatra se da bi CK17 mogao da bude meta novih antitumorskih lekova (189).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Ispitivanje i poređenje ekspresije citokeratina 8, 10, 13 i 17 u skvamocelularnom karcinomu larinksa i benignim lezijama larinksa (polip larinksa, papilom larinksa i keratosis papilaris laryngis, displazije epitela larinksa).
2. Ispitati ekspresiju citokeratina 8, 10, 13, i 17 u epitelu oko tumora i utvrditi da li se ekspresija navedenih citokeratina može koristiti za određivanje statusa linija resekcije.
3. Ispitati povezanost ekspresije citokeratina 8, 10, 13 i 17 sa stadijumom tumora, gradusom tumora i sa dubinom invazije tumora.
4. Ispitati povezanost ekspresije citokeratina 8, 10, 13 i 17 sa prisustvom metastaza skvamocelularnog karcinoma larinksa u limfnim čvorovima.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Selekcija ispitanika i odabir materijala:

U istraživanje su uključeni pacijenti koji su bili, u periodu od 01.01.2010. do 31.12.2020., hirurški tretirani na Klinici za ORL i maksilofacijalnu hirurgiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije zbog skvamocelularnog karcinoma larinksa i benignih lezija (papiloma larinksa, polipa larinksa, papilarne keratoze larinksa i displazije larinksa) i koji imaju patohistološki dijagnostikovane lezije. U istraživanje je uključeno ukupno 163 pacijenta. 83 pacijenta je sa dijagnostikovanim skvamocelularnim karcinomom larinksa. Među njima se nalazi 39 pacijenata kojima je hirurški uklonjena glasnica i 44 pacijenta koji su podvrgnuti kompletnoj laringektomiji. Svim pacijentima sa dijagnozom skvamocelularnog karcinoma larinksa je određen TNM stadijum. U istraživanje je uključen i 81 pacijent sa dijagnostikovanim benignim lezijama larinksa: 20 pacijenata sa dijagnostikovanim polipom larinksa, 20 pacijenata sa dijagnostikovanim papilomom larinksa, 12 slučajeva sa dijagnostikovanom papilarnom keratozom larinksa i 28 slučajeva sa dijagnostikovanom displazijom larinksa. Iz istorija bolesti pacijenata na Klinici za ORL i maksilofacijalnu hirurgiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije prikupljeni su podaci o polu, starosti pacijenata, lokalizaciji tumora, patohistološkom gradusu, veličini tumora, TNM stadijumu, prisustvu metastaza u limfnim čvorovima i broju limfnih čvorova sa metastazama. Nakon toga su odabrani parafinski kalupi sa dovoljnom količinom tkiva koja je potrebna za pravljenje potrebnih preseka za imunohistohemijsku analizu. Sa kalupa su isečeni preparati odgovarajuće veličine i kvaliteta. Dva iskusna patologa su pregledala sve pločice obojene H&E, revidirala patohistološke nalaze i za istraživanje odobrila slučajeve sa reprezentativnom histološkom slikom u kojima se nalazi zdrava sluznica larinksa i/ili žlezdane strukture koje će biti iskorišćene kao pozitivne unutrašnje kontrole. Kao pozitivne spoljašnje kontrole su iskorišćeni isecci kože sa adneksalnim strukturama. Pacijenti su podeljeni u tri grupe: grupa sa dijagnostikovanim skvamocelularnim karcinomom, grupa sa dijagnostikovanim displazijama larinksa i grupa sa dijagnostikovanim benignim lezijama larinksa. U grupi sa dijagnostikovanim karcinomom se nalazi ukupno 83 pacijenta, od toga 44 pacijenta kojima je urađena totalna laringektomija i 39 pacijenata kojima je hirurški uklonjena glasna žica. U grupi sa dijagnostikovanom displazijom larinksa nalazi se ukupno 28 pacijenata, od toga 18 sa dijagnostikovanom displazijom visokog gradusa i 10 sa dijagnostikovanom displazijom niskog gradusa. U grupi sa dijagnostikovanim benignim lezijama nalazi se ukupno 52 slučaja, od toga 20 je sa dijagnostikovanim polipom larinksa, 20 sa dijagnostikovanim papilomom larinksa i 12 sa dijagnostikovanom papilarnom keratozom larinksa.

3.2. Histološka obrada tkiva

Po uzimanju biopsije tumora i lezija larinksa, uzorci su bili fiksirani 12-24h u 4% puferovanom formalinu, zatim su ispirani vodom, pa su potom, tokom 24 časa, dehidrirani u alkoholima rastuće koncentracije (od 70% do apsolutnog alkohola). Nakon dehidracije u alkoholu su uzorci bili lipofilizovani u ksilolu i nakon lipofilizacije su kalupljeni u parafinske blokove. Dobijeni parafinski blokovi su sečeni standardnim mikrotomom na isečke debljine 3-5 μ m. Preseci su dalje bojani hematoksilin-eozinom (H&E) (Tabela 3).

Tabela 3. Shematski prikaz recepture za hematoksilin-eozin bojenje

1. I ksilol	5 minuta
2. II ksilol	5 minuta
3. 100% alkohol	3 minuta
4. 100% alkohol	3 minuta
5. 96% alkohol	3 minuta
6. 70% alkohol	3 minuta
7. dobro isprati destilovanom vodom	
8. Mayer-ov hematoksilin	5 minuta
9. dobro isprati destilovanom vodom	
10. amonijačna voda	uroniti 10 puta
11. dobro isprati destilovanom vodom	
12. Eosin (1% vodeni rastvor).....	10-15 minuta
13. isprati dobro tekućom vodom	
14. 70% alkohol	2 minuta
15. 96% alkohol	2 minuta
16. 100% alkohol	3 minuta
17. 100% alkohol	3 minuta
18. I ksilol	5 minuta
19. II ksilol	5 minuta
20. III ksilol.....	staviti i odmah pokrivati.
Obrisati pločicu i montirati Canada balsam-om (60g u 100mL ksilola) ili DPX-om.	

Na preparatima obojenim H&E postavljena je patohistološka dijagnoza polipa larinksa, papiloma larinksa, papilarne keratoze larinksa, displazije epitela larinksa, skvamocelularnog karcinoma larinksa. Napravljena je selekcija preparata, tako da svaki preparat sadrži normalnu sluznicu larinksa i/ili žlezdane strukture, koje će se koristiti kao unutrašnje pozitivne kontrole. Procenjen je kvalitet uzorka, to jest, da li se na parafinskom bloku nalazi adekvatna količina tkiva za potrebne analize. Sa odabranih kalupa su se sekli preseći za imunohistohemijsku analizu.

3.3. Imunohistohemijska obrada tkiva

Imunohistohemijska obrada uzoraka je obavljena u Laboratoriji za imunohistohemiju Instituta za patologiju “Dr Đorđe Joannović“ Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Imunohistohemijska bojenje uzoraka koji su fiksirani u formalinu i ukalupljeni u parafinske blokove se sastoji od sledećih koraka:

- deparafinizacija,
- proteolitička digestija,
- blokiranje endogene peroksidaze,
- imunohistohemijsko bojenje primenom streptavidin-biotin tehnike.

Sečenjem parafinskih kalupa dobijeni su preseći 3-4 μ m, koji su podvgnuti procesu sušenja od 16h na 56°C a potom deparafinisani po sledećoj proceduri:

I ksilol	5-7 minuta, ocediti
II ksilol.....	5-7 minuta, ocediti
100% alkohol	3 minuta, ocediti
100% alkohol	3 minuta, ocediti
96% alkohol	3 minuta, ocediti
96% alkohol	3 minuta, ocediti
destilovana/dejonizovana voda30 sekundi

Proteolitička digestija (demaskiranje antigena):

Deparafinirani preseki su potom preneti u plastičnu kivetu sa 250 mL radnog rastvora citratnog pufera (10mmol/L, pH 6.0) pa su podvrgnuti procesu kuvanja u mikrotalasnoj pećnici 2x5 minuta na maksimalnoj temperaturi. Nakon kuvanja, preseki se hlade u citratnom puferu 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon hlađenja se ispiraju destilovanom vodom dva puta po 30 sekundi.

Blokiranje endogene peroksidaze

Preparati se potapaju u 3% vodonik-peroksid (rastvoren u destilovanoj vodi) gde stoje 5 minuta. Nakon toga se ispiraju destilovanom vodom i prelijivaju fosfatnim puferom (PBS-phosphate-buffered saline, 0,02 mol/L, pH 7,0) 3x 2 minuta.

Imunohistohemijsko bojenje primenom streptavidin-biotin tehnike

Za imunohistohemijsko bojenje korišćen je komercijalni kit (*Labelled streptavidin-biotin- LSAB+* metoda, DAKO, Danska). Bojenje je obavljeno po proceduri koja je navedena u uputstvima proizvođača:

FAZA I (primarno antitelo razblaženo po uputstvu proizvođača):

1. odliti višak pufera, obrisati pažljivo oko isečka,
2. pokriti isečak sa minimalnom količinom (20-30 μ L) primarnog antitela,
3. inkubacija 30 minuta na sobnoj temperaturi,
4. pažljivo isprati PBS iz špric-boce,
5. prelići svežim puferom.

FAZA II (biotinilizovano vezno antitelo):

1. odliti višak pufera, obrisati pažljivo oko isečka,
2. pokriti isečak sa minimalnom količinom (20-30 μ L) LINK antitela,
3. inkubacija 30 minuta,
4. pažljivo isprati PBS iz špric-boce,
5. prelići svežim puferom.

FAZA III (streptavidin-peroksidaza):

1. odliti višak pufera, obrisati pažljivo oko isečka,
2. pokriti isečak sa minimalnom količinom (20-30 μ L) streptavidin-peroksidaze,
3. inkubacija 30 minuta,
4. pažljivo isprati PBS iz špric-boce,
5. prelići svežim puferom.

FAZA IV (supstrat hromogen):

1. odliti višak pufera, obrisati pažljivo oko isečka,
2. pokriti isečak sa minimalnom količinom (20-30 μ L) hromogena diaminobenzidina (DAB)
3. inkubacija 10 minuta,
4. ispiranje destilovanom vodom.

FAZA V (kontrastiranje):

1. Mayer-ov hematoksilin 5 do 10 minuta,
2. pažljivo isprati destilovanom vodom,
3. uroniti 10 puta u kivetu sa 0,037 mol/L amonijačne vode,
4. ispiranje destilovanom/dejonizovanom vodom 2 do 5 minuta.

Pokriti vodenim medijumom.

Mesta specifičnog vezivanja antitela su braon boje, dok hematoksilin koji se nespecifično vezuje za jedra svih ćelija, boji plavo.

Rastvori korišćeni u imunohistohemijskim metodama i H&E bojenju

CITRATNI PUFER: 10 mmol/L, pH 6,0

Stock A : 0.1 mol limunska kiselina C₆H₈O₇ (MT 210.4)

limunska kiselina C₆H₈O₇ 10,52 (2.10) g
destilovana voda 500 (100) mL

Stock B: 0.1 mol natrijum citrat C₆H₅Na₃O₇ (MT 294.10)

natrijum citrat C₆H₅Na₃O₇ 14,705 g
destilovana voda 500 mL

RADNI RASTVOR PUFERA :

9 mL A + 41 mL B, dopuniti do 500 mL dejonizovanom (destilovanom vodom) ili

18 mL A + 82 mL B, dopuniti do 1000 mL dejonizovanom (destilovanom vodom)

FOSFATNI PUFER (PHOSPHATE-BUFFERED SALINE – PBS), 0.02 mol/L, pH 7,0

- NaCl 8,00 g
- KCl..... 0,20 g
- KH₂PO₄ 0,20 g
- Na₂HPO₄ 1,43 g

Dopuniti do 1L destilovanom vodom.

AMONIJAČNA VODA:

koncentrovani amonijum hidroksid 2,5mL

destilovana voda dopuniti do 1000 mL

Čuvati na sobnoj temperaturi u dobro zatvorenoj tamnoj boci.

MAYER-ov HEMATOKSILIN:

- Hematoxylin..... 1 g
- destilovana voda..... 1 L
- natrijum (kalijum) jodat 0,2 g
- kalijum (amonijum)-aluminijum sulfat 50 g
- limunska kiselina..... 1 g
- hloral hidrat 50 g

Rastvoriti hematoksilin u destilovanoj vodi, ako je potrebno uz blago zagrevanje. Dodati natrijum (kalijum) jodat, a zatim kalijum (amonijum)-aluminijum sulfat. Dobro izmešati dok se stipsa ne rastvori, dodati limunsku kiselinu i hloral hidrat, pa ponovo dobro izmešati i prokuvati 5 minuta, dok se svi sastojci kompletno ne rastvore a rastvor ne dobije crveno-ljubičastu boju. Ohladiti i profiltrirati. Boja se dobro zatvori i može da stoji mesecima. Čuva se u svetloj boci na svetlu.

Tkivo se boji 5-10 minuta, a zatim se dobro ispira mlakom tekućom vodom 10-20 minuta. Da bi plava boja bila intenzivnija može se potopiti 10-30 sekundi u 2% vodeni rastvor natrijum bikarbonata (jedra tamno-plava, okolina slabo obojena).

EOZIN - 1% VODENI RASTVOR

- Eosin Y..... 10 g
- destilovana voda..... 1 L

Dodati kristal timola da se ne taloži. Profiltrirati pre upotrebe.

Celokupna procedura je korišćena za sledeća antitela, u odgovarajućim razblaženjima:

- CK8 (Dako, mouse anti-cytokeratin 8, clone35βH11), 1:50,
- CK10 (Thermo Scientific, monoclonal mouse anti-cytokeratin 10, clone DE-K10), 1:400,
- CK13 (BioSB, monoclonal rabbit anti-cytokeratin 13, clone EP69), 1:50,
- CK17 (Dako, monoclonal mouse anti-cytokeratin 17 clone E3), 1:20,

Za svako primenjeno antitelo je postojala pozitivna i negativna kontrola. Uzorci kože sa adneksalnim strukturama, kao i normalan epitel larinksa i žlezdane strukture larinksa su korišćeni kao pozitivne i negativne kontrole:

- žlezdane strukture larinksa i kože (pozitivna kontrola za CK8 i negativna za ostala antitela);
- dlačni folikul (pozitivna kontrola za CK17)
- normalan epitel kože (pozitivna kontrola za CK10, negativna kontrola za CK17 i CK8)
- normalan pločastoslojeviti i jednoredni epitel larinksa (pozitivna kontrola za CK13, negativna kontrola za CK8, CK17).

Imunohistohemijsko bojenje je analizirano na svetlosnom mikroskopu (BX50F4, Olympus Optical, Japan).

Imunoreaktivnost antitela je gradirana semikvantitativnom metodom. Kao pozitivnost imunohistohemijskog bojenja smatrana je citoplazmatska i/ili membranska pozitivnost bilo kog intenziteta, a procenat obojenih ćelija je određivan na celoj površini preseka lezije ili tumora. Dva iskusna patologa su pregledala sve imunohistohemijski obojene pločice i za one slučajeve za koje se nisu slagali, postignut je konsenzus. Vrednost za koju je postojala obostrana saglasnost je korišćena u istraživanju. Način gradiranja ekspresije primenjenih antitela je prikazan u tabeli 4.

Tabela 4. Mesto specifičnog vezivanja antitela u ćeliji i način gradiranja ekspresije antitela

Imunohistohemijski marker	Mesto vezivanja	Gradiranje ekspresije
CK8	Citoplazma i ćelijska membrana	0..... bez ekspresije 1..... ≤5% pozitivnih ćelija 2.....od 5% do 50% pozitivnih ćelija 3.....od 50% do 75% pozitivnih ćelija 4.....od 75% do 100% pozitivnih ćelija
CK10	Citoplazma i ćelijska membrana	0..... bez ekspresije 1..... ≤5% pozitivnih ćelija 2.....od 5% do 50% pozitivnih ćelija 3.....od 50% do 75% pozitivnih ćelija 4.....od 75% do 100% pozitivnih ćelija
CK13	Citoplazma i ćelijska membrana	0..... 100% pozitivnih ćelija 1..... ≥ 75% ćelija 2..... od 50% do 75% pozitivnih ćelija 3..... od 5% do 50% pozitivnih ćelija 4..... ≤5% pozitivnih ćelija
CK17	Citoplazma i ćelijska membrana	0..... bez ekspresije 1..... ≤5% pozitivnih ćelija 2.....od 5% do 50% pozitivnih ćelija 3.....od 50% do 75% pozitivnih ćelija 4.....od 75% do 100% pozitivnih ćelija

3.4. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka korišćen je softver SPSS 20.0. U okviru statističke obrade formirana je baza podataka, a zatim je izvršeno grupisanje i tabeliranje rezultata po ispitivanim obeležjima bolesnika sa dijagnostikovanom polipom larinksa, papilomom larinksa, papilarnom keratozom larinksa, displazijom larinksa niskog gradusa, displazijom larinksa visokog gradusa i skvamocelularnim karcinomom larinksa.

Deskriptivni statistički parametri su izraženi kroz aritmetičku sredinu sa merama disperzije (standardna devijacija –SD, standardna greška –SE), medijanu, amplitudu varijacija (min-max) i raspodelu relativnih frekvencija.

Za ispitivanje povezanosti i modelovanje odnosa zavisne sa jednom ili više nezavisnih korišćena je logistička regresiona analiza (za dihotomne zavisne varijable). Dijagnostička tačnost je evaluirana putem ROC krive (Receiving Operating Characteristics) kao i pomoću senzitivnosti, specifičnosti. Rezultati su prikazani tabelarno. Izabrani nivo značajnosti, odnosno verovatnoća greške prvog tipa iznosi 0,05.

4. REZULTATI

U istraživanje su bila uključena 163 slučaja: 20 polipa larinksa, 20 papiloma larinksa, 28 displazija larinksa, 12 papilarnih keratoza larinksa i 83 skvamocelularna karcinoma larinksa. U grupi displazija koje su klasifikovane po novoj SZO 2017 klasifikaciji je bilo 10 displazija niskog gradusa (low-grade) i 18 displazija visokog gradusa (high-grade) displazija. U grupi od 83 skvamocelularna karcinoma larinksa se nalaze 44 slučaja u kojima su pacijenti podvrgnuti totalnoj laringektomiji i 39 slučaja u kojima su pacijentima odsranjene glasnice. U grupi sa karcinomima je bilo 39 slučaja stadijuma pT1, 8 slučajeva stadijuma pT2, 22 slučaja stadijuma pT3 i 14 slučajeva stadijuma pT4. Ukupno je 26 slučajeva skvamocelularnog karcinoma metastaziralo u limfne čvorove. U N1 stadijumu je bilo 6 slučajeva, 3 slučaja su bila u N2a stadijumu, 3 slučaja su bila u N2b stadijumu, jedan slučaj je bio u N2c stadijumu i 13 slučajeva je bilo u N3 stadijumu (Tabela 5).

Tabela 5 Osnovne karakteristike pacijenata

	Sve benigne lezije n=52		Papilom larinksa n=20		Polip larinksa n=20		Papilarna keratoza larinksa n=12		Sve displazije n=28		Displazije niskog gradusa n=10		Displazije visokog gradusa n=18		SCC larinksa n=83	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Prosečne starost (god.) ±SD	51,0±11,7		51,7±14,0		50,4±9,2		64±8,4		64,4±8,6		64,0±8,8		64,0±8,5		64,4±8,7	
Parametri	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Rod																
Muški	38	73,1	15	75,0	15	75,0	8	66,7	24	85,7	7	70,0	17	94,4	73	87,9
Ženski	14	26,9	5	25,0	5	25,0	4	33,3	4	14,3	3	30,0	1	5,6	10	12,1
Gradus tumora																
G1															20	24,1
G2															54	65,1
G3															9	10,8
Stadijum tumora																
pT1															39	47,0
pT2															7	8,4
pT3															23	27,7
pT4															14	16,9
Metastaze u limfnim čvorovima																
N0															57	68,7
N1															6	7,2
N2															7	8,4
N3															13	15,7

135 (82,8%) pacijenta su bili muškog pola, a 28 (17,2%) pacijenata je bilo ženskog pola. Od 83 pacijenta sa dijagnostikovanim skvamocelularnim karcinomom larinksa, 73 (88%) je bilo muškog pola a 10 (12%) ženskog pola. Od 52 pacijenta sa dijagnostikovanim benignim lezijama 38 (73,1%) je bio muškog pola, a 14 (26,9%) ženskog pola. Prosečna starost pacijenata sa dijagnostikovanim

skvamocelularnim karcinomom je $64,4 \pm 8,7$ godina, a prosečna starost pacijenata sa dijagnostikovanim benignim lezijama je bila $51,0 \pm 11,7$ godine.

U grupi pacijenata sa dijagnostikovanim polipima bilo je 15 (75%) muškaraca i 5 (25%) žena, odnosno 3 puta više muškaraca od žena. Prosečna starost pacijenata je $50,4 \pm 9,22$ godina. Prosečna starost pacijenata muškog roda je $51,6 \pm 8,9$, a prosečna starost pacijenata ženskog roda je $50,4 \pm 9,2$ godina.

U grupi pacijenata sa dijagnostikovanim papilomima bilo je 15 (75%) muškaraca i 5 (25%) žena. Prosečna starost pacijenata u ovoj grupi je $51,6 \pm 14$. Prosečna starost pacijenata muškog roda je $52,6 \pm 14,3$ a prosečna starost pacijenata ženskog roda je $52 \pm 14,5$.

U grupi pacijenata sa dijagnostikovanom papilarnom keratozom larinksa je 8 (66,7%) muškaraca i 4 (33,3%) žena. Prosečna starost pacijenata u ovoj grupi je $64 \pm 8,4$ godina. Prosečna starost pacijenata muškog roda je $59,75 \pm 4,7$ godina. Prosečna starost pacijenata ženskog roda je $64 \pm 8,4$ godina.

U grupi pacijenata sa dijagnostikovanom displazijom larinksa je 4 (14,3%) pacijenta ženskog roda i 24 (85,7%) pacijenta muškog roda. Prosečna starost pacijenata u ovoj grupi je $64,4 \pm 8,6$ godina. Prosečna starost pacijenata muškog roda je $64,4 \pm 8,6$ godina. Prosečna starost pacijenata ženskog roda u ovoj grupi je $64,5 \pm 8,9$ godina.

Ukupno je bilo 10 pacijenata sa dijagnostikovanom displazijom niskog gradusa. Muškog roda je bilo 7 (70%) pacijenata a 3 (30%) pacijenta su bila ženskog roda. Prosečna starost pacijenata oba roda u ovoj grupi je bila $64 \pm 8,8$ godina. Prosečna starost pacijenata muškog roda je bila $64 \pm 8,6$ godina, dok je prosečna starost pacijenata ženskog roda bila $64,3 \pm 8,9$.

Ukupno je bilo 18 pacijenata sa dijagnostikovanom displazijom visokog gradusa, od toga 17 (94,4%) su bili muškarci, a 1 (5,6%) su bile žene. Jedina pacijentkinja sa dijagnostikovanom displazijom visokog gradusa je stara 81 godinu, a prosečna starost pacijenata muškog pola je $64 \pm 8,5$.

Od 83 pacijenta sa dijagnostikovanim skvamocelularnim karcinomom larinksa 73 (88%) je bilo muškog pola a 10 (12%) ženskog pola. Prosečna starost pacijenata u ovoj grupi je $64,4 \pm 8,7$ godina. Prosečna starost pacijenata muškog pola je $63,4 \pm 8,7$, a prosečna starost pacijenata ženskog pola je $63,6 \pm 8,6$. Od 26 pacijenata sa metastazama u limfne čvorove, 2 (7,7%) pacijenta su ženskog roda a 24 (92,3%) pacijenta su muškog roda.

4.1. SLAGANJE OCENJIVAČA

4.1.1. Slaganje ocenjivača za CK8

Dva iskusna patologa su pogledala sve imunohistohemijski obojene pločice na CK8 nezavisno jedan od drugog i ocenjivala ekspresiju svakog antitela u lezijama. Nije bilo neslaganja u interpretaciji imunohistohemijskog bojenja na CK8 između dva ocenjivača (Tabela 6).

Tabela 6: Slaganje ocenjivača za CK8

		CK8 T				Ukupno
		0	1	2	4	
CK8 N	0	150	0	0	0	150
	1	0	8	0	0	8
	2	0	0	4	0	4
	4	0	0	0	1	1
Ukupno		150	8	4	1	163

Slaganje dva ocenjivača je vrlo visoko, u ovom slučaju 100% (Tabela 7). Kappa testom, utvrđeno je da postoji visoko statistički značajno slaganje između dva ocenjivača (Kappa=1,000 (95% CI 0,996-1,004; $p < 0.001$))

Tabela 7: Ukupno slaganje^a za CK8

	Kappa	Asimptotika			Asimptotički 95% interval poverenja	
		Standardna greška	z	Sig.	Donja granica	Gornja granica
Ukupno slaganje	1.000	.060	16.591	.000	.996	1.004

a. Uzorak se sastoji od 163 subjekta i uključena su bila 2 posmatrača.

4.1.2. Slaganje ocenjivača za CK10

Dva iskusna patologa su pogledala sve imunohistohemijski obojene pločice nezavisno jedan od drugog i ocenjivala ekspresiju CK10 u lezijama. Slučajevi za koje je postojalo međusobno neslaganje (Tabela 8), su opet pregledani od strane oba patologa, i postignut je konsenzus za skor koji će se koristiti u istraživanju.

Tabela 8: Slaganje ocenjivača za CK10

		CK10 T				Ukupno
		0	1	2	3	
CK10	0	96	0	0	0	96
	1	3	32	0	0	35
	2	0	0	25	0	25
	3	0	0	0	4	5
	4	0	0	0	0	2
Ukupno		99	32	25	4	163

Slaganje dva ocenjivača je vrlo visoko, u ovom slučaju 95,7% (Tabela 9). Kappa testom, utvrđeno je da postoji visoko statistički značajno slaganje između dva ocenjivača (Kappa=0,957 (95% CI 0,954-0,961; $p<0,001$))

Tabela 9: Ukupno slaganje^a za CK10

	Kappa	Asimptotika			Asimptotički 95% interval poverenja	
		Standardna greška	z	Sig.	Donja granica	Gornja granica
Ukupno slaganje	.957	.053	18.032	.000	.954	.961

a. Uzorak se sastoji od 163 subjekta i uključena su bila 2 posmatrača.

4.1.3. Slaganje ocenjivača za CK13

Dva iskusna patologa su pogledala sve imunohistohemijski obojene pločice nezavisno jedan od drugog i ocenjivala ekspresiju CK13 u lezijama. Slučajevi za koje je postojalo međusobno neslaganje (Tabela 10) su opet pregledani od strane oba patologa i postignut je konsenzus za skor koji će se koristiti u istraživanju.

Tabela 10: Slaganje ocenjivača za CK13

		CK13 T					Ukupno
		0	1	2	3	4	
CK13N	0	35	0	0	0	0	35
	1	0	8	0	0	0	8
	2	0	0	36	0	0	36
	3	0	0	3	40	0	43
	4	0	0	0	1	40	41
Ukupno		35	8	39	41	40	163

Slaganje dva ocenjivača je vrlo visoko, u ovom slučaju 96,8% (Tabela 10). Kappa testom, utvrđeno je da postoji visoko statistički značajno slaganje između dva ocenjivača (Kappa=0,968 (95% CI 0,965-0,971; $p<0,001$))

Tabela 10: Ukupno slaganje^a za CK13

	Kappa	Asimptotika			Asimptotički 95% interval poverenja	
		Standardna greška	z	Sig.	Donja granica	Gornja granica
Ukupno slaganje	.968	.042	22.896	.000	.965	.971

a. Uzorak se sastoji od 163 subjekta i uključena su bila 2 posmatrača.

4.1.4. Slaganje ocenjivača za CK17

Dva iskusna patologa su pogledala sva imunohistohemijski obojene pločice nezavisno jedan od drugog i ocenjivala ekspresiju CK13 u lezijama. Slučajevi za koje je postojalo međusobno neslaganje (Tabela 11) su opet pregledani od strane oba patologa, i postignut je konsenzus za skor koji će se koristiti u istraživanju.

Tabela 11: Slaganje ocenjivača za CK17

		CK17 T					Ukupno
		0	1	2	3	4	
CK17N	0	39	1	0	0	0	40
	1	1	19	0	0	0	20
	2	0	4	57	2	0	63
	3	0	0	0	28	1	29
	4	0	0	0	0	11	11
Ukupno		40	24	57	30	12	163

Slaganje dva ocenjivača je vrlo visoko, u ovom slučaju 92,5% (Tabela 12). Kappa testom, utvrđeno je da postoji visoko statistički značajno slaganje između dva ocenjivača (Kappa=0.926 (95% CI 0,924-0,929; p<0,001) (Tabela 12).

Tabela 12: Ukupno slaganje^a za CK17

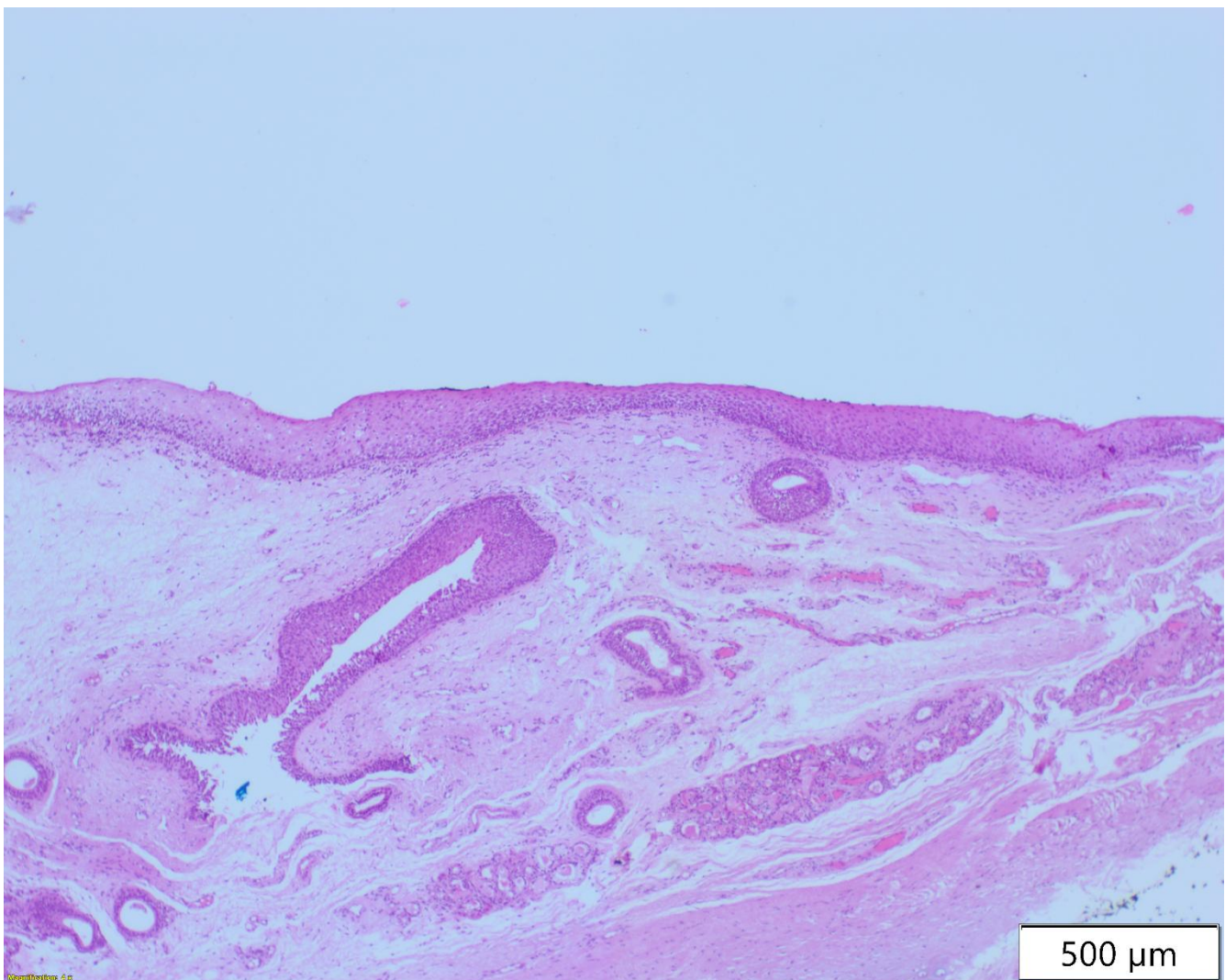
	Kappa	Asimptotika			Asimptotički 95% interval poverenja	
		Standardna greška	z	Sig.	Donja granica	Gornja granica
Ukupno slaganje	.926	.043	21.576	.000	.924	.929

a. Uzorak se sastoji od 163 subjekta i uključena su bila 2 posmatrača.

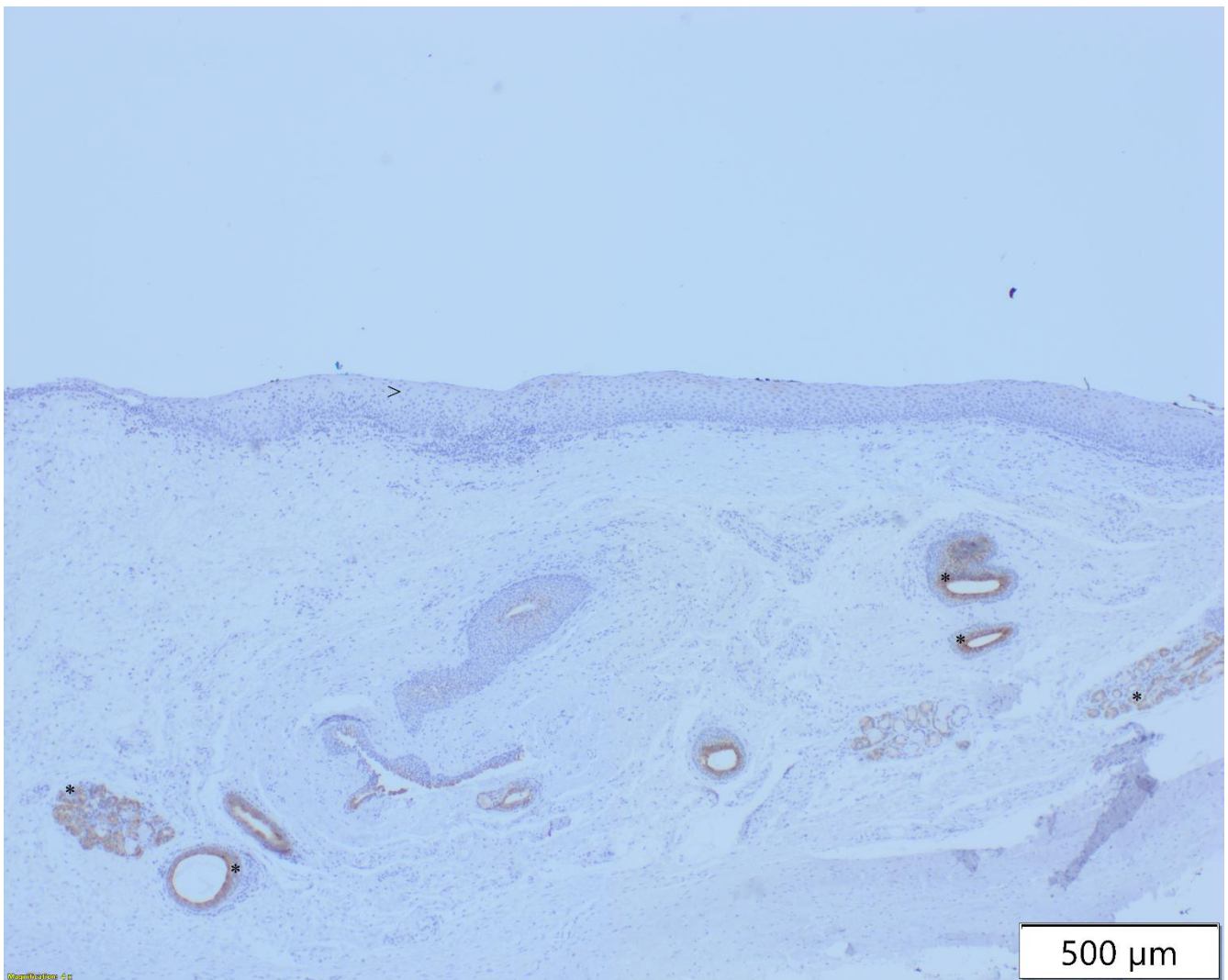
4.2. IMUNOHISTOHEMIJSKA EKSPRESIJA CK8, CK10, CK13 I CK17 U NORMALNOM EPITELU LARINKSA, BENIGNIM LEZIJAMA LARINKSA, DISPLAZIJAMA LARINKSA I SKVAMOCELULARNOM KARCINOMU LARINKSA

4.2.1. Imunohistochemijska ekspresija CK8, CK10, CK13 i CK17 u normalnom epitelu larinksa.

U normalnom epitelu larinksa (Slika 8) nije uočena ekspresija ni CK8 (Slika 9) ni CK10 (Slika 10). CK8 je eksprimiran u žlezdanom epitelu laringealnih žlezda (slika 9). Ekspresija CK13 je uniformna i istog intenziteta u suprabazalnom sloju normalnog epitela larinksa (Slika 11), s tim, što se CK13 ne eksprimira u bazalnom sloju epitela. Ekspresija CK17 nije uočena u ćelijama normalnog epitela larinksa (Slika 12). U epitelu prelaznog tipa (Slika 13), koji često diferencijalno dijagnostički dolazi u obzir prilikom razmatranja dijagnoze displazije larinksa, takođe je uočena homogena ekspresija CK13 (Slika 14)

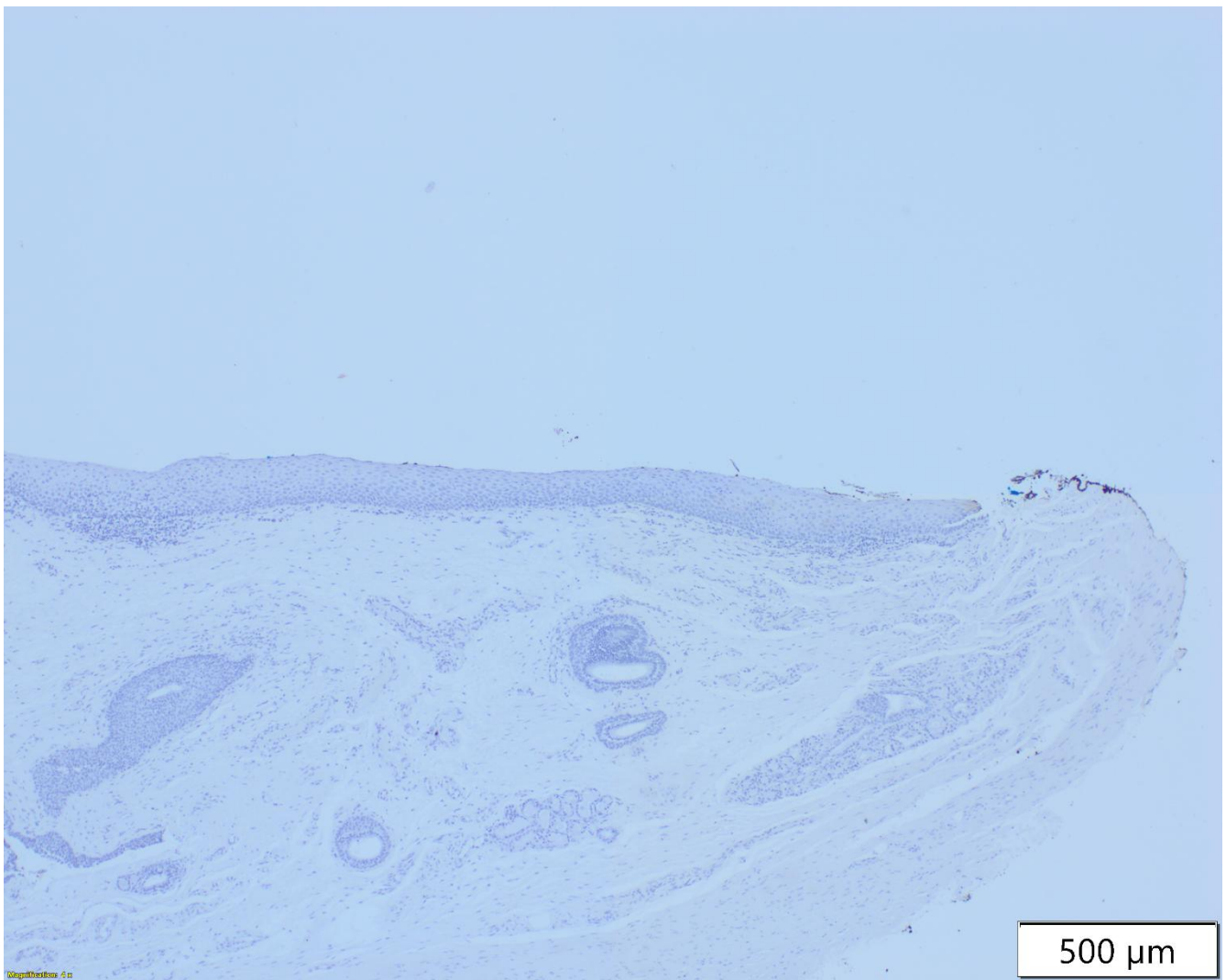


Slika 8: Normalan epitel larinksa, (HEx40).



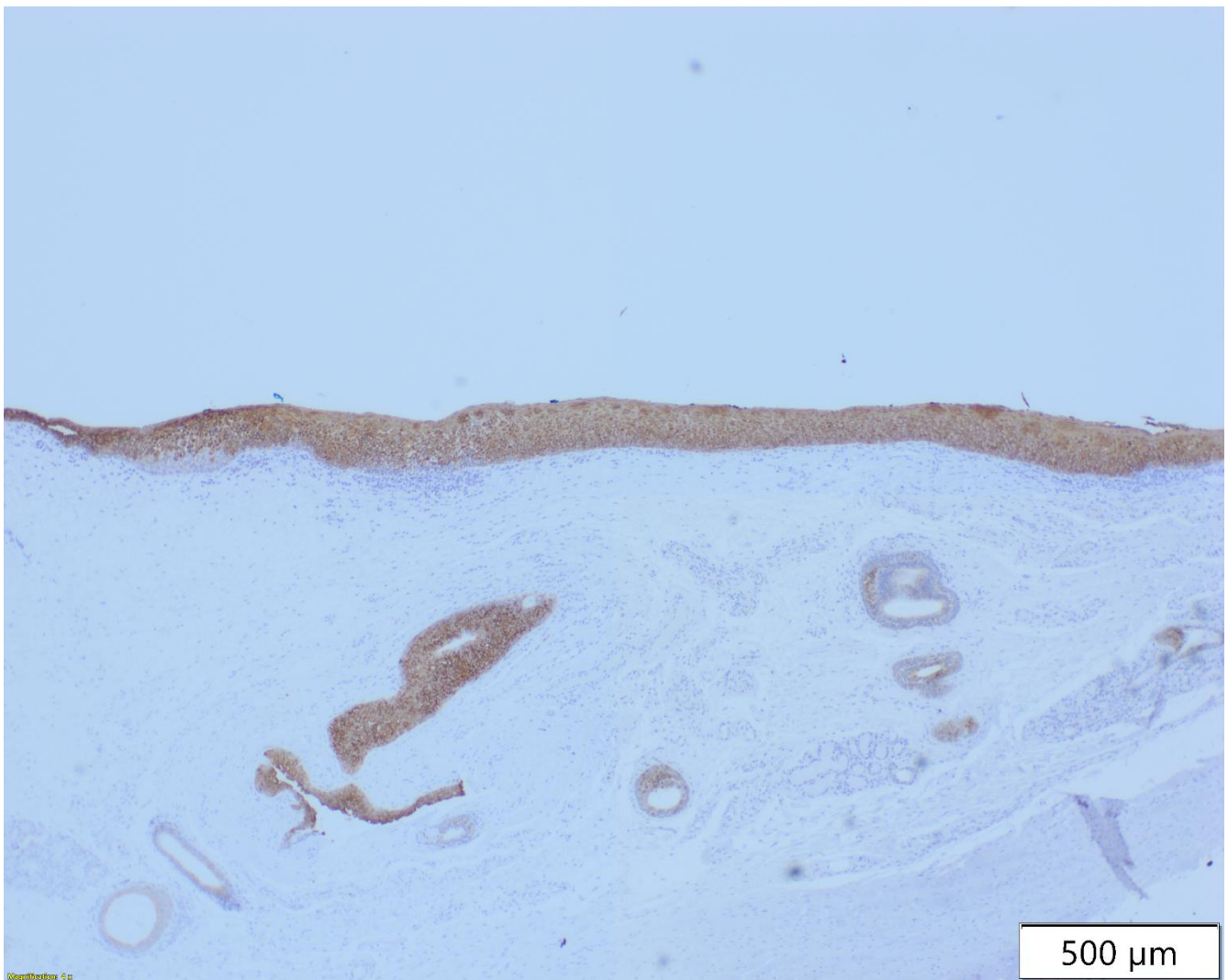
Copyright © 2010

Slika 9: Normalan epitel larinksa, (CK8x40). > Nema ekspresije CK8 u epitelu larinksa. *CK8 se ekspirira u žlezdanom epitelu larinksa, koji služi kao pozitivna unutrašnja kontrola.



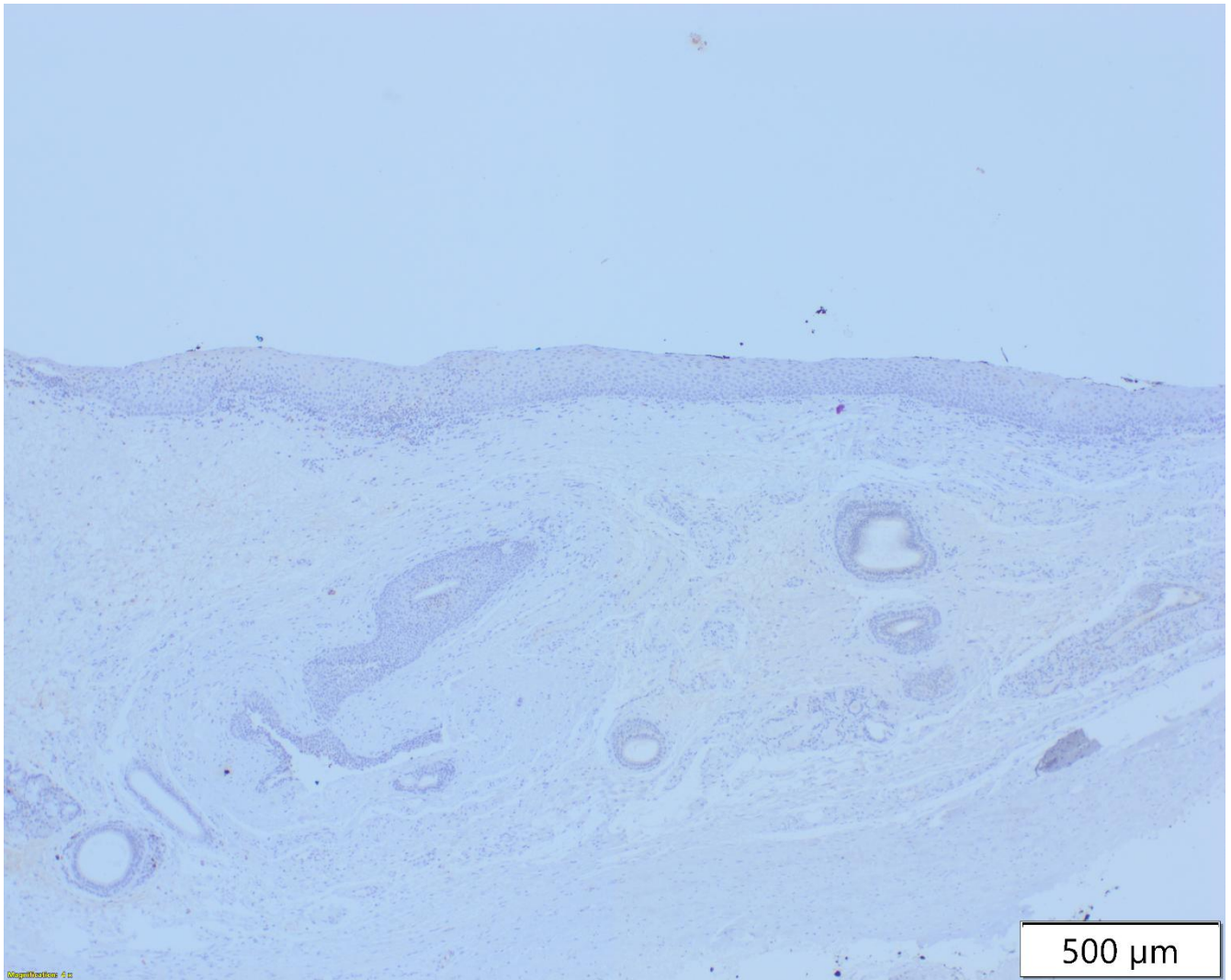
Copyright © 2015

Slika 10: Normalan epitel larinksa, (CK10x40). Nema ekspresije CK10 u normalnom epitelu larinksa.



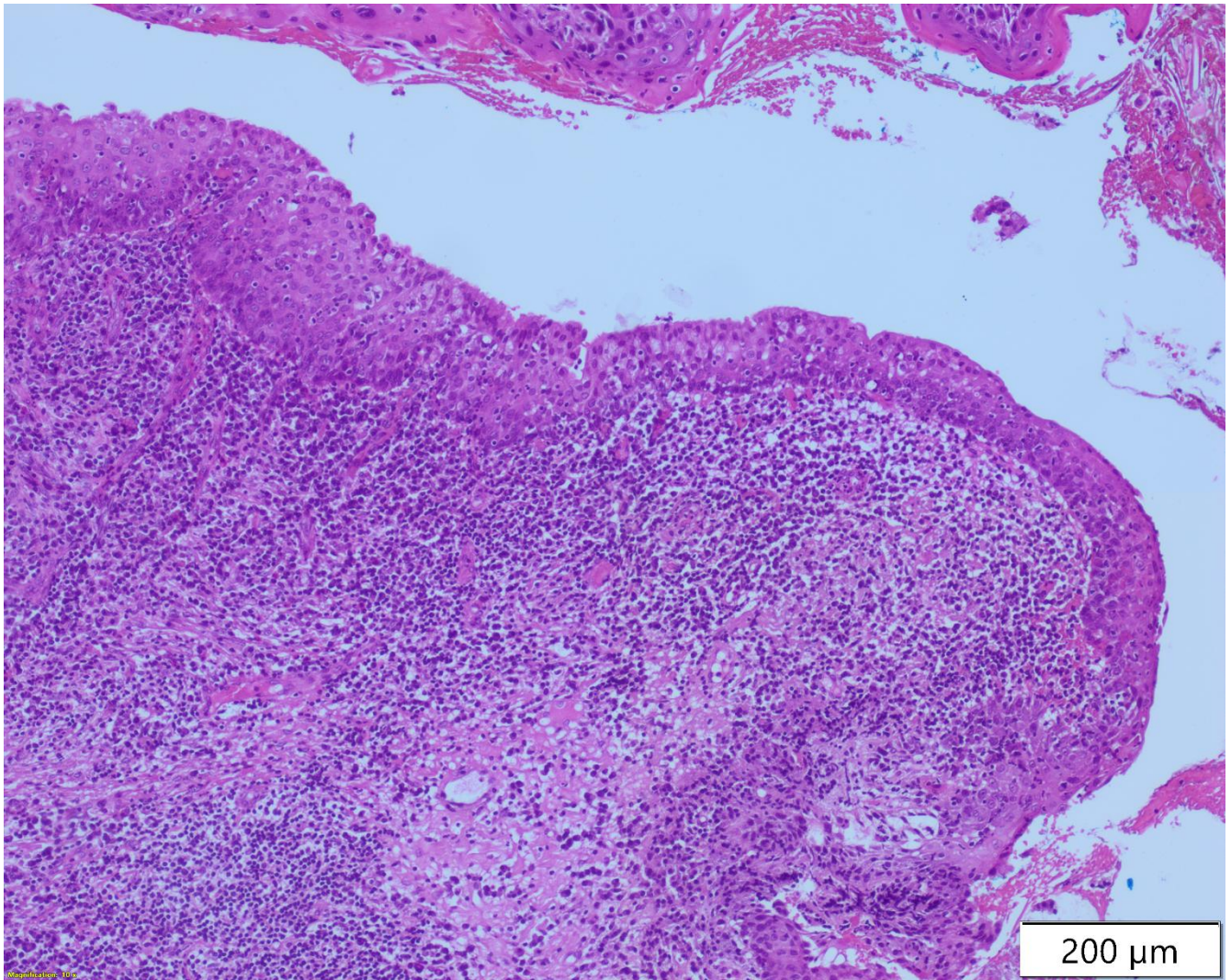
Copyright © 2015

Slika 11: Normalan epitel larinksa, (CK13x40). Uočava se homogena i uniformna ekspresija CK13 u suprabazalnim slojevima normalnog epitela larinksa.

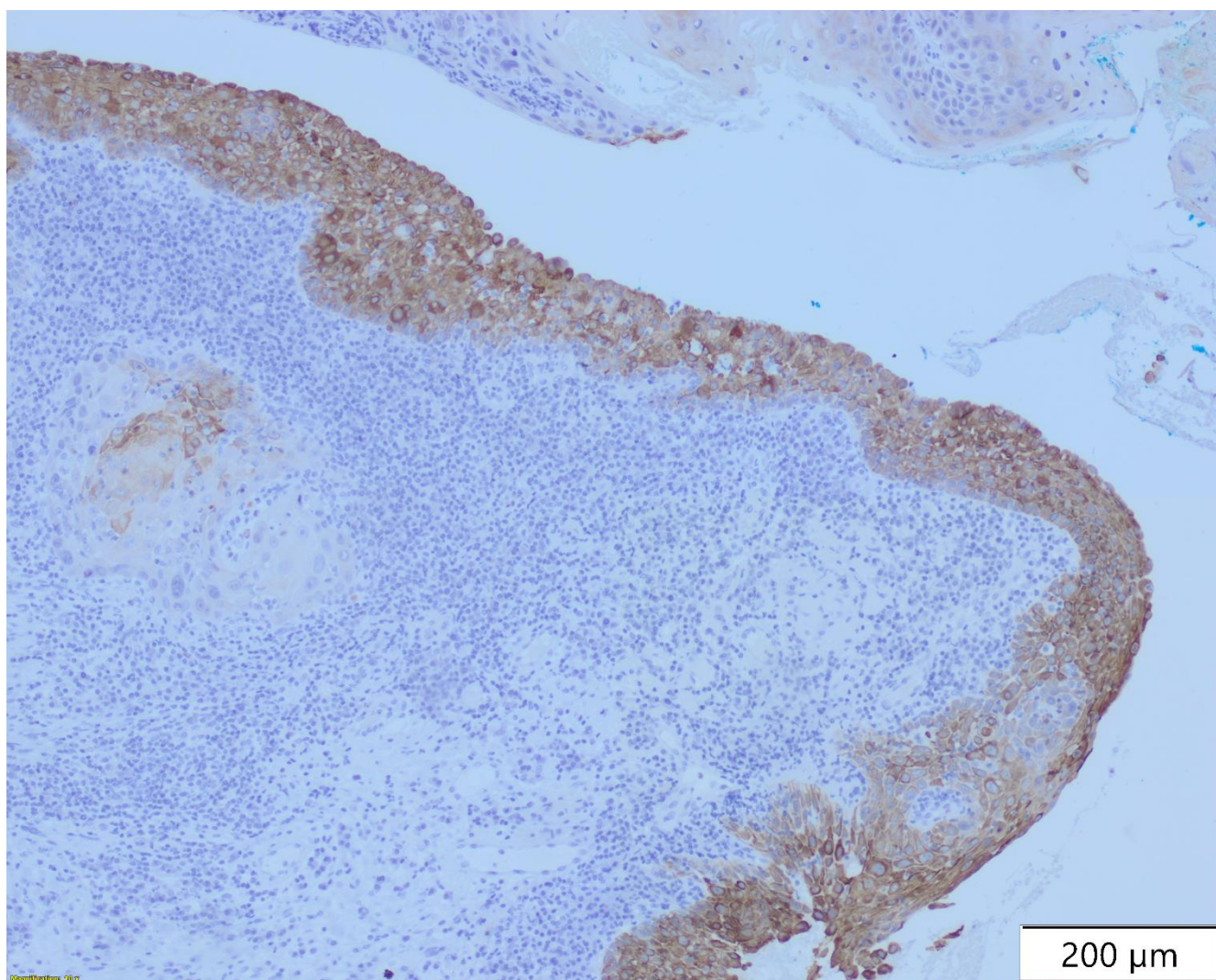


Copyright © 2010

Slika 12: Normalan epitel larinksa, (CK17x40). Nema ekspresija CK17 u normalnom epitelu larinksa.



Slika 13: Prelazni epitel larinksa, (HEx100).



Slika 14: Prelazni epitel larinksa (CK13x100). Homogena ekspresija CK13 u prelaznom epitelu larinksa.

4.2.2. Imunohistohemijska ekspresija CK8, CK10, CK13 i CK17 u benignim lezijama larinksa

U Tabeli 13 su predstavljene vrednosti skorova ekspresije CK8, CK10, CK13 i CK17 u benignim lezijama larinksa. U našem uzorku se nalazi ukupno 52 slučaja benignih lezija i to 20 slučajeva papiloma larinksa, 20 slučajeva polipa larinksa i 12 slučajeva papilarne kertoze larinksa. Ni u jednoj benignoj leziji nije uočena ekspresija CK8. Ekspresija CK10 je uočena u 16 (30,7%) benignih lezija. Gubitak ekspresije CK13 je uočen u 17 (32,7%) benignih lezija, a ekspresija CK17 je uočena u 30 (57,7%) benignih lezija (Tabela 13).

Tabela 13: Imunohistohemijska ekspresija CK8, CK10, CK13 i CK17 u benignim lezijama larinksa

IHH skor	CK8		CK10		CK13		CK17	
	N	%	N	%	N	%	N	%
0	52	100	36	69.3	35	67.3	22	42.3
1	0	0	6	11.5	2	3.8	4	7.7
2	0	0	9	17.3	11	21.2	17	32.7
3	0	0	1	1.9	4	7.7	6	11.5
4	0	0	0	0	0	0	3	5.8

4.2.3. Imunohistohemijaska ekspresija CK8, CK10, CK13 i CK17 u polipima larinksa

U Tabeli 14 su predstavljene vrednosti skorova ekspresije CK8, CK10, CK13 i CK17 u polipima larinksa.

Ni u jednom od naših slučajeva polipa larinksa (Slika 15) nije uočena ekspresija CK8 (Slika 16).

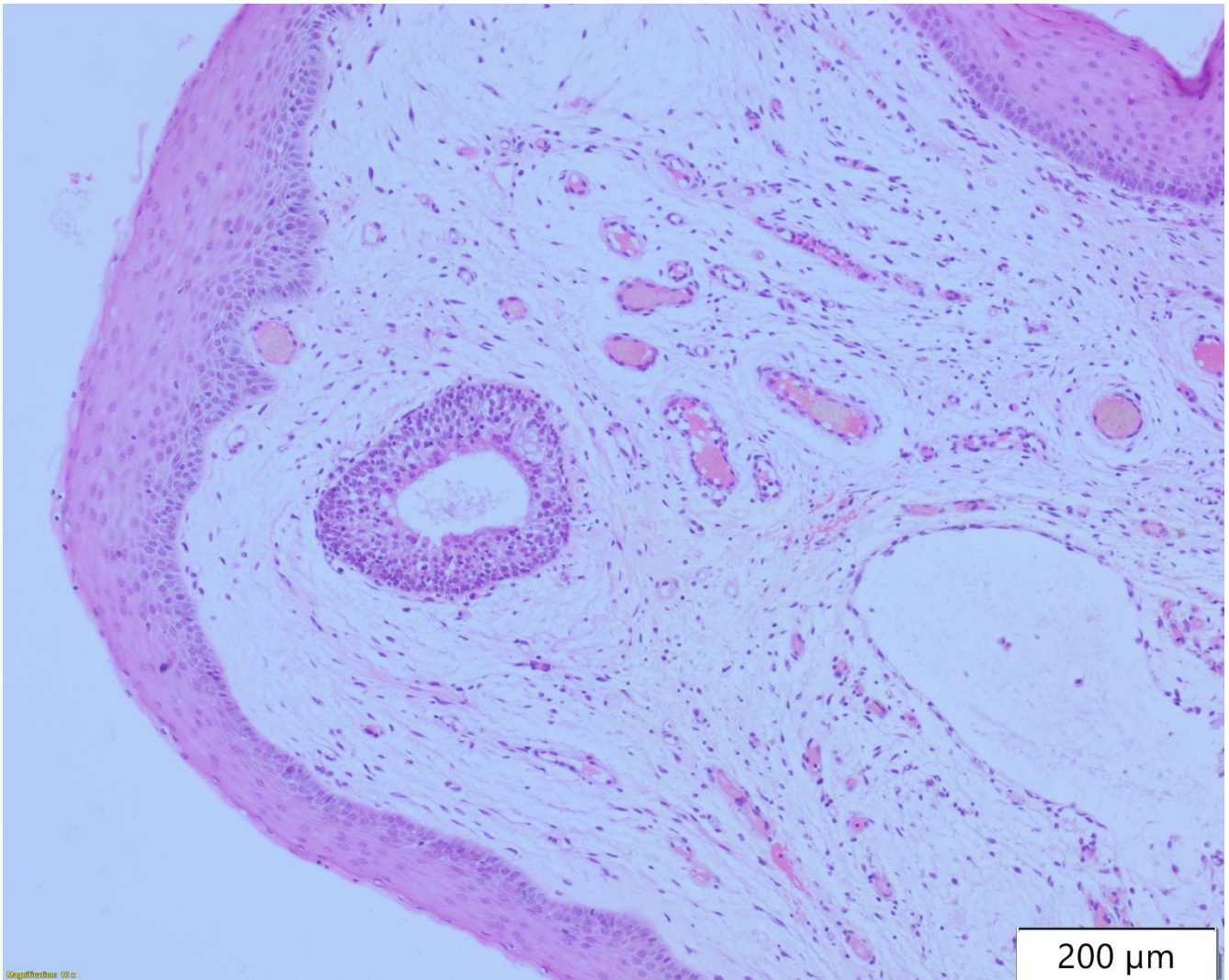
Ekspresija CK10 je uočena u 10 (50%) ispitivanih slučajeva. U 5 (25%) slučajeva je ekspresija fokalna, u višim slojevima epitela (Slika 17). U 4 (20%) slučajeva je ekspresija „mrljasta“, odnosno uočena u nekoliko plaža epitelnih ćelija. U jednom (5%) slučaju je ekspresija CK10 difuzna.

U 14 (70%) naših slučajeva je ekspresija CK13 homogena (Slika 18). U 2 (10%) slučajeva je uočen fokalni gubitak ekspresije CK13. U četiri (20%) slučajaja je uočen mrljasti gubitak ekspresije CK13 u epitelu koji je bez patoloških promena.

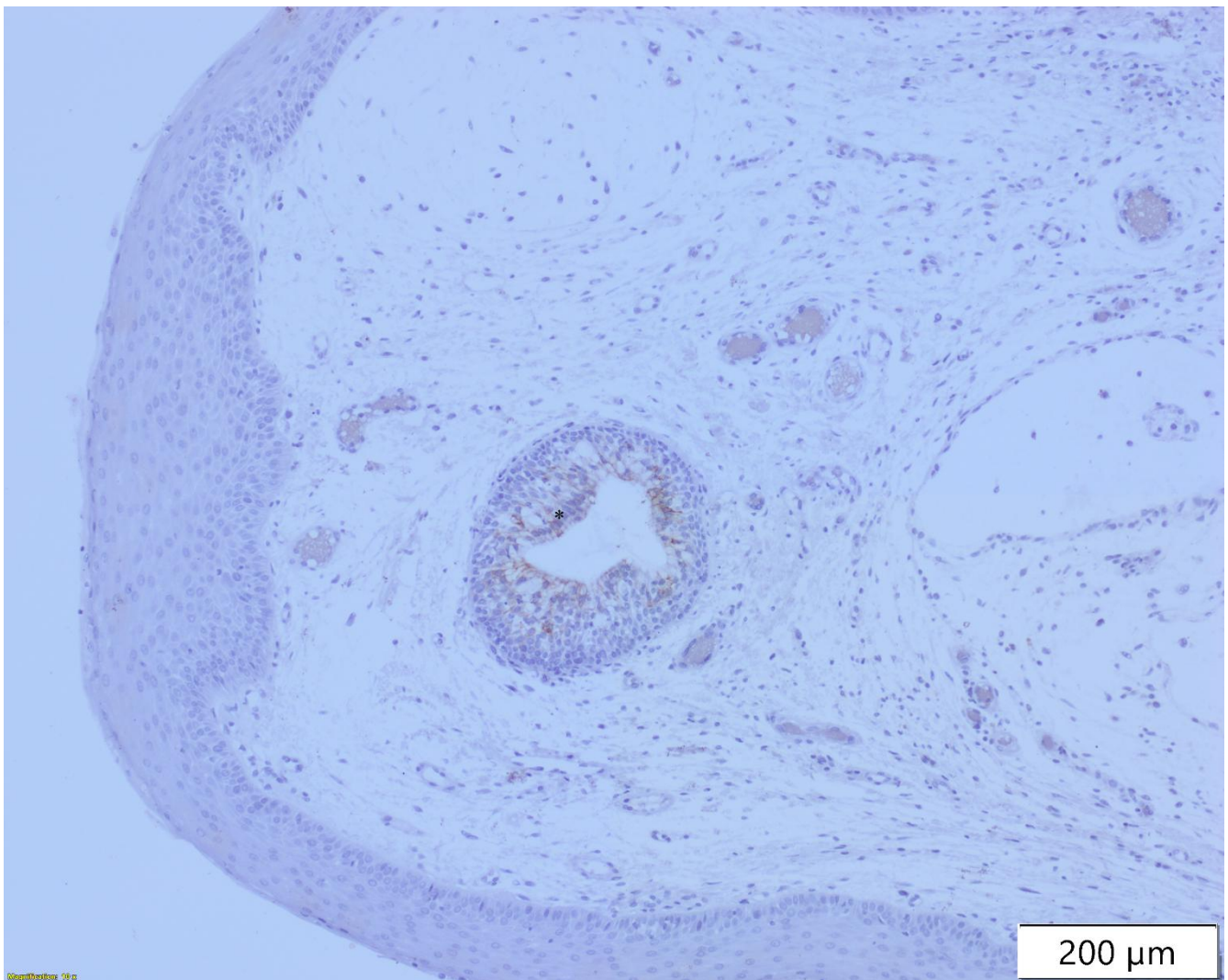
Ekspresija CK17 je uočena u 19 (95%) svih naših slučajeva polipa larinksa, dok ekspresije CK17 nema samo u jednom slučaju (5%). U 2 (10%) slučajaja ekspresija CK17 je fokalna. U 11 (55%) slučajeva obrazac ekspresije je fokalan i mrljast. U 3 slučajaja (15%) obrazac ekspresije je najvećim delom mrljast, ali se u određenim delovima lezije uočava i difuzna ekspresija CK17. U 3 (15%) naših slučajeva CK17 se eksprimira difuzno najvećim delom (Slika 19). Intenzitet ekspresije CK17 varira od slabog do jakog u istoj leziji. Svi delovi epitela u kojima se eksprimira CK17 su regularnih patohistoloških osobina (Tabela 14).

Tabela 14: Imunohistohemijaska ekspresija CK8, CK10, CD13 i CK17 u polipima larinksa.

IHH skor	CK8		CK10		CK13		CK17	
	N	%	N	%	N	%	N	%
0	20	100	10	50	14	70	1	5
1	0	0	5	25	2	10	2	10
2	0	0	4	20	4	20	11	55
3	0	0	1	5	0	0	3	15
4	0	0	0	0	0	0	3	15

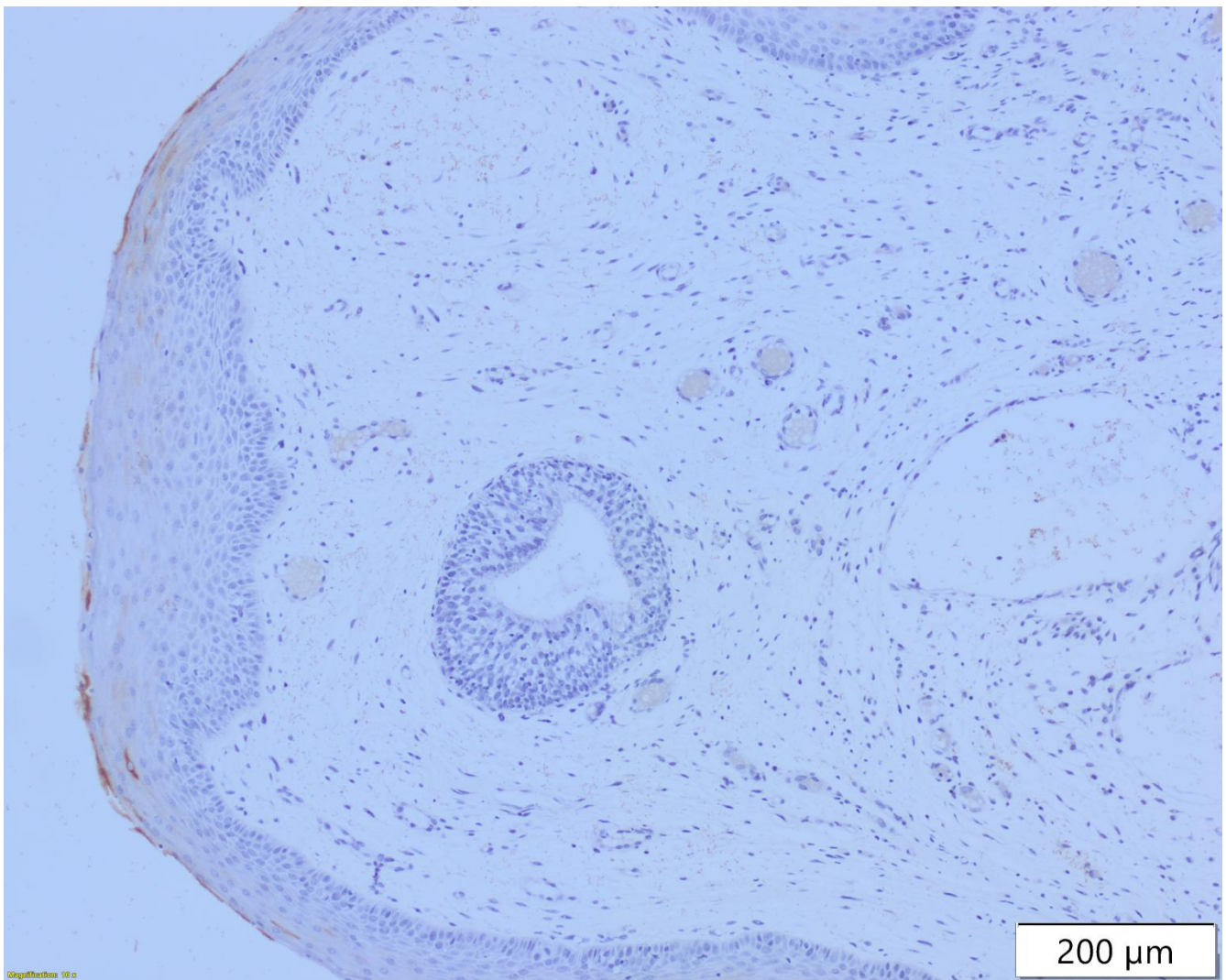


Slika 15: polip larinksa, (HE \times 100).

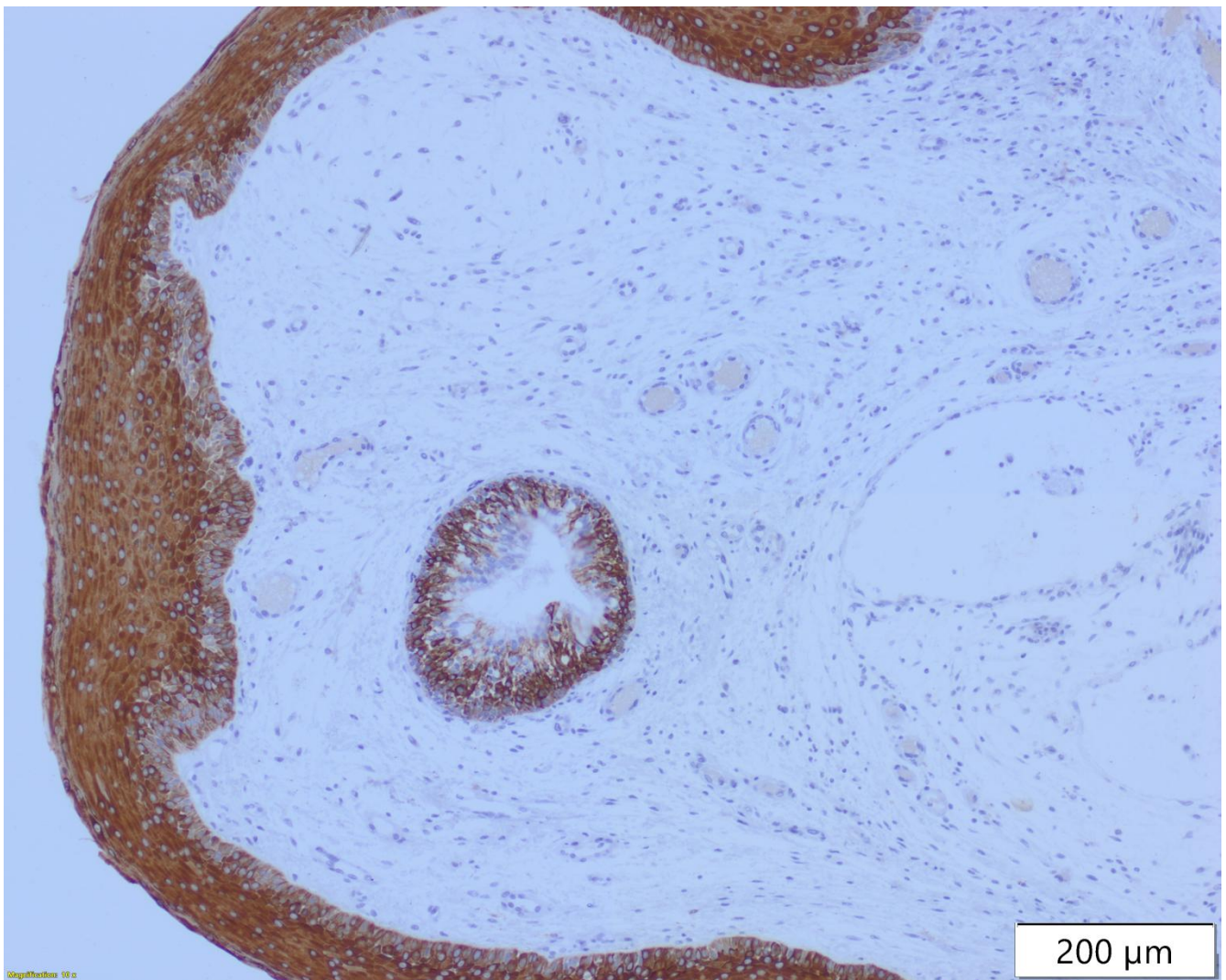


Copyright © 2019

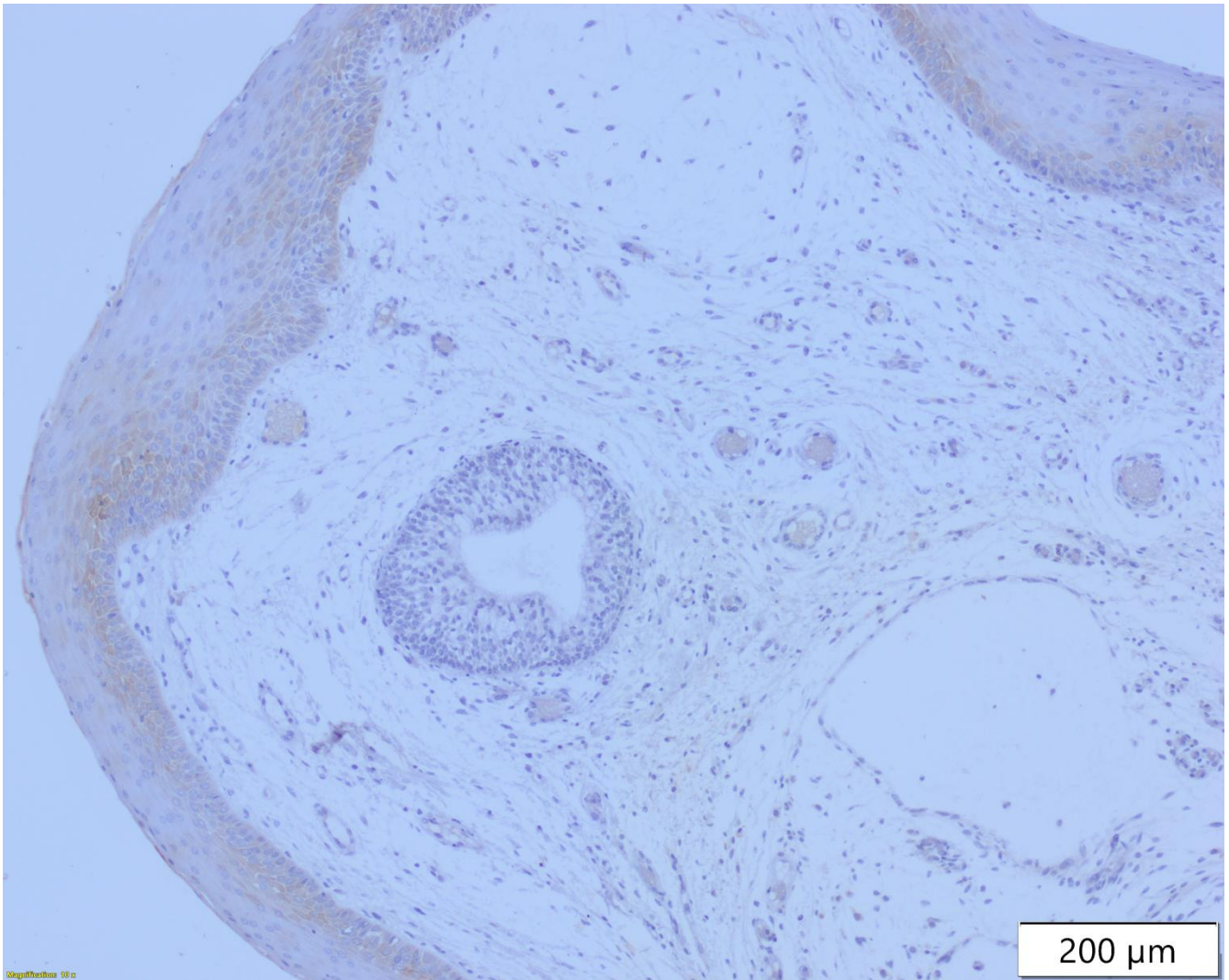
Slika 16: Polip larinksa, (CK8x100). Nema ekspresije CK8 u epitelu polipa larinksa. *CK8 se eksprimira u žlezdanom epitelu, što služi kao unutrašnja pozitivna kontrola.



Slika 17: Polip larinksa, (CK10x100). Uočava se fokalna i mrljasta CK10 pozitivnost u površnim delovima epitela.



Slika 18: Polip larinksa, (CK13x100). Homogena ekspresija CK13 u epitelu polipa larinksa.



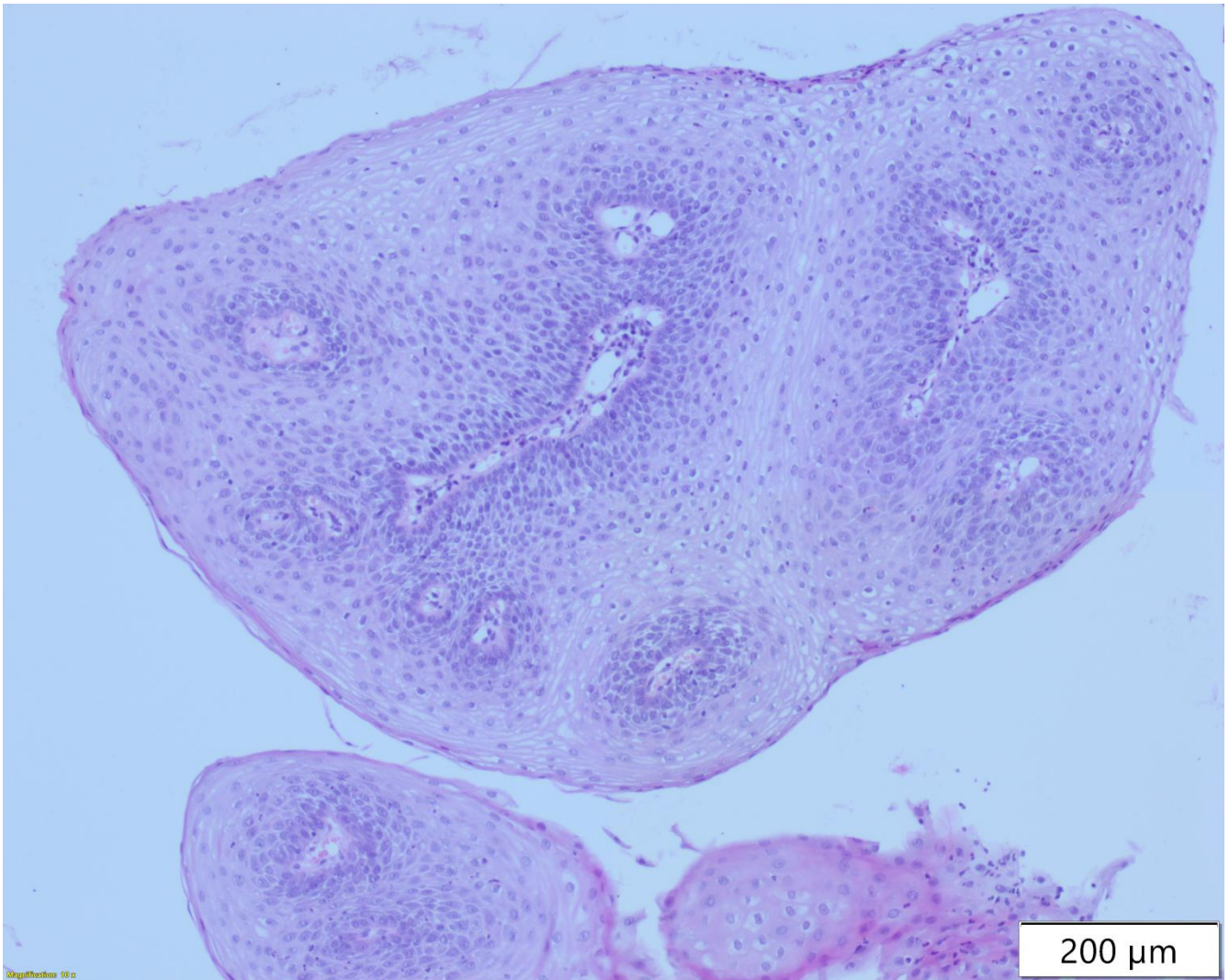
Slika 19: Polip larinksa, (CK17x100). Uočava se difuzna pozitivnost ćelija u suprabazalnom sloju na CK17

4.2.4. Imunohistochemijska ekspresija CK8, CK10, CK13 i CK17 u papilomima larinksa

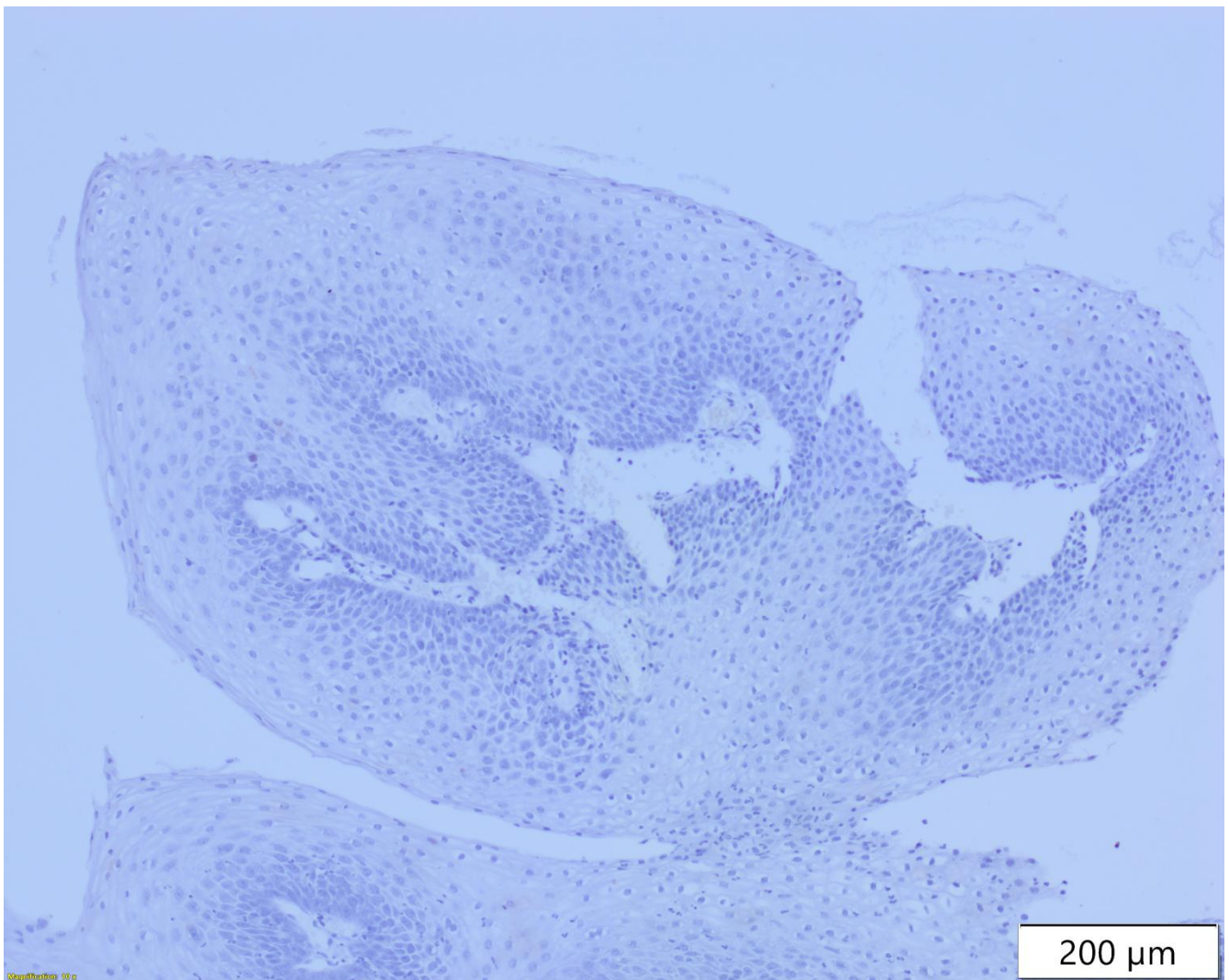
U Tabeli 15 su predstavljene vrednosti skorova ekspresije CK8, CK10, CK13 i CK17 u papilomima larinksa. U našim uzorcima papiloma larinksa (Slika 20) nije uočena ekspresija CK8 (Slika 21) i CK10 (Slika 22). CK13 je jako i difuzno pozitivan u 19 (95%) naših slučajeva (Slika 23), dok se u jednom slučaju (5%) uočava gubitak ekspresije CK13 u nekoliko fokusa u kojima je epitel regularnih patohistoloških osobina. Ekspresija CK17 nije uočena u 17 (85%) naših slučajeva papiloma larinksa (Slika 24), dok je u jednom slučaju (5%) uočena fokalna pozitivnost, u jednom slučaju (5%) fokalna i mrljasta pozitivnost i u jednom slučaju (5%) dominantno difuzna pozitivnost (Tabela 15). Intenzitet ekspresije CK17 varira od vrlo slabog do jakog u svakom slučaju u kome je uočena pozitivnost epitelnih ćelija na CK17. Epitel u kome je uočena pozitivnost na CK17 ne pokazuje znake displazije niti znake maligne alteracije, to jest, regularnih je patohistoloških osobina.

Tabela 15: Imunohistochemijska ekspresija CK8, CK10, CD13 i CK17 u papilomima larinksa.

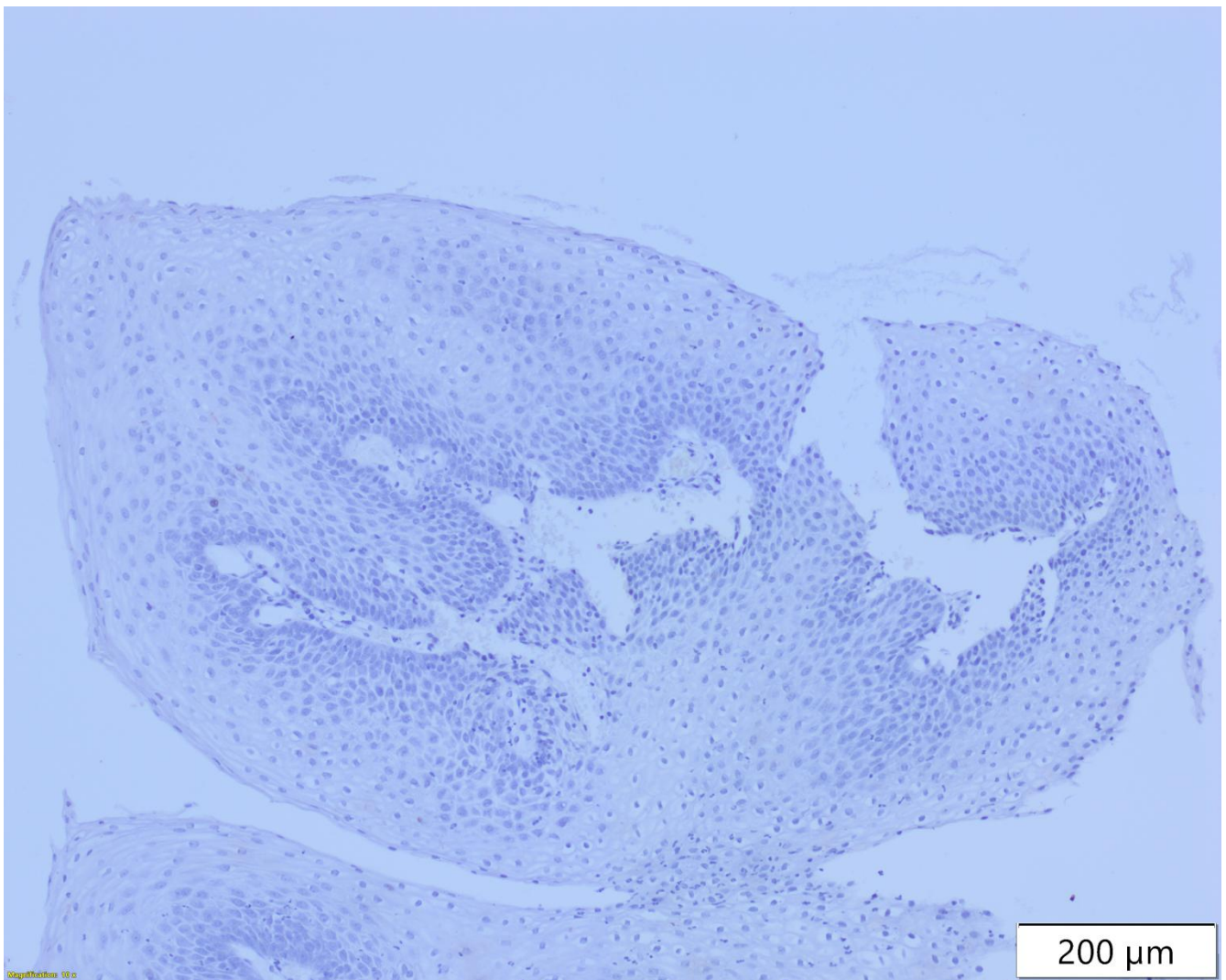
IHH skor	CK8		CK10		CK13		CK17	
	N	%	N	%	N	%	N	%
0	20	100	20	0	19	95	17	85
1	0	0	0	0	0	0	1	5
2	0	0	0	0	1	5	1	5
3	0	0	0	0	0	0	1	5
4	0	0	0	0	0	0	0	0



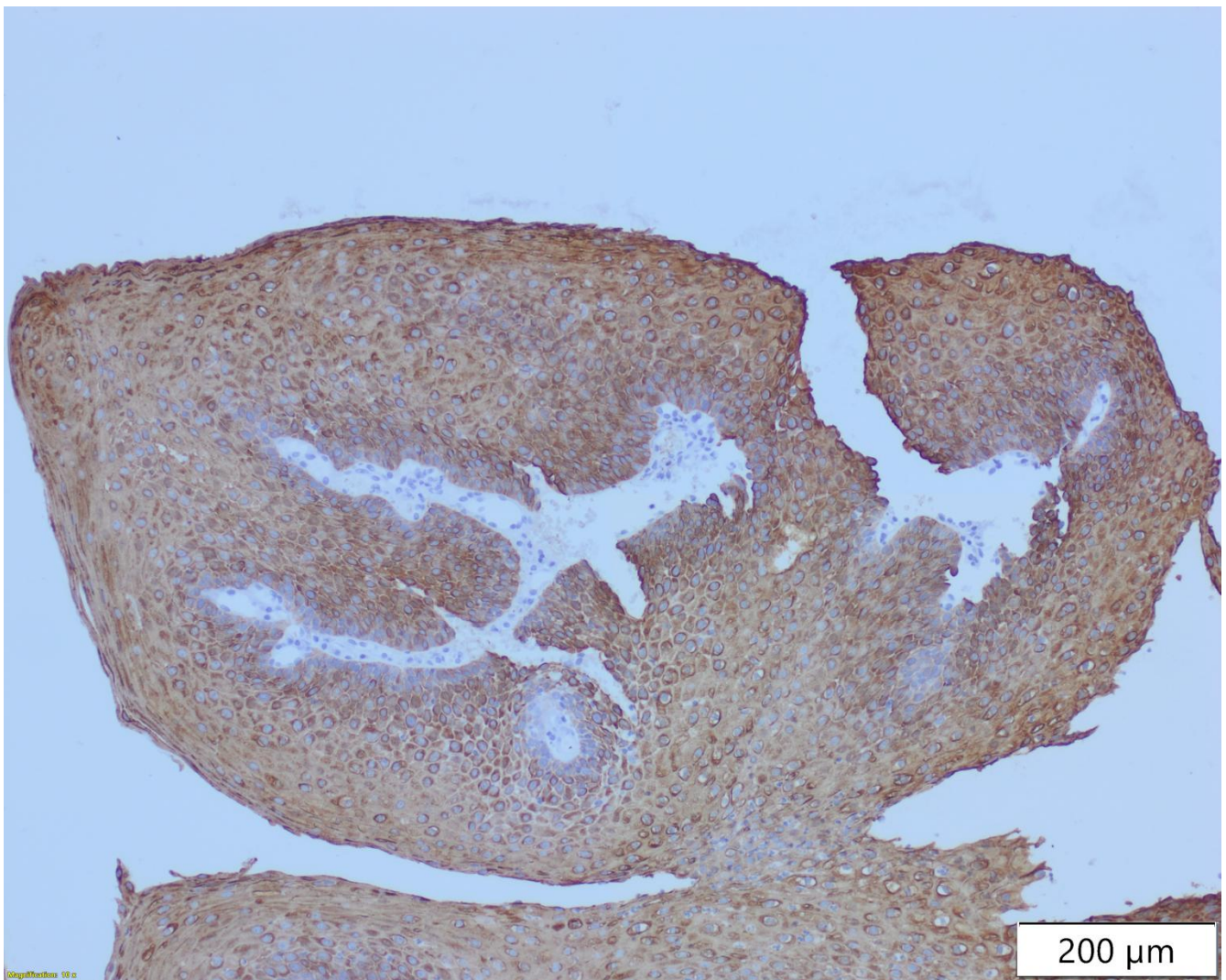
Slika 20: Papilom larinksa, (HEx100).



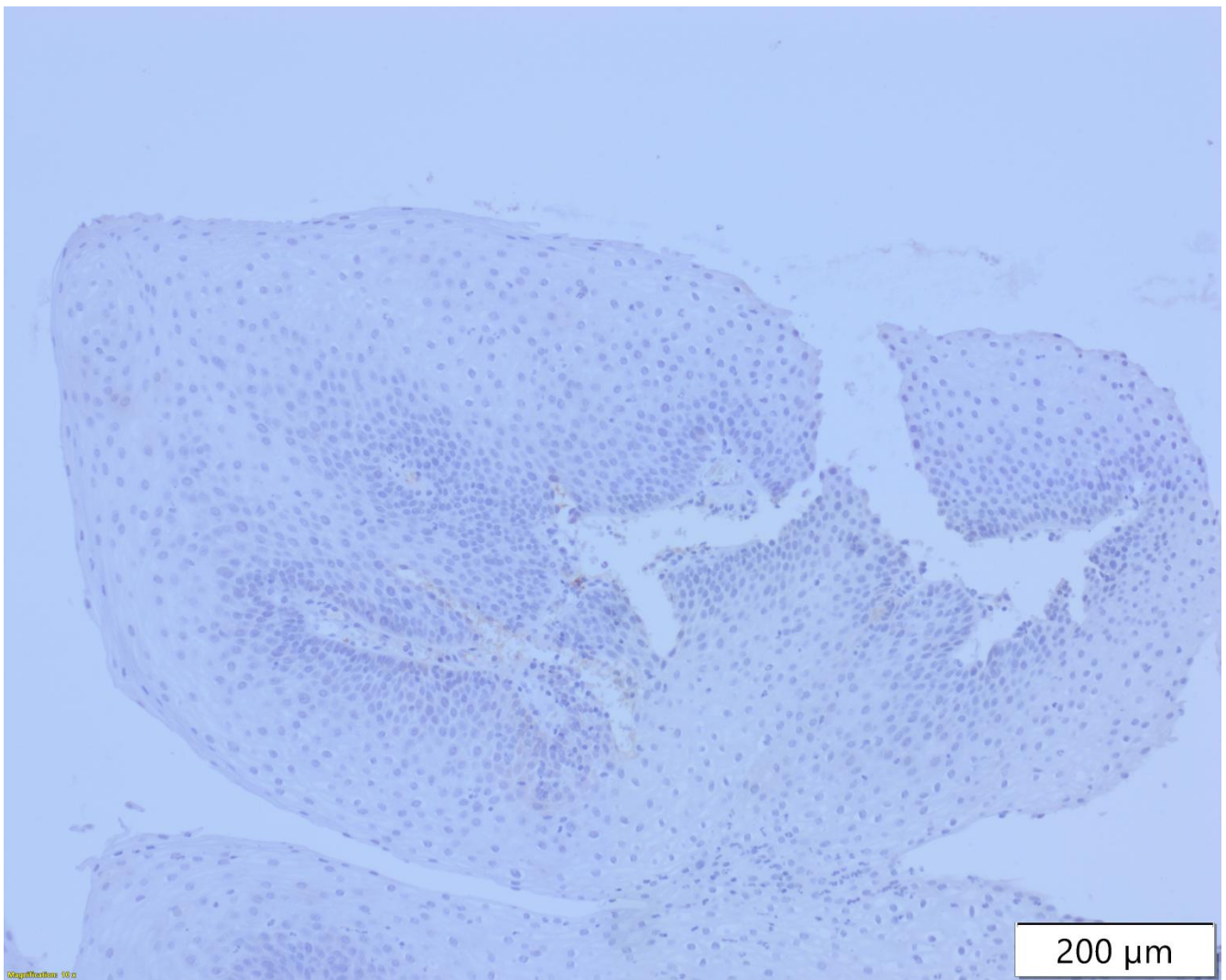
Slika 21: Papilom larinksa, (CK8x100). U epitelu nema ekspresije CK8



Slika 22: Papilom larinksa, (CK10x100). U epitelu nema ekspresije CK8



Slika 23: Papilom larinksa, (CK13x100). U epitelu se uočava homogena ekspresija CK13.



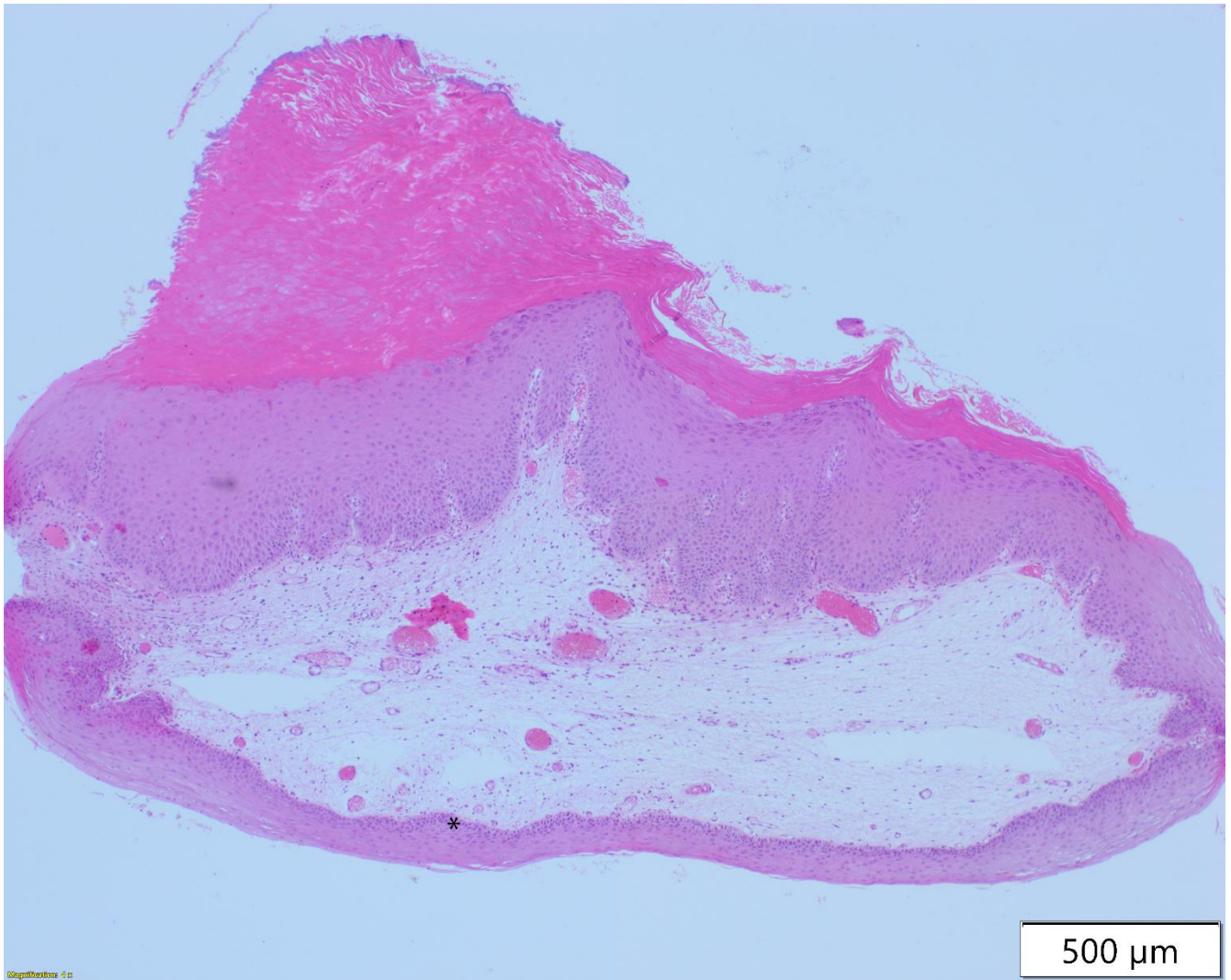
Slika 24: Papilom larinksa, (CK17x100). U epitelu nema ekspresije CK17

4.2.5. Imunohistohemijska ekspresija CK8, CK10, CK13 i CK17 u papilarnoj keratozi larinksa

U Tabeli 16 su predstavljene vrednosti skorova ekspresije CK8, CK10, CK13 i CK17 u papilarnoj keratozi larinksa. U našim uzorcima papilarne keratoze larinksa (Slika 25) nije uočena ekspresija CK8 (Slika 26). U 6 (50%) naših slučajeva je uočena ekspresija CK10. U jednom slučaju (8,3%) je ekspresija CK10 fokalna, dok je u 5 slučajeva (41,7%) ekspresija CK10 difuzna u fokusima keratinizacije (Slika 27) i mrljasta u epitelu ispod fokusa keratinizacije (Slika 27). Ekspresija CK13 je homogena i difuzna u 2 (16,7%) naša slučajeva papilarne keratoze larinksa. U 6 slučajeva je zabeležen fokalni gubitak ekspresije CK13, dok je u 4 slučaja (33,3%) uočen difuzni gubitak ekspresije CK13 (Slika 28). U 8 (66,7%) slučajeva je uočena ekspresija CK17, dok ekspresije CK17 nema u 4 (33,3%) naša slučajeva papilarne keratoze larinksa. U jednom slučaju (8,3%) ekspresija CK17 je fokalna, u 5 slučajeva (41,7%) ekspresija CK17 je delom fokalna, delom mrljasta, a u 2 (16,7%) slučajeva je obrazac ekspresije CK17 dominantno difuzan (Slika 29). Intenzitet ekspresije CK17 varira od vrlo slabog do jakog u istoj leziji. Nešto jači intenzitet ekspresije CK17 je uočen u fokusima keratinizacije.

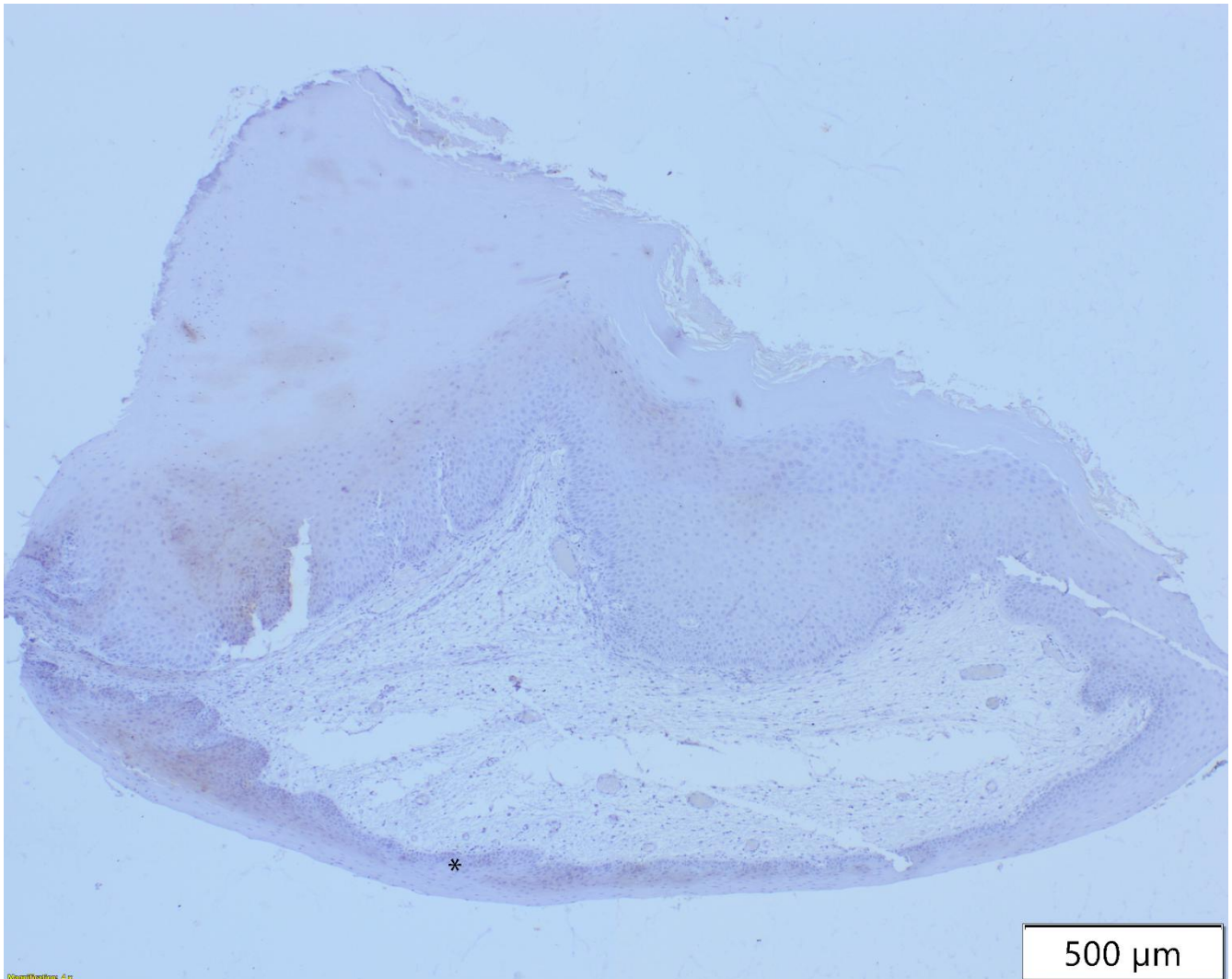
Tabela 16: Imunohistohemijska ekspresija CK8, CK10, CK13 i CK17 u papilarnoj keratozi larinksa.

IHH skor	CK8		CK10		CK13		CK17	
	N	%	N	%	N	%	N	%
0	12	100	6	50	2	16.7	4	33.3
1	0	0	1	8.3	0	0	1	8.3
2	0	0	5	41.7	6	50	5	41.7
3	0	0	0	0	4	33.3	2	16.7
4	0	0	0	0	0	0	0	0



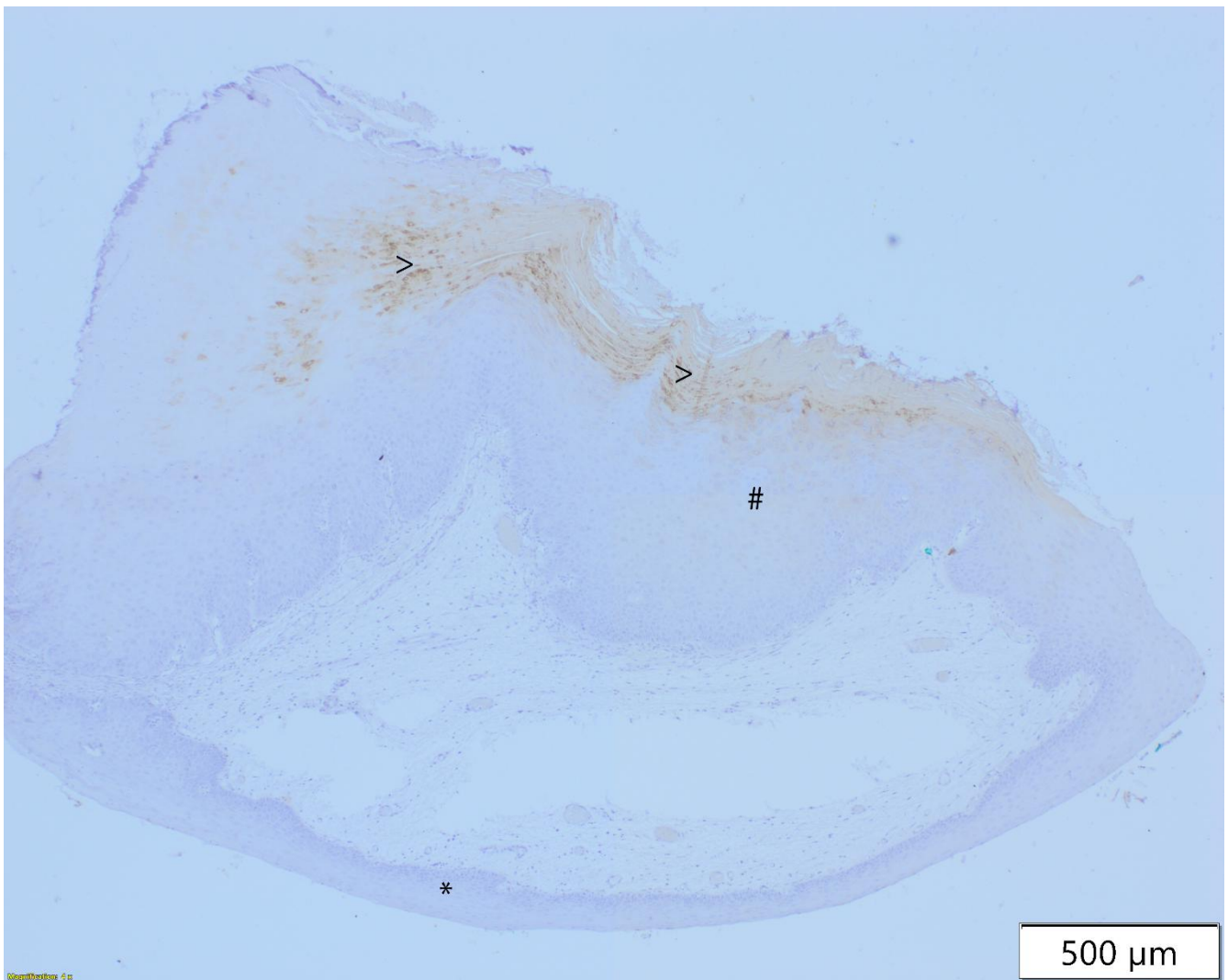
Copyright © 2015

Slika 25. Papilarna keratoza larinksa, (HEx40), * označava normalan epitel larinksa



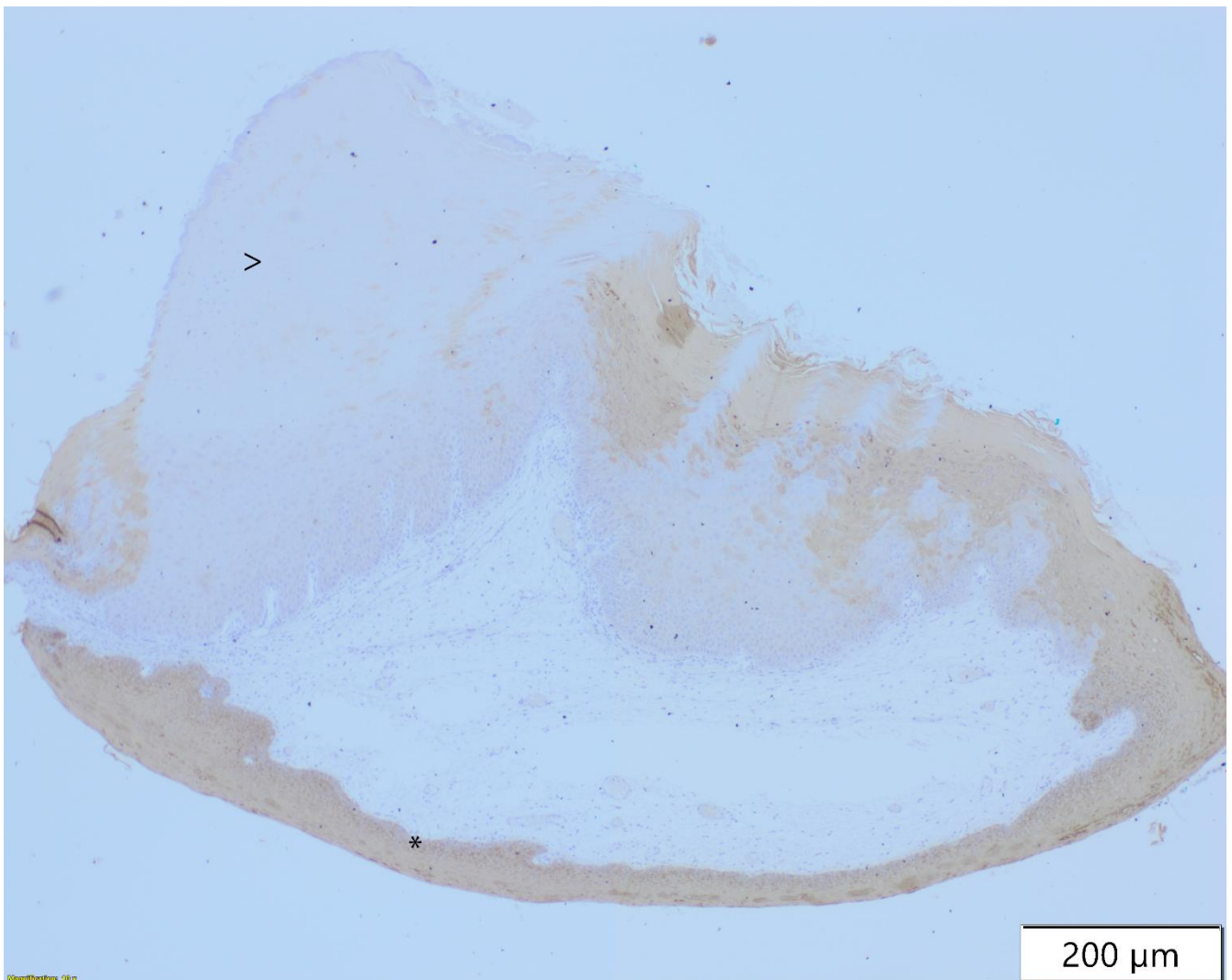
Copyright © 2015

Slika 26. Papilarna keratoza larinksa, (CK8x40). Nema ekspresije CK8 u epitelu.*označava normalan epitel larinksa u kome takođe nema ekspresije CK8



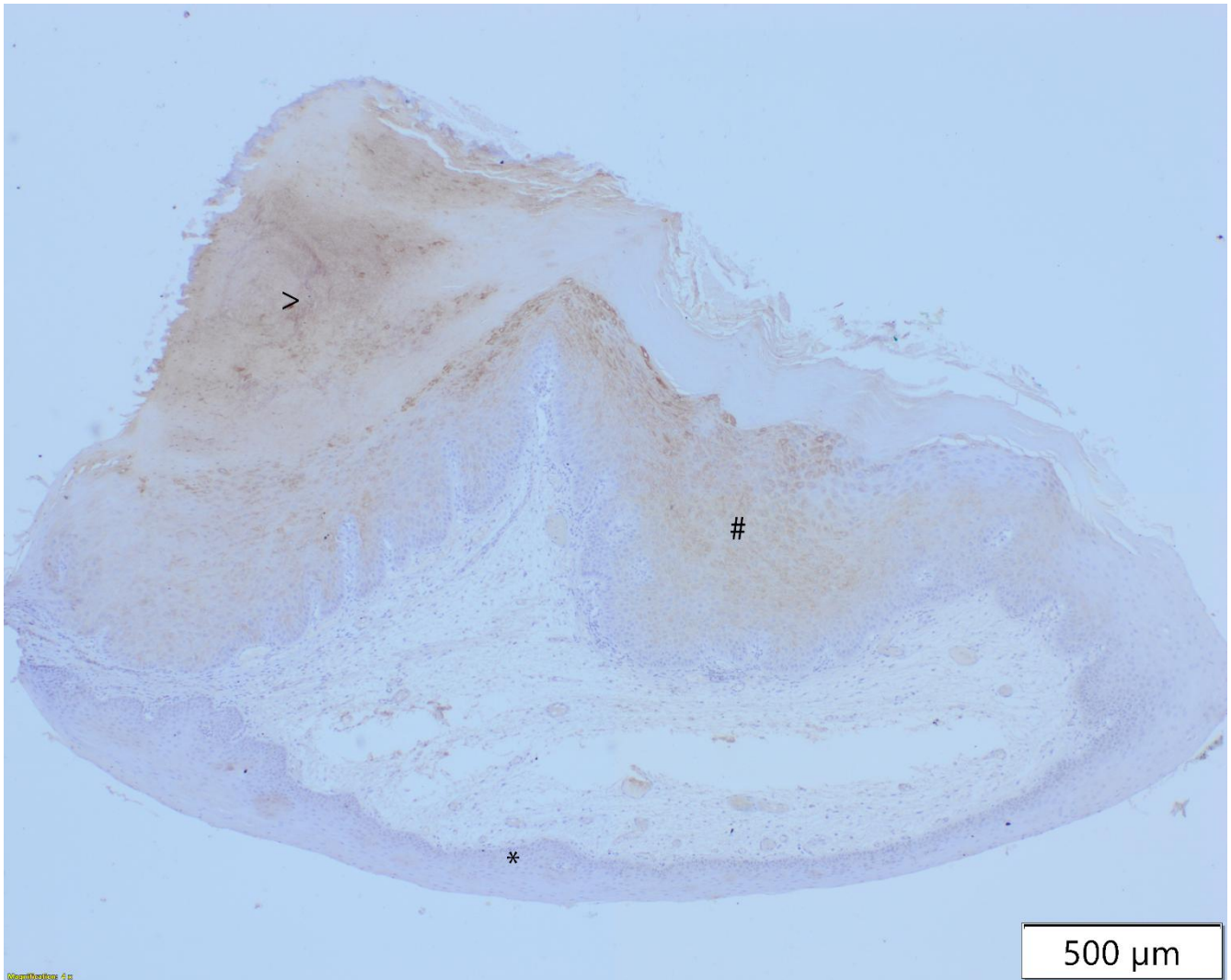
Copyright © 2015

Slika 27. Papilarna keratoza larinksa, (CK10x40); > Uočava se difuzna ekspresija CK10 u hiperkeratotičnom sloju; # mrljasta ekspresija CK10 u spinoznom sloju; * normalan epitel larinksa



Copyright © 2012

Slika 28. Papilarna keratoza larinksa, (CK13x40); >Uočava se difuzni gubitak ekspresije CK13 u leziji;
*u normalnom epitelu larinksa je ekspresija CK13 homogena



Copyright © 2010

Slika 29. Papilarna keratoza larinksa, (CK17x10). >Uočava se difuzna pozitivnost na CK17 u hiperkeratotičnom epitelu; # difuzna ekspresija CK17 u spinoznom i pljosnatom sloju epitela; *u normalnom epitelu larinksa nema ekspresije CK17

4.2.6. Imunohistohemijska ekspresija CK8, CK10, CK13 i CK17 u displazijama larinksa

U Tabeli 17 su predstavljene vrednosti skorova ekspresije CK8, CK10, CK13 i CK17 u displazijama larinksa. U našem uzorku se nalazi ukupno 28 slučajeva displazija larinksa, 10 displazija niskog gradusa i 18 slučajeva visokog gradusa. Ni u jednom od naših slučajeva sa dijagnostikovanim displazijama larinksa nije uočena ekspresija CK8. Ekspresija CK10 nije uočena u 8 (28,6%) slučajeva sa dijagnostikovanim displazijama, dok je uočena u 20 (71,4%) slučajeva. Ekspresija CK13 je delimično ili potpuno izgubljena u svim slučajevima sa dijagnostikovanom displazijom i to u fokusima u kojima se uočavaju displastične promene. Ekspresija CK17 nije uočena u 13 (46,4%) svih naših slučajeva sa dijagnostikovanom displazijom, dok se CK17 ekspresira u 15 (53,6%) slučajeva sa dijagnostikovanom displazijom. U istoj leziji se uočava nekoliko obrazaca ekspresije CK17. Obrasci ekspresije CK17 koji su uočeni su fokalna ekspresija u pojedinačnim ćelijama, ekspresija u manjim plažama ćelija i difuzna ekspresija u celoj leziji koja je uočena u samo dva slučaja (7,2%).

Tabela 17: Imunohistohemijska ekspresija CK8, CK10, CD13 i CK17 u displazijama larinksa.

IHH skor	CK8		CK10		CK13		CK17	
	N	%	N	%	N	%	N	%
0	28	100	8	28.6	0	0	13	46.4
1	0	0	5	17.9	1	3.6	3	10.7
2	0	0	9	32.1	7	25	9	32.1
3	0	0	4	14.3	16	57.1	1	3.6
4	0	0	2	7.1	4	14.3	2	7.2

4.2.7 Imunohistohemijska ekspresija CK8, CK10, CK13 i CK17 u displazijama larinksa niskog gradusa

U Tabeli 18 su predstavljene vrednosti skorova ekspresije CK8, CK10, CK13 i CK17 u displazijama larinksa niskog gradusa. U našim slučajevima displazije niskog gradusa (Slika 30) nije uočena ekspresija CK8 (Slika 31).

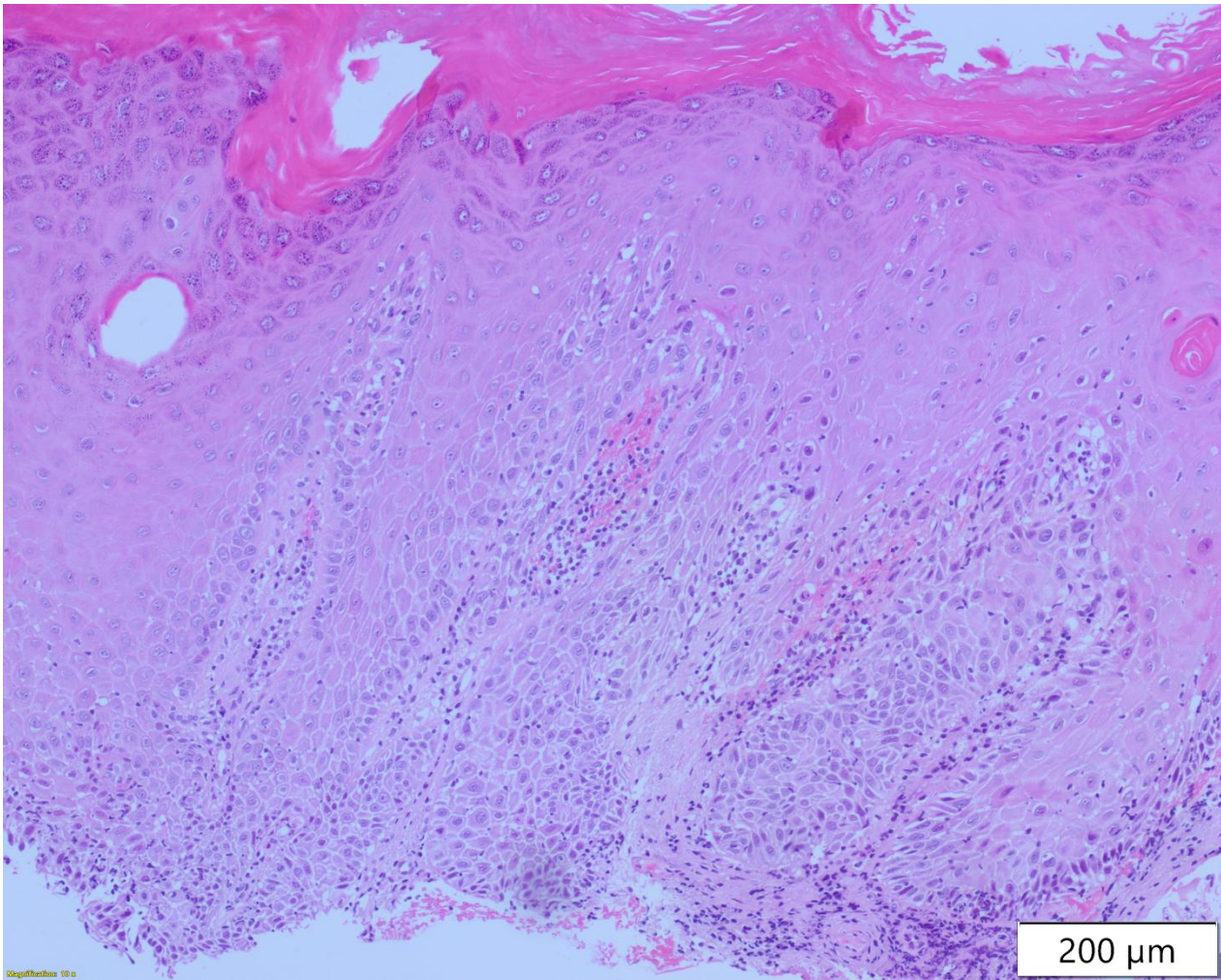
Ekspresija CK 10 je uočena u 9 (90%) slučajeva. Fokalna ekspresija CK10 je uočena u jednom (10%) slučaju, u 4 (40%) slučaja je ekspresija fokalna i mrljasta, u 4 (40%) slučajeva je ekspresija CK10 dominantno difuzna (Slika 32) i u jednom slučaju (10%) je ekspresija CK10 difuzna.

Gubitak ekspresije CK13 je zabeležen u svim slučajevima displazije larinksa niskog gradusa. Fokalni gubitak ekspresije CK13 je zabeležen u jednom (10%) slučaju, u 4 (40%) slučajeva je gubitak ekspresije mrljast (Slika 33) i fokalan, u 4 (40%) slučajeva je gubitak ekspresije dominantno difuzan, mada ima i mrljastog gubitka ekspresije, dok je u jednom slučaju zabeležena potpun gubitak ekspresije CK13. CK13 se ne ekspresira u epitelu koji je izmenjen, a u okolnom epitelu je ekspresija CK13 homogena.

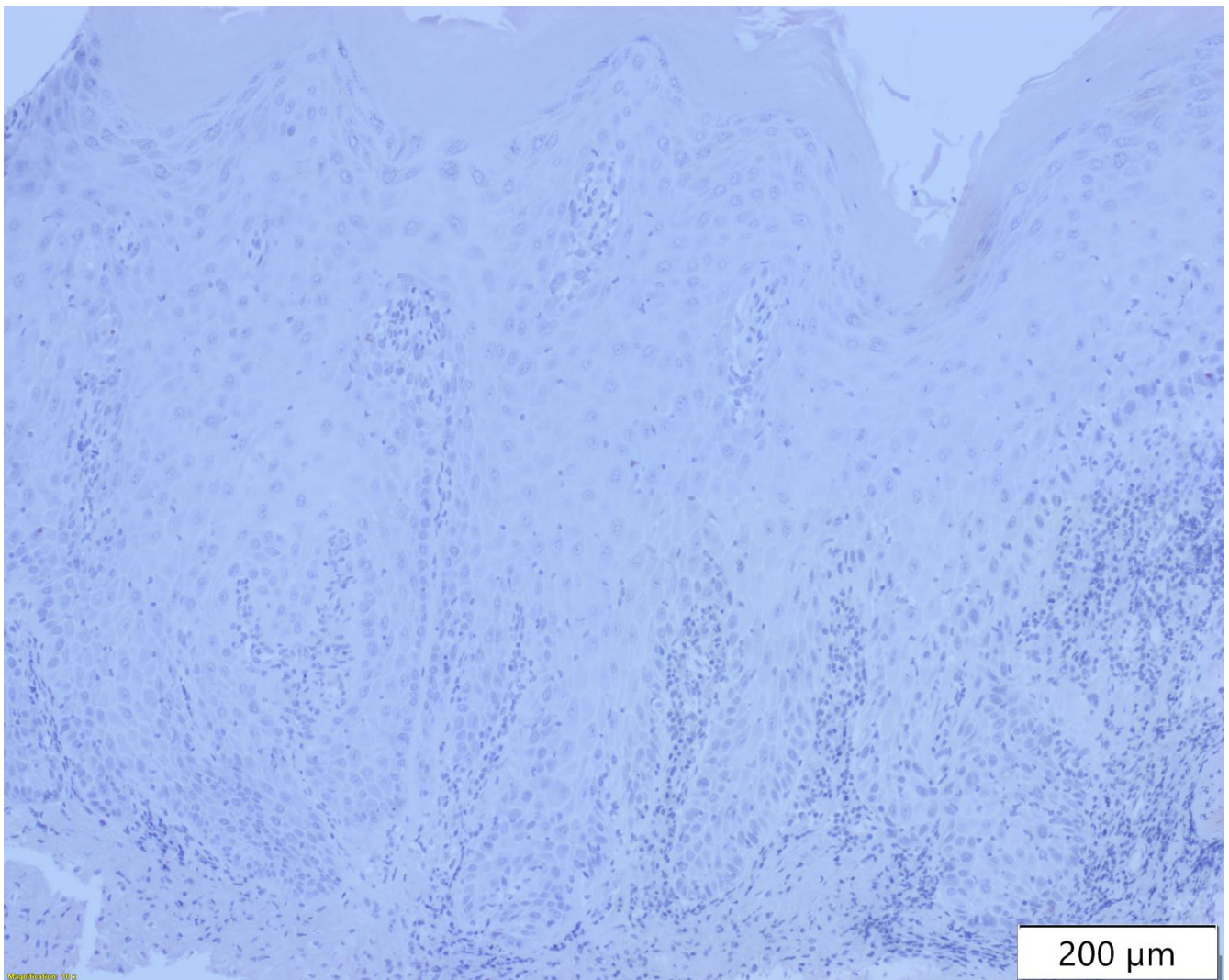
Ekspresija CK17 je uočena u 3 (30%) slučajeva displazije larinksa niskog gradusa, dok se CK17 ne ekspresira u 7 (70%) slučajeva (Slika 34). U 2 (20%) slučaja je uočena fokalna ekspresija CK17 dok je u jednom slučaju (10%) dominantno difuzna. Ekspresija CK17 se uočava u patološki izmenjenom epitelu i u istoj leziji intenzitet ekspresije varira od slabog do jakog.

Tabela 18: Imunohistohemijska ekspresija CK8, CK10, CD13 i CK17 u displazijama larinksa niskog gradusa.

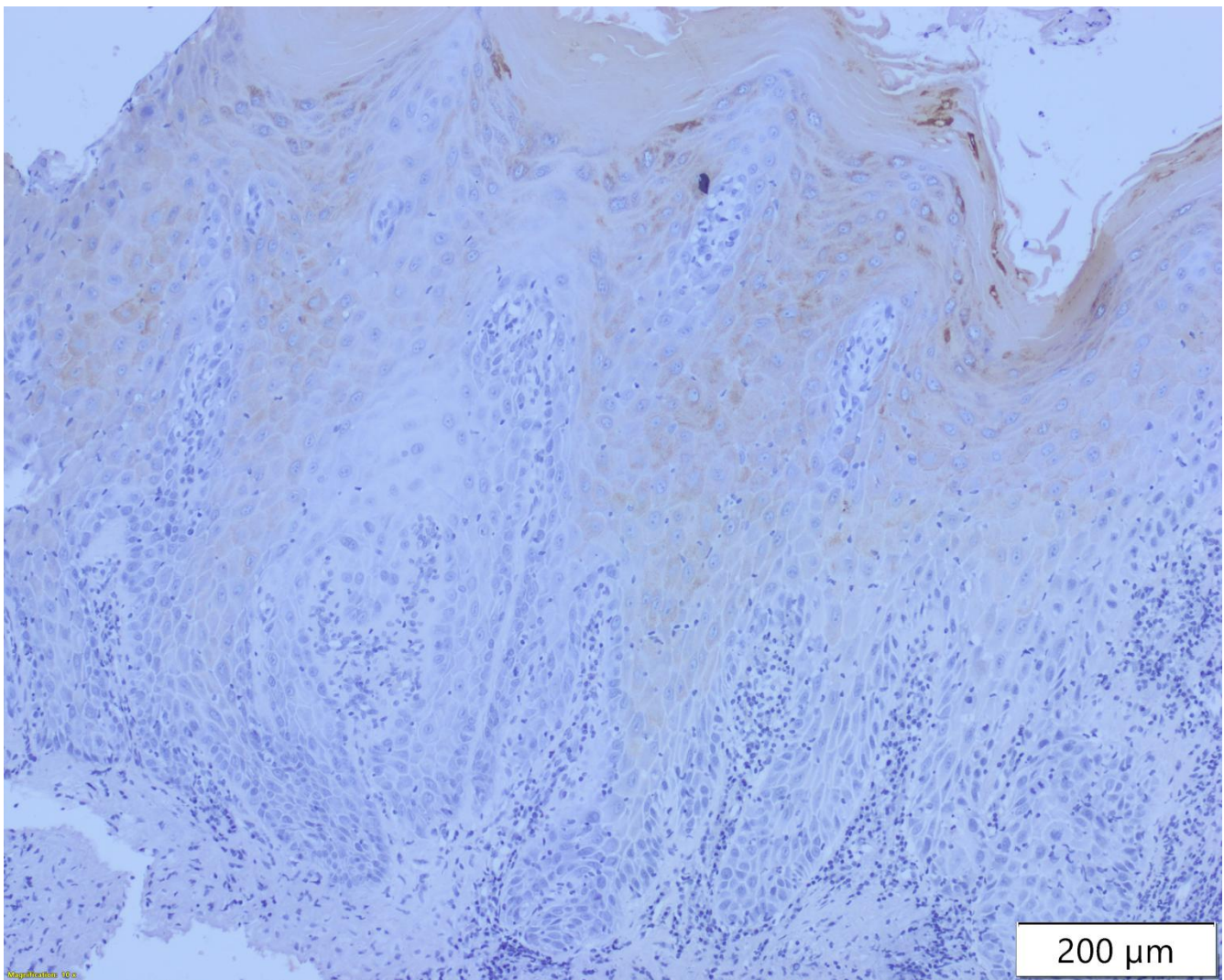
IHH skor	CK8		CK10		CK13		CK17	
	N	%	N	%	N	%	N	%
0	10	100	1	10	0	0	7	70
1	0	0	1	10	1	10	2	20
2	0	0	4	40	4	40	0	0
3	0	0	3	30	4	40	1	10
4	0	0	1	10	1	10	0	0



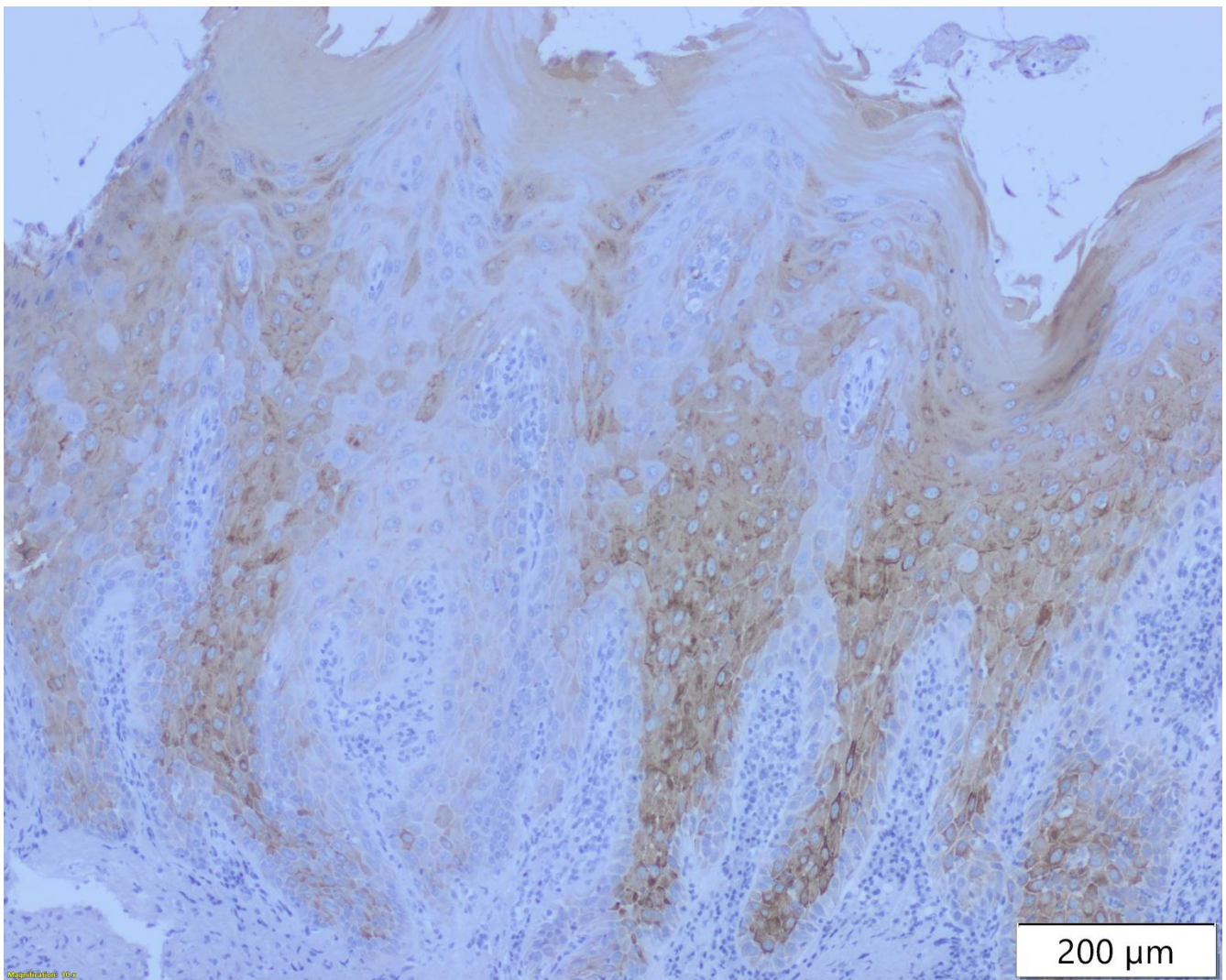
Slika 30: Displazija larinksa niskog gradusa (HEx100).



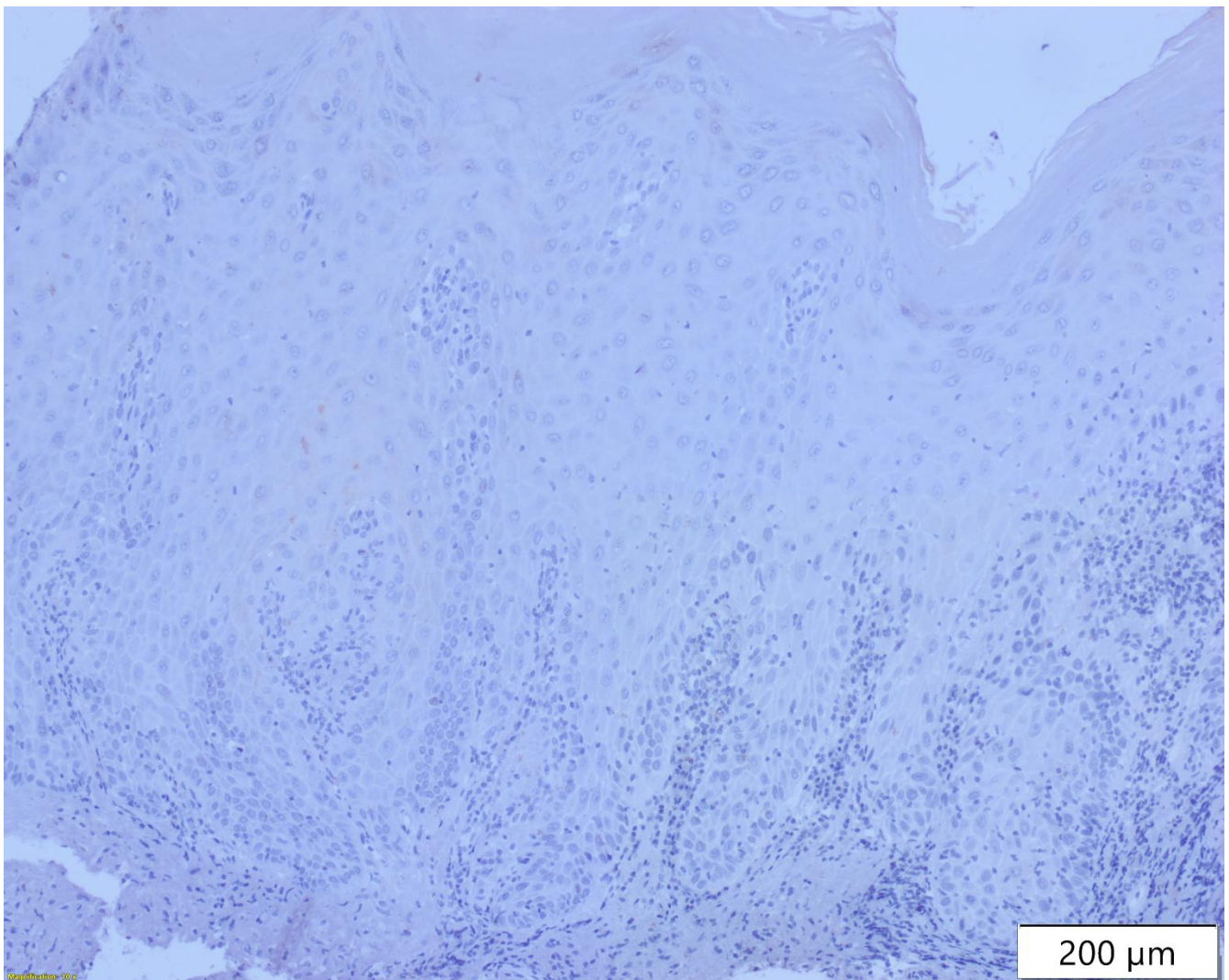
Slika 31: Displazija larinksa niskog gradusa, (CK8x100). U leziji se ne eksprimira CK8



Slika 32: Displazija larinksa niskog gradusa (CK10x100). Uočava se ekspresija CK10 u parakeratotičnom sloju i u spinoznom, sloju epitela.



Slika 33: Displazija larinksa niskog gradusa, (CK13x100). Uočava se mrljast gubitak ekspresije CK13 u epitelu lezije.



Slika 34: Displazija larinksa niskog gradusa, (CK17x100). U leziji se ne ekspirira CK17.

4.1.8. Imunohistohemijska ekspresija CK8, CK10, CK13 i CK17 u displazijama larinksa visokog gradusa

U Tabeli 19 su predstavljene vrednosti skorova ekspresije CK8, CK10, CK13 i CK17 u displazijama larinksa visokog gradusa.

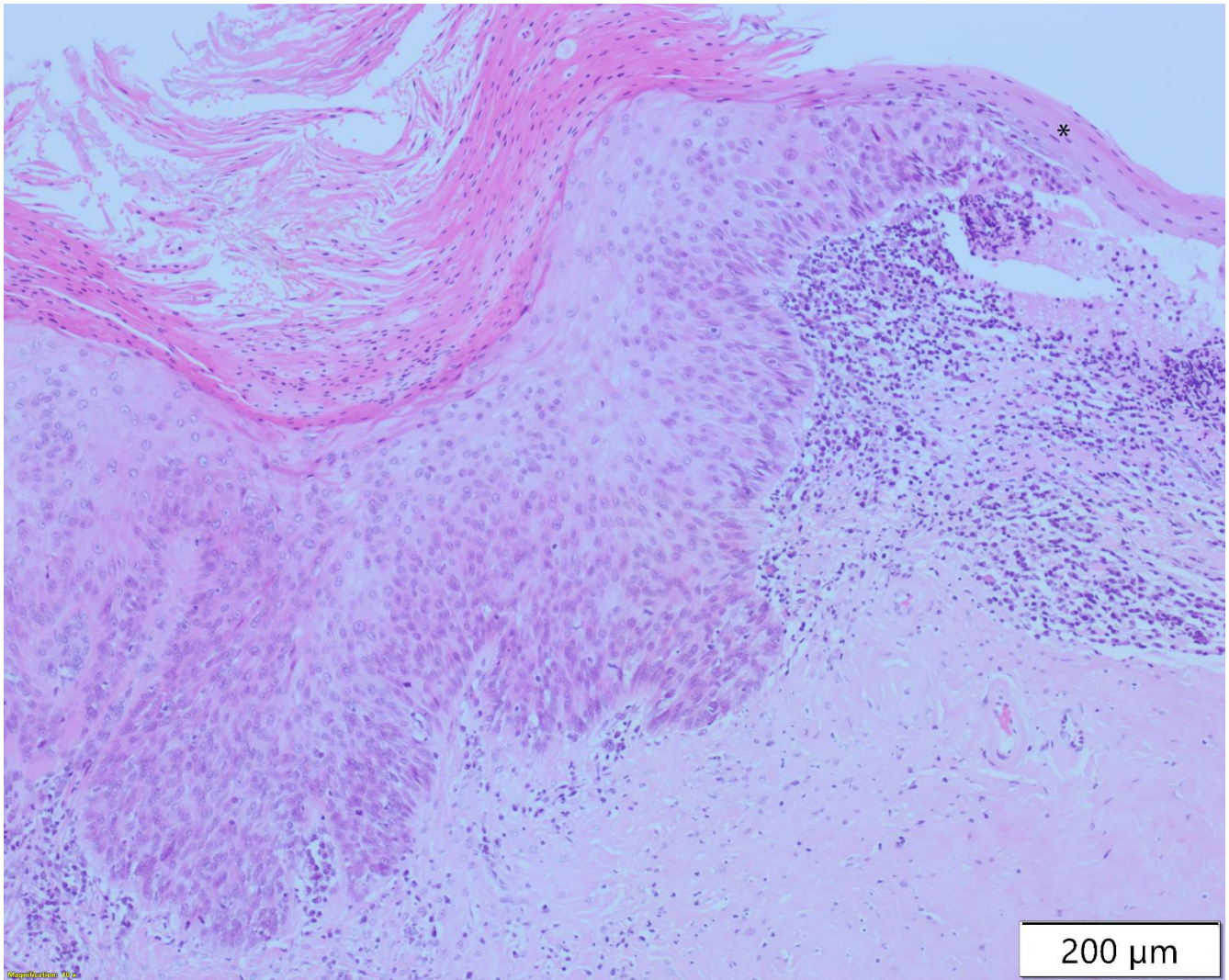
U slučajevima displazije visokog gradusa (Slika 35) nije uočena ekspresija CK8 (Slika 36).

CK10 je se eksprimira u 11 (61,2%) slučajeva. Ekspresija je fokalna u 4 (22,2%), fokalna i mrljasta u 5 (27.8%) slučajeva, dok je difuzna u 2 slučaja (11,2%). Ekspresija CK10 nije uočena u 11 slučajeva (61,2%) (Slika 37).

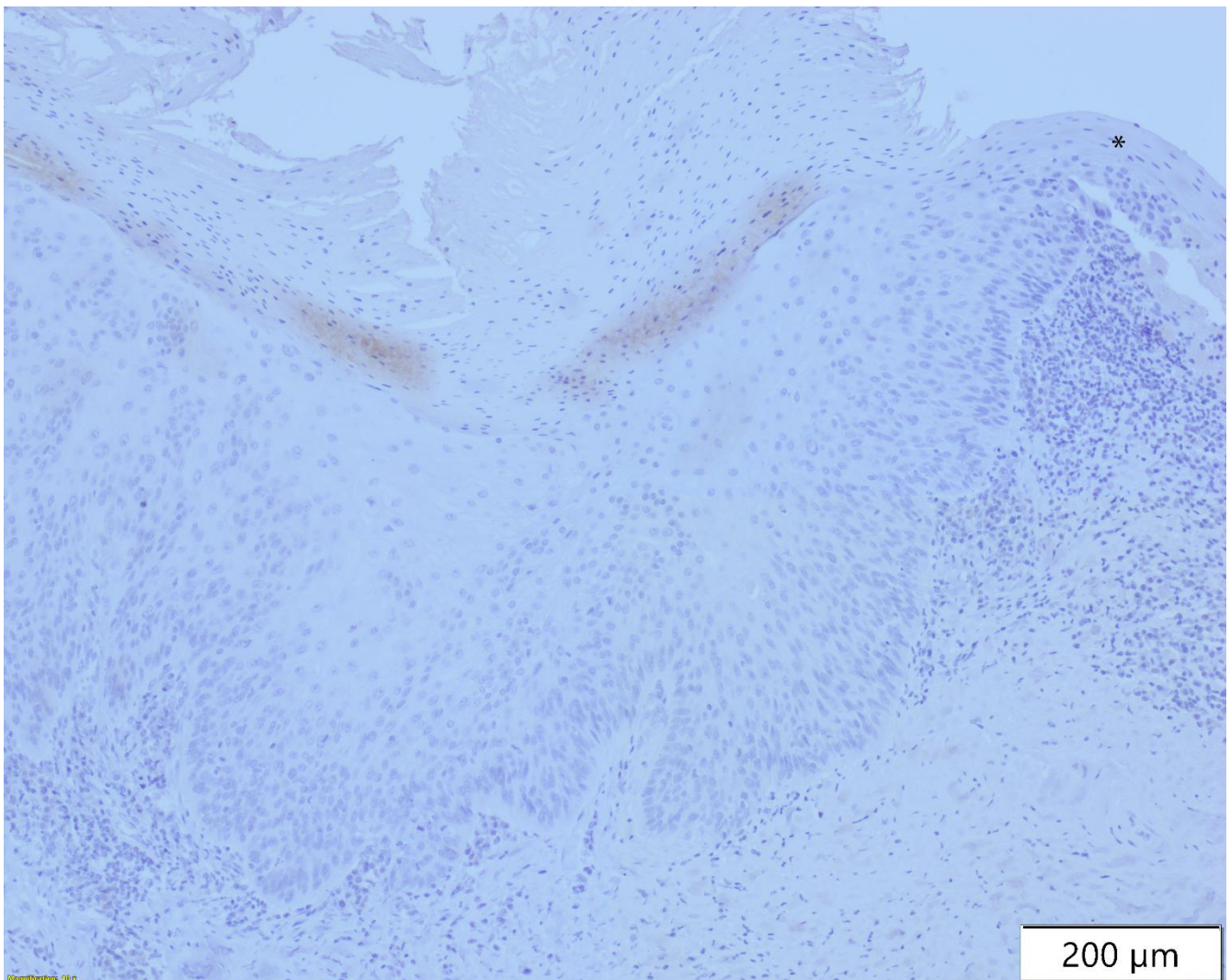
Gubitak ekspresije CK13 uočen je u svim slučajevima. U 2 (16,7%) slučaja je gubitak ekspresije mrljast i fokalan, dok je u 15 (83,3%) slučajeva gubitak ekspresije CK13 difuzan (Slika 38). CK17 se eksprimira u 12 (66,7%) slučajeva. Fokalna ekspresija CK17 je zabeležena u jednom slučaju (5.6%), u 9 (50%) slučajeva je ekspresija fokalna i mrljasta, dok je u 2 (11,1%) slučaja zabeležena difuzna ekspresija CK17 (Slika 39). CK17 se eksprimira u patološki izmenjenom epitelu. Intenzitet ekspresije varira u svakoj pojedinačnoj leziji od slabog do jakog.

Tabela 19: Imunohistohemijska ekspresija CK8, CK10, CD13 i CK17 u displazijama larinksa visokog gradusa.

IHH skor	CK8		CK10		CK13		CK17	
	N	%	N	%	N	%	N	%
0	18	100	7	38.8	0	0	6	33.3
1	0	0	4	22.2	0	0	1	5.6
2	0	0	5	27.8	3	16.7	9	50.0
3	0	0	1	5.6	12	66.6	0	0
4	0	0	1	5.6	3	16.7	2	11.1

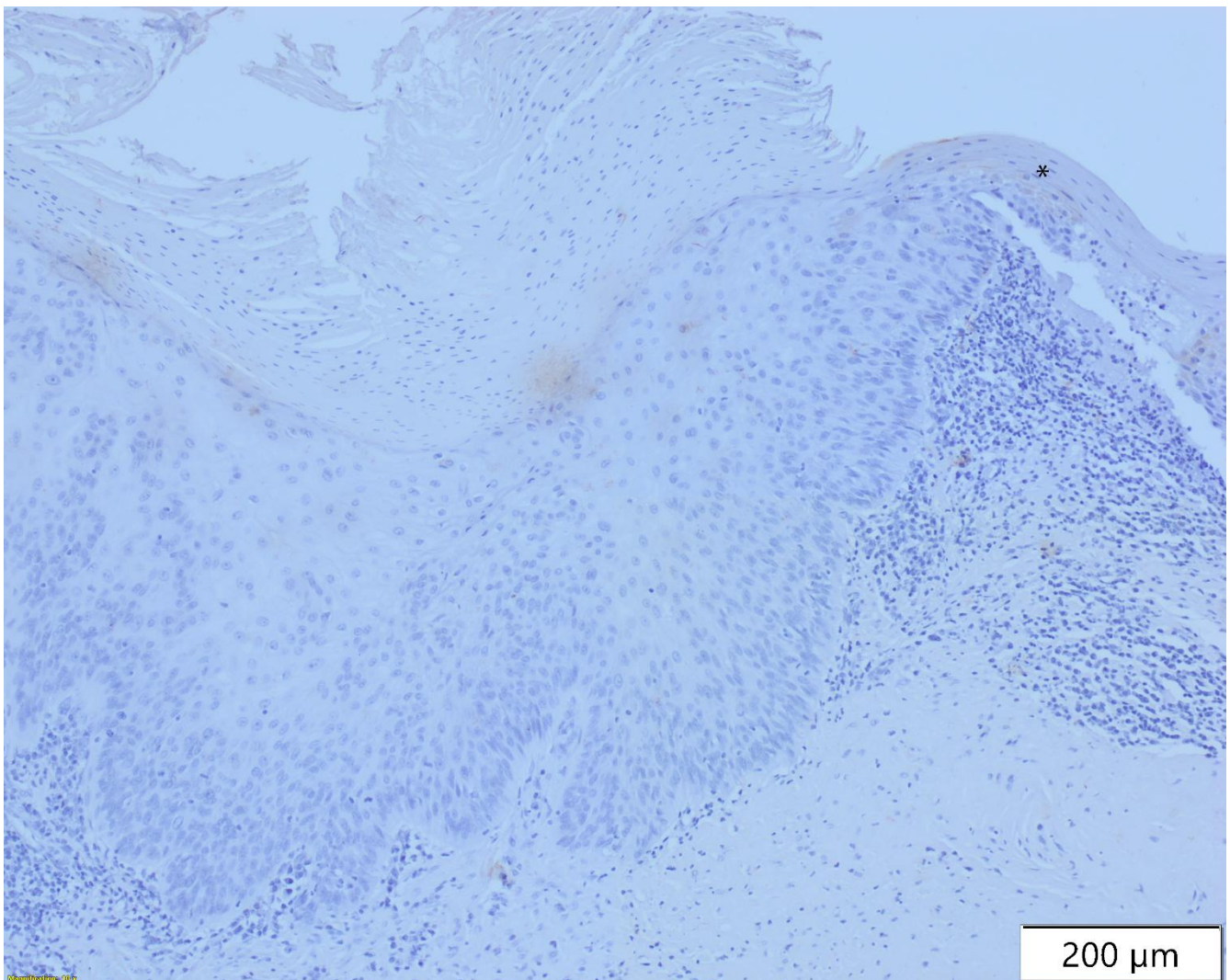


Slika 35: Displazija larinksa visokog gradusa, (HEx100); *normalan epitel larinksa



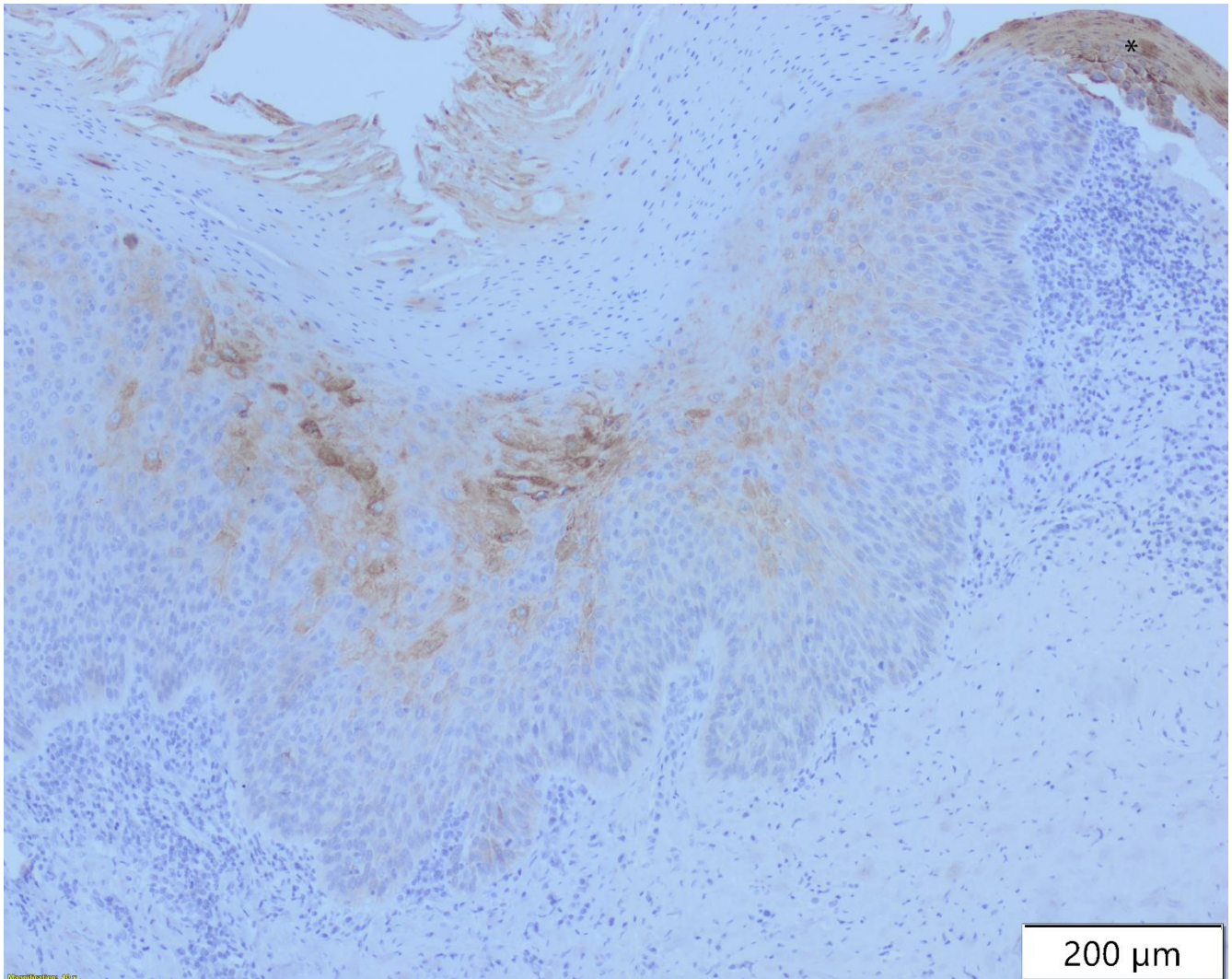
Copyright © 2014

Slika 36: Displazija larinksa visokog gradusa, (CK8x100). U leziji se ne ekspirira CK8 *CK8 se ne ekspirira ni u normalnom epitelu larinksa



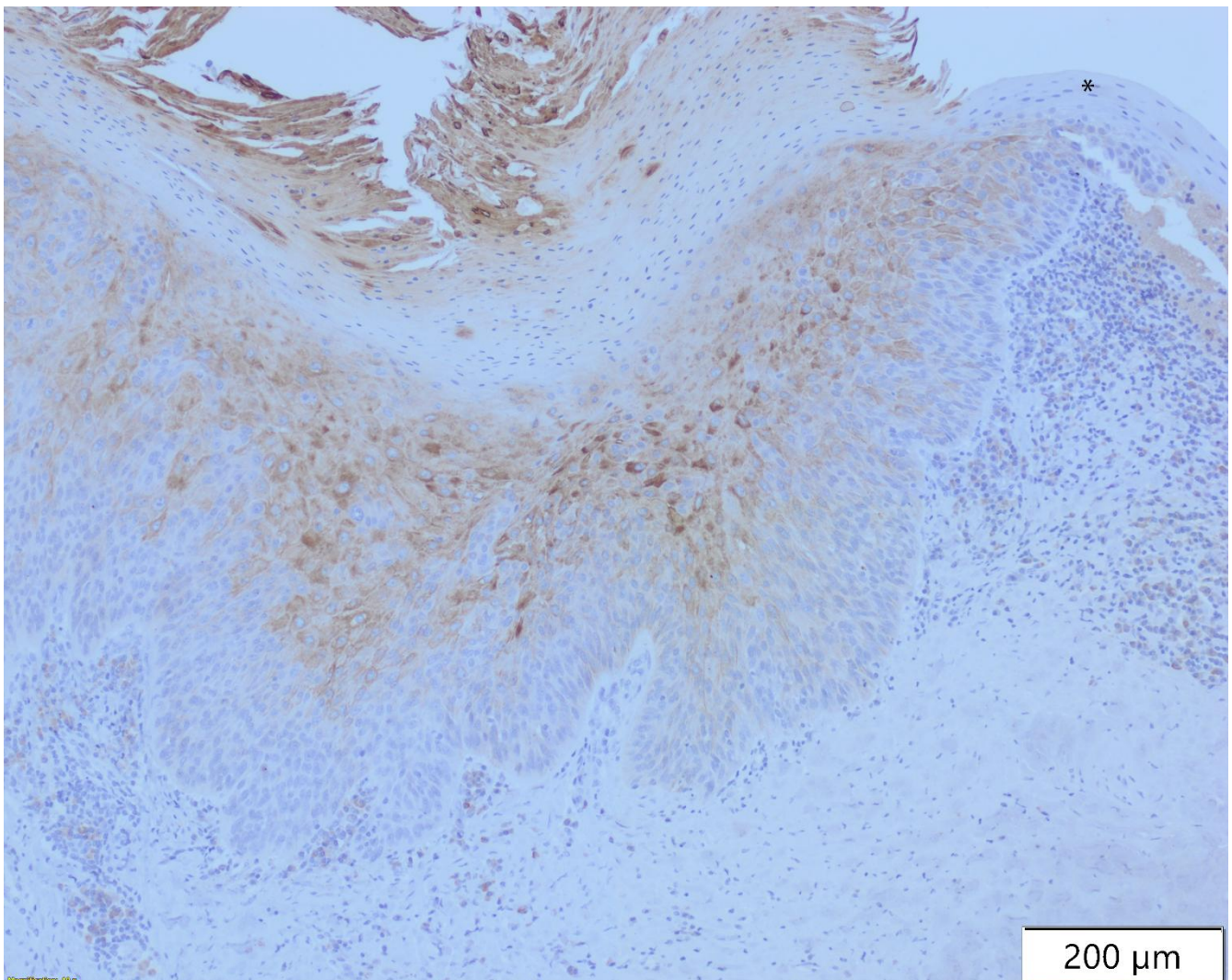
©agnihotri, 2013

Slika 37: Displazija larinksa visokog gradusa, (CK10x100). U leziji se ne ekspirira CK10 * CK10 se ne ekspirira ni u normalnom epitelu larinksa



©egiphtestone 94x

Slika 38: Displazija larinksa visokog gradusa, (CK13x100). U leziji se uočava difuzni gubitak ekspresije CK13 u spinoznom sloju; * ekspresija CK13 je homogena u normalnom epitelu larinksa



© Agnieszka 04.11

Slika 39: Displazija larinksa visokog gradusa, (CK17x100). U leziji se uočava difuzna ekspresija CK17 u višim slojevima epitela koji se nalaze u okolini parakeratotičnog epitela. * CK17 se ne eksprimira u normalnom epitelu larinksa

4.2.9. Imunohistohemijska ekspresija CK8, CK10, CK13 i CK17 u skvamocelularnom karcinomu larinksa

U Tabeli 20 su predstavljene vrednosti skorova ekspresije CK8, CK10, CK13 i CK17 u skvamocelularnom karcinomu larinksa.

U našim slučajevima skvamocelularnog karcinoma larinksa (Slika 40), ekspresija CK8 je uočena u 13 (15,7%) slučajeva. Fokalna ekspresija je uočena u 8 (9,6%) slučajeva, u 4 (4,8%) slučajeva ekspresija je mrljasta, dok je u jednom (1,3%) slučaju ekspresija CK8 difuzna. U 70 (84,3%) slučajeva nema ekspresije CK8 (Slika 41).

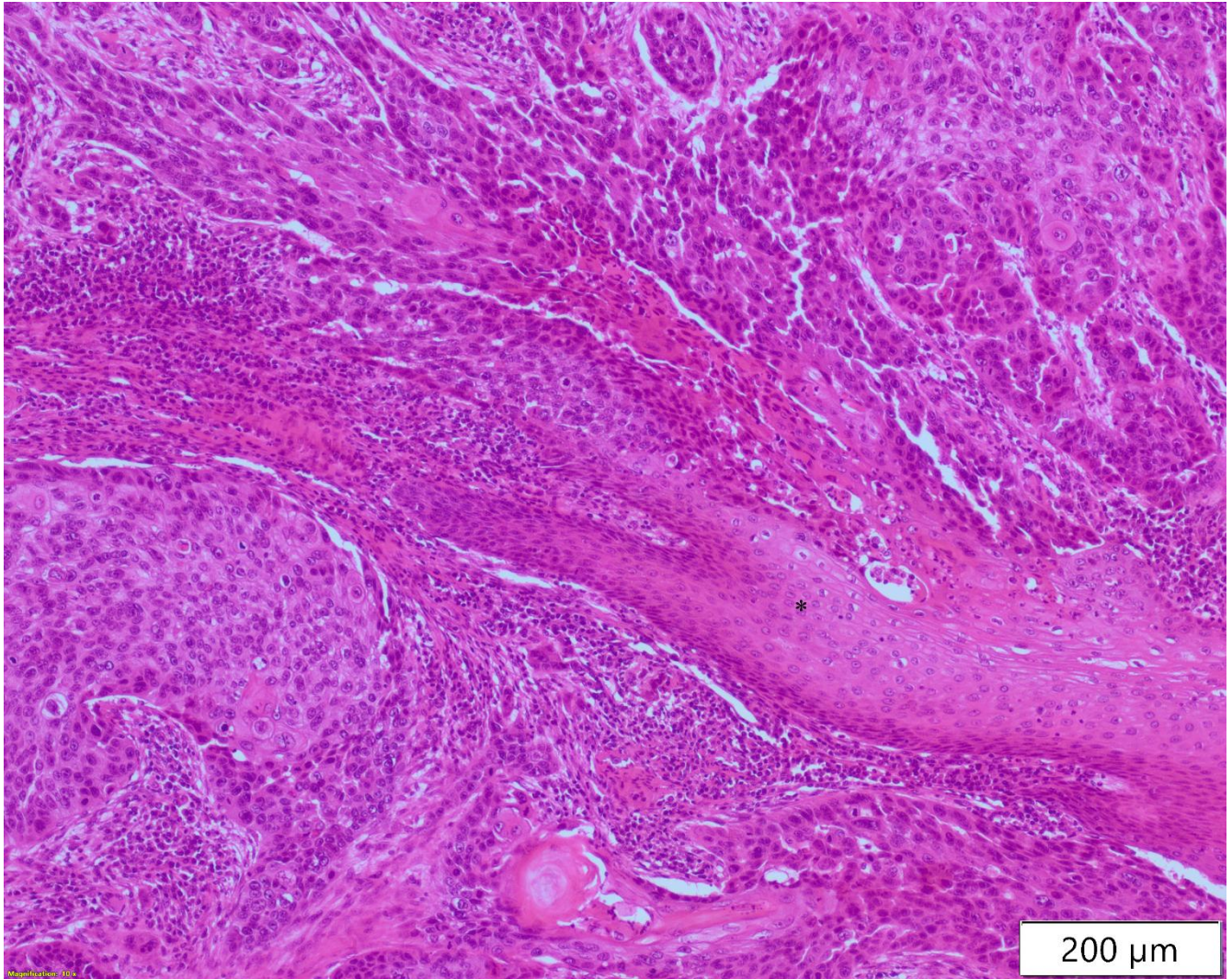
Ekspresija CK10 je uočena u 28 (33,7%) slučajeva. Fokalna ekspresija je uočena u 21 (35,3%) slučaju, a mrljasta ekspresija je uočena u 7 (8,4%) slučajeva. U 55 (66,3%) slučajeva nije uočena ekspresija CK10 (Slika 42).

Gubitak ekspresije CK13 je uočen u svim slučajevima skvamocelularnog karcinoma. Fokalni gubitak ekspresije je uočen u 5 (6%) slučajeva, mrljasti gubitak ekspresije je uočen u 21 (25,3%) slučaju, dok je difuzni gubitak ekspresije CK13 uočen u 57 (68,7%) slučajeva (Slika 43).

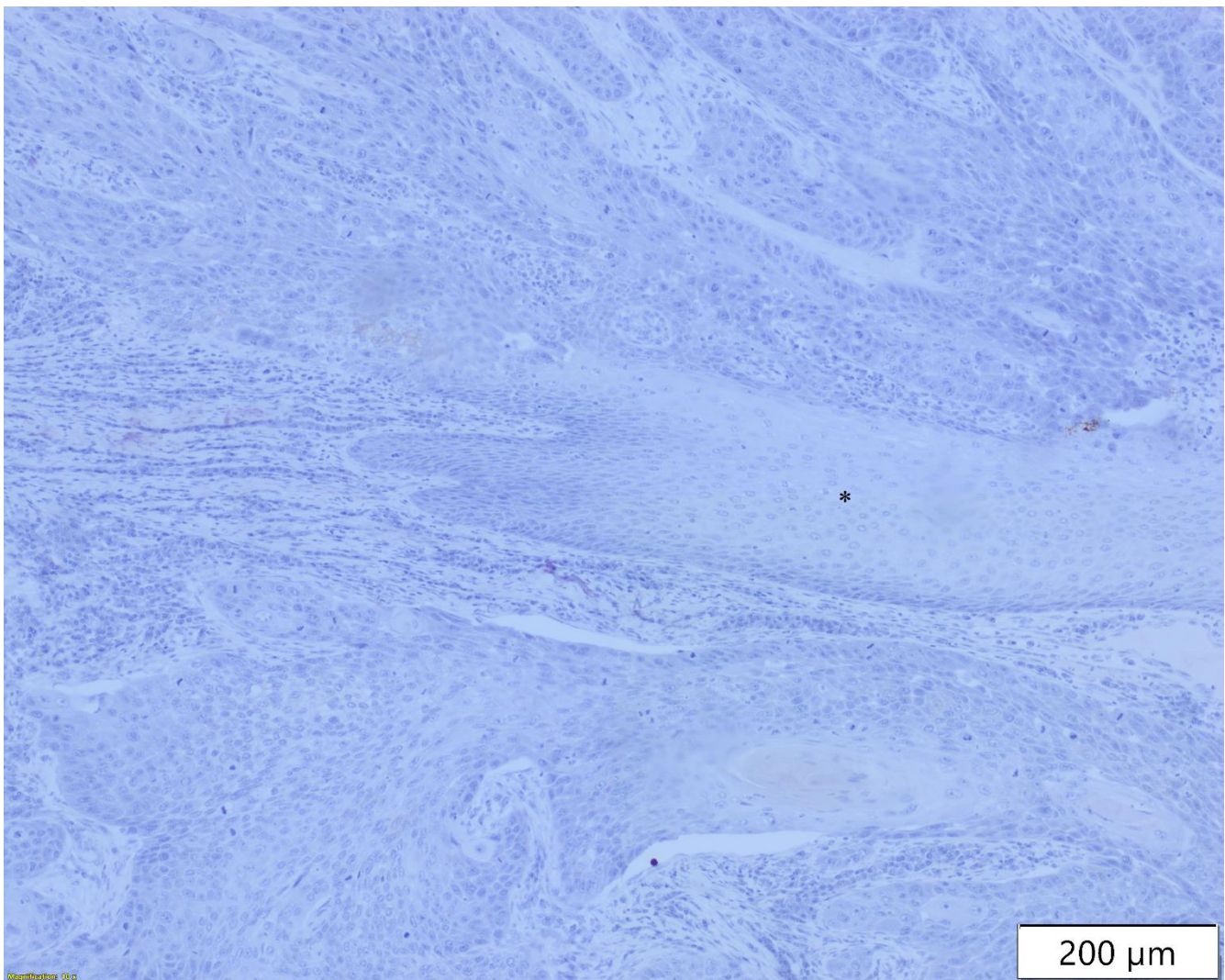
Ekspresija CK17 je uočena u 79 (95,2%) slučajeva. Fokalna ekspresija je uočena u 14 (16,9%) slučajeva. Mrljasta ekspresija je uočena u 36 (43,4%) slučajeva. Difuzna ekspresija CK17 je uočena u 29 (34,9%) slučajeva (Slika 44). U istoj leziji se uočava više različitih obrazaca ekspresije CK17. Intenzitet ekspresije varira od slabog do jakog u istoj leziji. U fokusima keratinizacije je intenzitet ekspresije CK17 snažniji. U istoj leziji se mogu pojaviti velike oblasti negativne na CK17 i oblasti u kojima postoji fokalna, mrljasta ili difuzna ekspresija CK17 (Slika 46).

Tabela 20: Imunohistohemijska ekspresija CK8, CK10, CD13 i CK17 u skvamocelularnom karcinomu larinksa

IHH skor	CK8		CK10		CK13		CK17	
	N	%	N	%	N	%	N	%
0	70	84.3	55	66.3	0	0	4	4.8
1	8	9.6	21	35.3	5	6	14	16.9
2	4	4.8	7	8.4	21	25.3	36	43.4
3	0	0	0	0	21	25.3	22	26.5
4	1	1.3	0	0	36	43.4	7	8.4

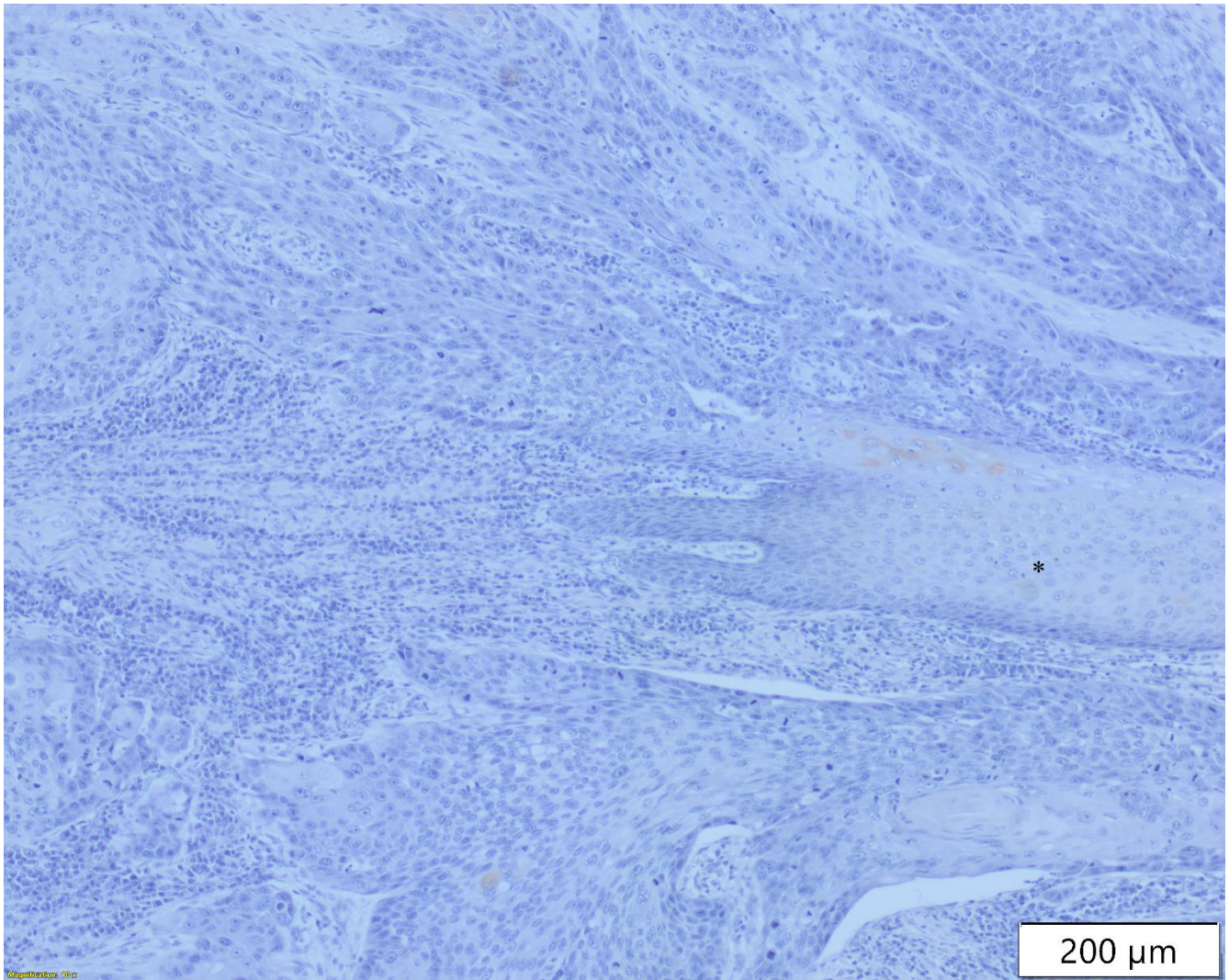


Slika 40: Skvamocelularni karcinom larinksa, (HEx100). *fragment normalnog epitela larinksa.

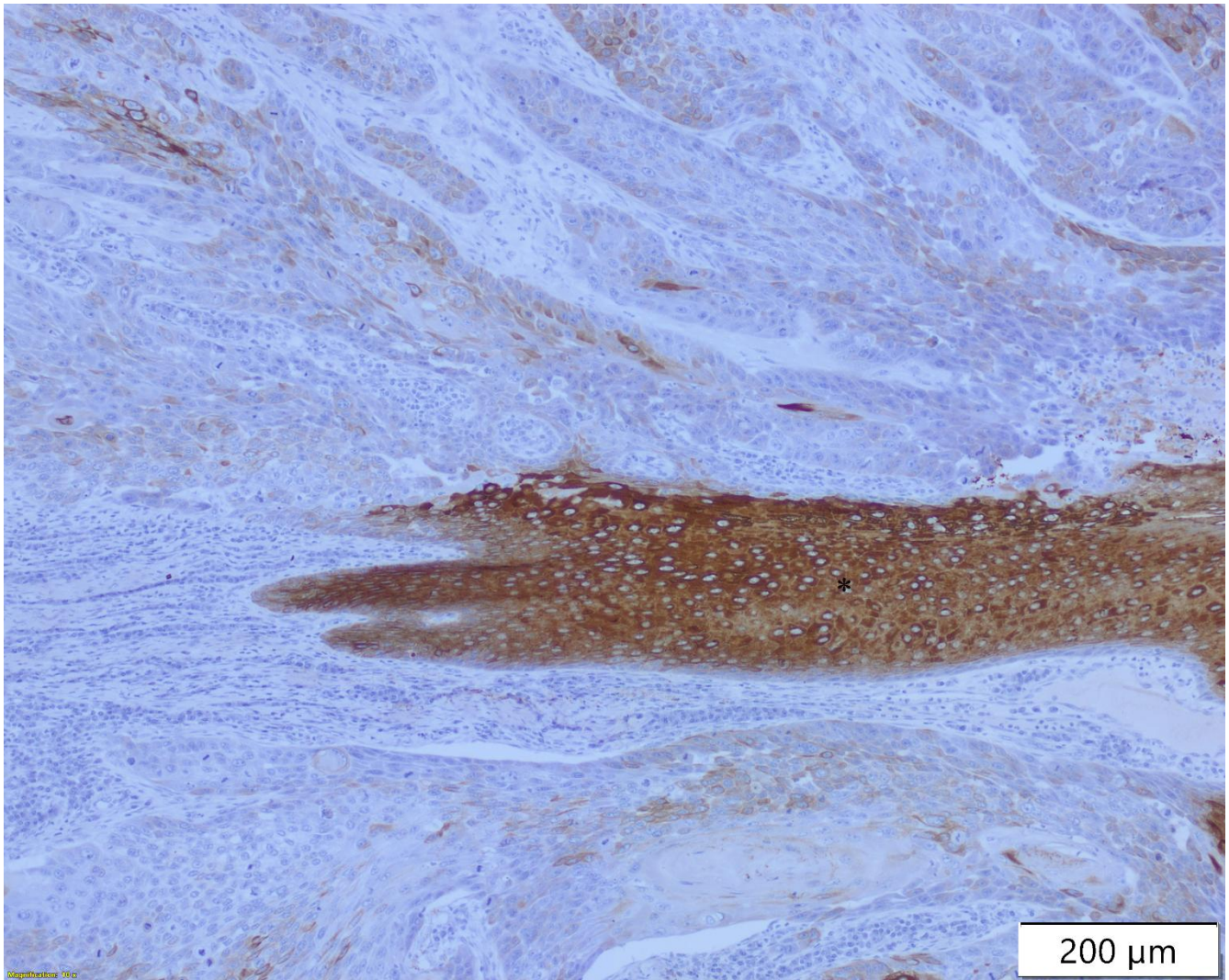


009110401000 001x

Slika 41: Skvamocelularni karcinom larinksa, (CK8x100). *Fragment normalnog epitela larinksa. Ne uočava se ekspresija CK8 ni u karcinomu ni u fragmentu normalnog epitela larinksa.

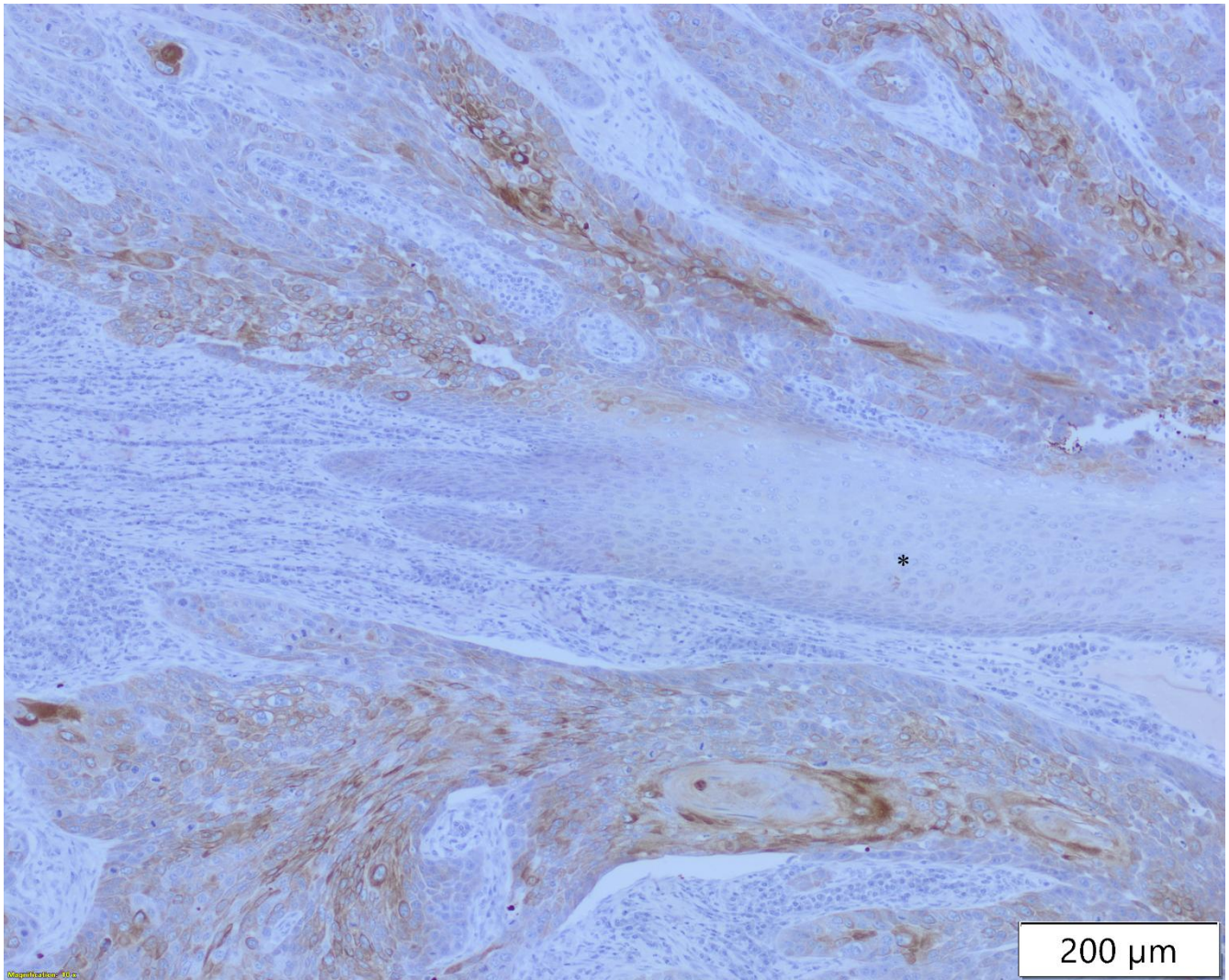


Slika 42: Skvamocelularni karcinoma larinksa, (CK10x100). * Fragment normalnog epitela larinksa. U skvamocelularnom karcinomu larinksa se ne uočava ekspresija CK10.

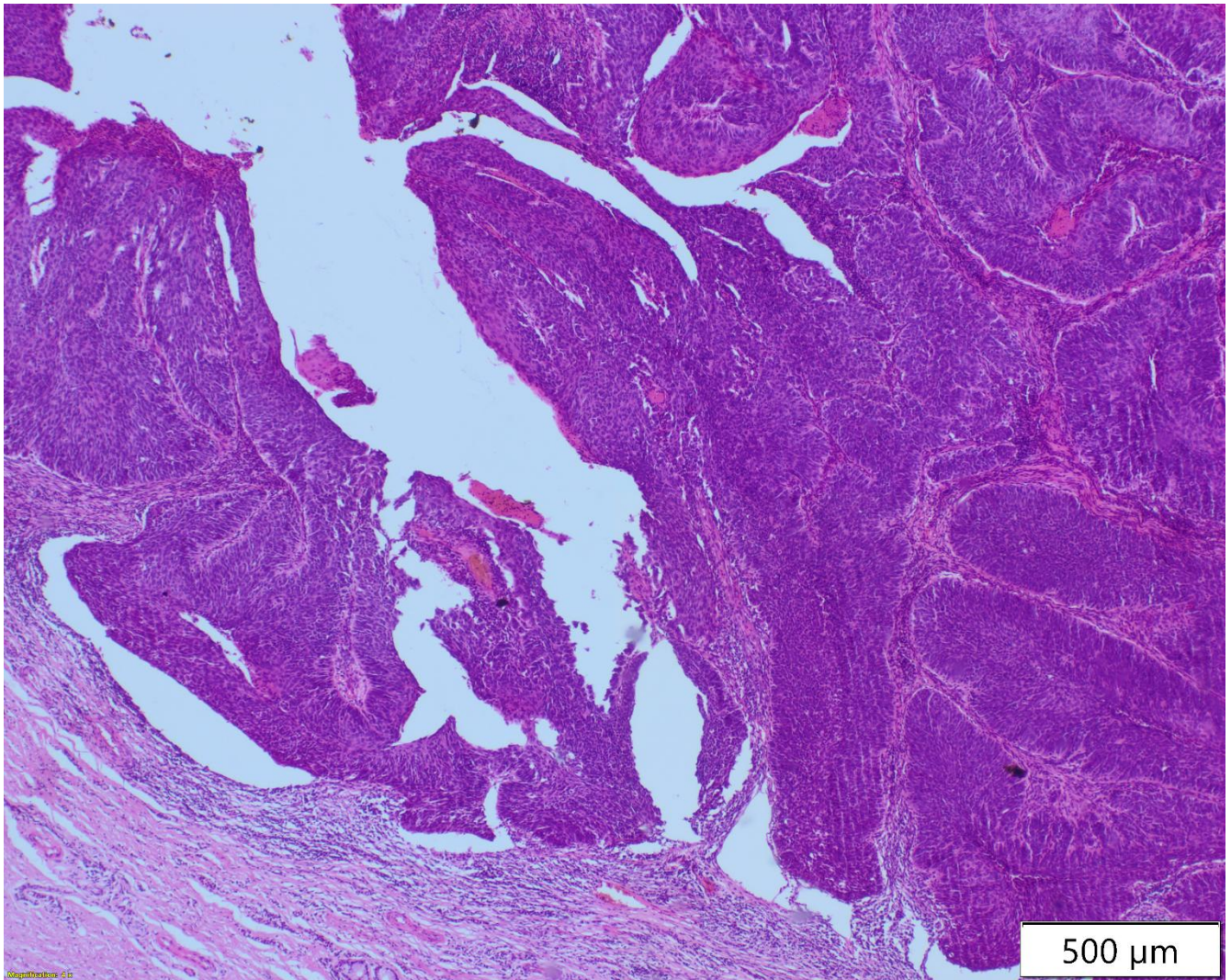


Magdalena 90x

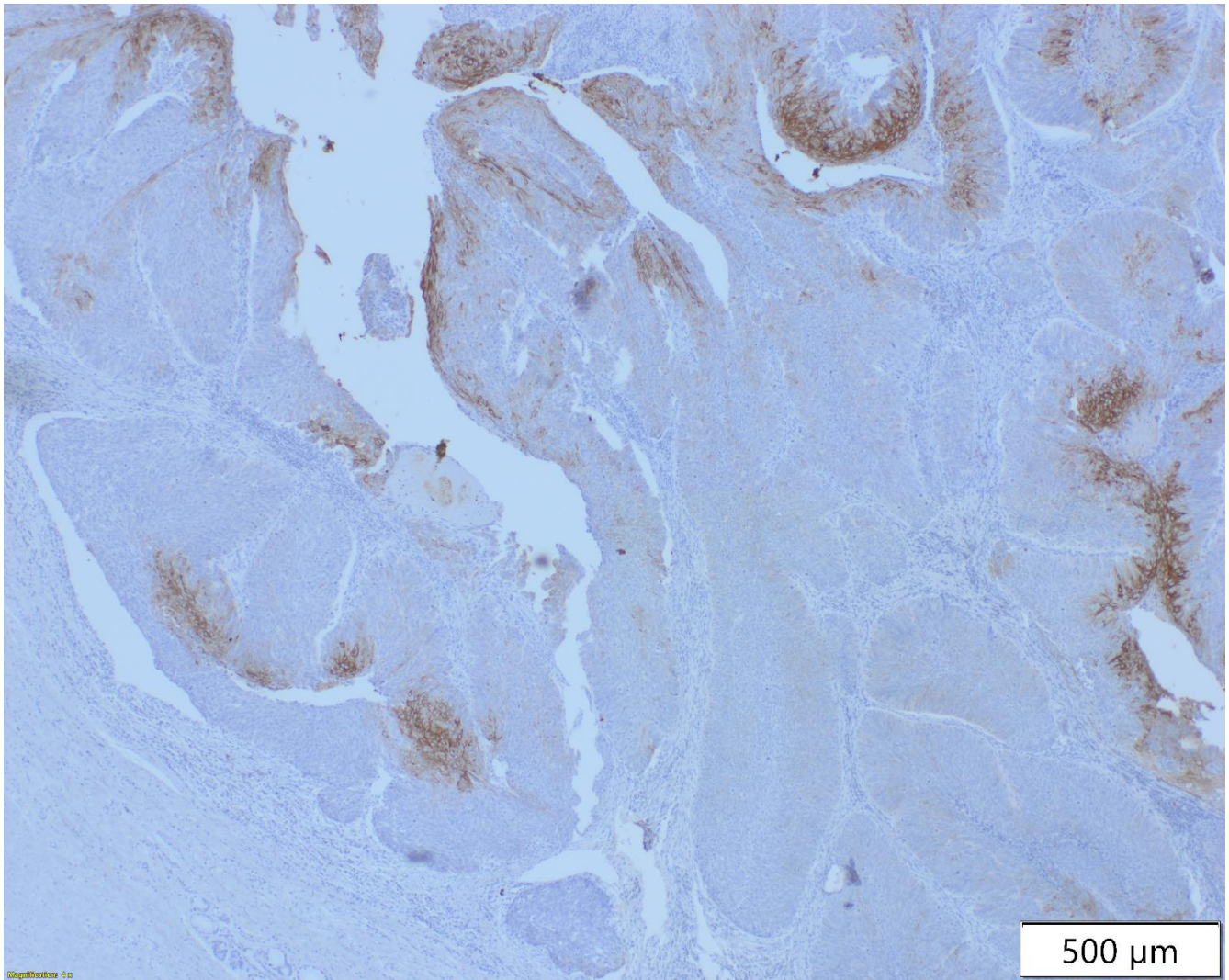
Slika 43: Skvamocelularni karcinom larinksa, (CK13x100). Uočava se difuzni gubitak ekspresije CK13 u skvamocelularnom karcinomu; *U fragmentu normalnog epitela larinksa se uočava homogena ekspresija CK13.



Slika 44: Skvamocelularni karcinom larinksa, (CK17x100). Uočava se difuzna ekspresija CK17 u skvamocelularnom karcinomu larinksa. *U fragmnetu normalnog epitela larinksa nema ekspresije CK17



Slika 45: Skvamocelularni karcinoma larinksa, (HEx40).

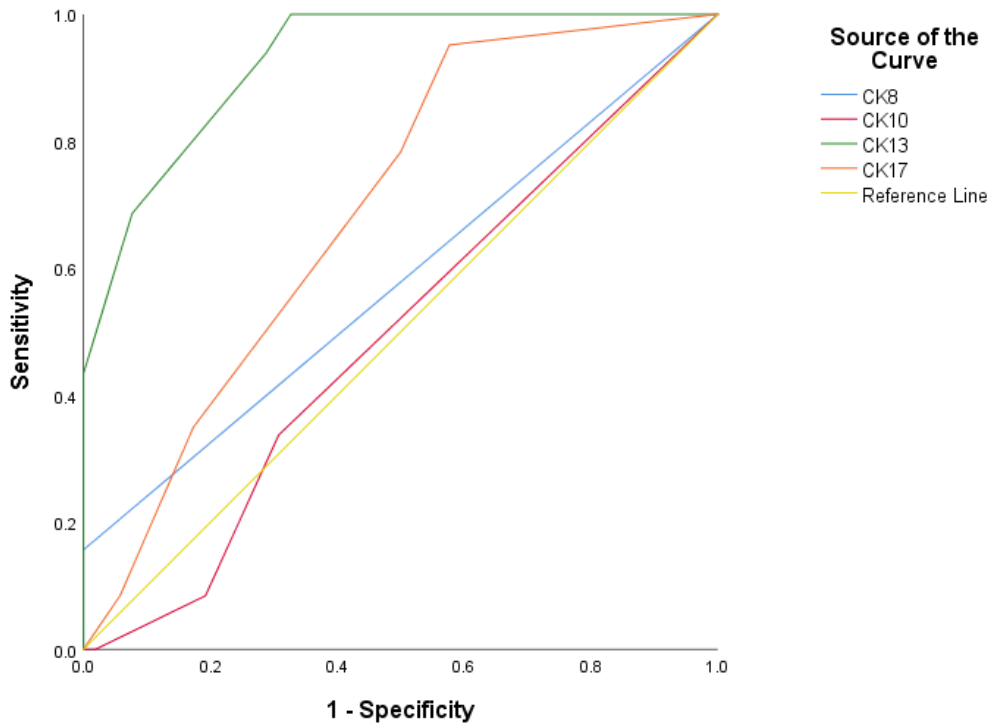


Copyright © 2010

Slika:46 Skvamocelularni karcinom larinksa, sa slike br. 45, (CK17x100); nehomogena ekspresija CK17. Uočavaju se fokusi ekspresije CK17, dok je veći deo tumora negativan na CK17.

4.3. DIJAGNOSTIČKA VREDNOST CK8, CK10, CK13 I CK17 U DIFERENCIJALNOJ DIJAGNOSTICI SKVAMOCELULARNOG KARCINOMA LARINKSA I BENIGNIH LEZIJA LARINKSA

ROC kriva je iskorišćena da bi se ispitala dijagnostička vrednost CK8, CK10, CK13 i CK17 u diferencijalnoj dijagnostici skvamocelularnog karcinoma larinksa u odnosu na benigne lezije larinksa (Slika 47).



Slika 47. ROC kriva za dijagnostičku vrednost CK8, CK10, CK13 i CK17 u diferencijalnoj dijagnozi skvamocelularnog karcinoma larinksa i benignih lezija larinksa
Izračunate su vrednosti površine ispod krive za svaki marker (Tabela 21)

Tabela 21: Vrednosti površine ispod krive za CK8, CK10, CK13 i CK17 u diferencijalnoj dijagnostici skvamocelularnog karcinoma larinksa i benignih lezija larinksa

Površina ispod krive

Citokeratini	Površina	Std. greška ^a	Asimptotski Sig. ^b	Asimptotički 95% interval poverenja	
				Donja granica	Gornja granica
CK8	.578	.049	.126	.482	.674
CK10	.495	.052	.915	.392	.597
CK13	.926	.022	.000	.882	.969
CK17	.692	.049	.000	.596	.788

U tabeli 22 su prikazane granične vrednosti za ekspresiju CK8, CK10, CK13 i CK17 u diferencijalnoj dijagnostici skvamocelularnog karcinoma larinksa i benignih lezija larinksa. Granična vrednost ≥ 1 je određena za CK13 kao dijagnostički značajna sa senzitivnošću 100%, specifičnošću 67,3% i površinom ispod krive 0,926. Za CK17 je kao dijagnostički značajna određena granična vrednost ≥ 1 sa senzitivnošću 95,2%, specifičnošću 43,3% i površinom ispod krive 0,692. Vrednosti površine ispod krive za CK10 (0,495) i CK8 (0,578) ukazuju da ovi markeri nisu dijagnostički značajni u diferencijalnoj dijagnostici skvamocelularnog karcinoma larinksa od benignih lezija larinksa.

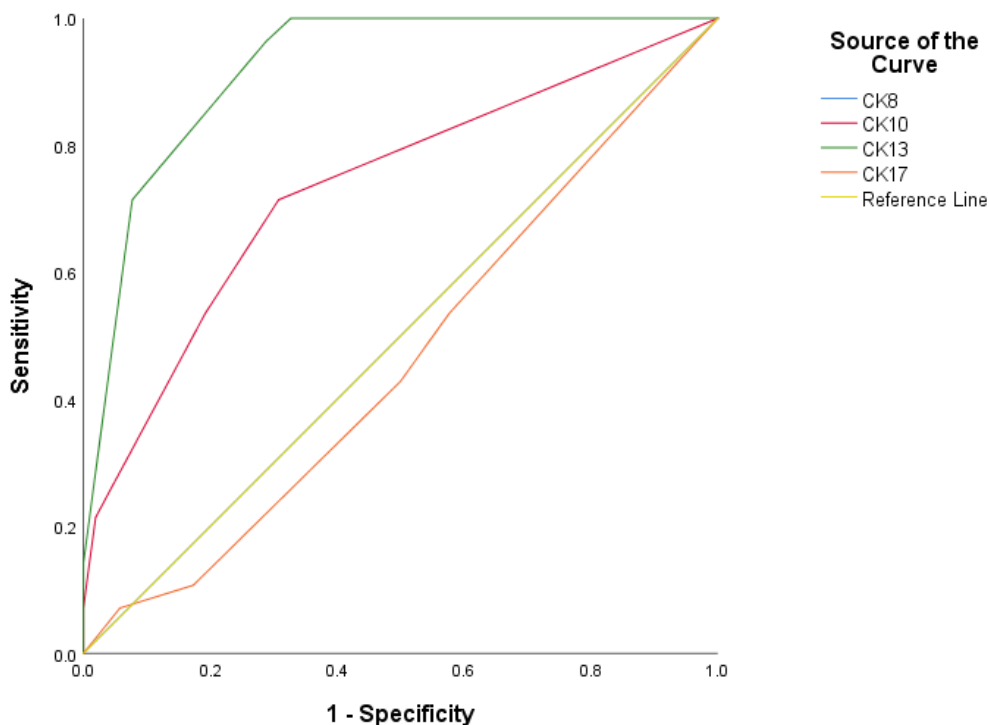
Tabela 22: Granične vrednosti za ekspresiju CK8, CK10, CK13 i CK17 u diferencijalnoj dijagnostici skvamocelularnog karcinoma larinksa i benignih lezija larinksa

<i>Koordinate krive</i>			
Citokeratini	Pozitivno ako je veće ili jednako od ^a	Senzitivnost	1 - specifičnost
CK8	-1.00	1.000	1.000
	.50	.157	.000
	1.50	.060	.000
	3.00	.012	.000
	5.00	.000	.000
CK10	-1.00	1.000	1.000
	.50	.337	.308
	1.50	.084	.192
	2.50	.000	.019
	4.00	.000	.000
CK13	-1.00	1.000	1.000
	.50	1.000	.327
	1.50	.940	.288
	2.50	.687	.077
	3.50	.434	.000
	5.00	.000	.000
CK17	-1.00	1.000	1.000
	.50	.952	.577
	1.50	.783	.500
	2.50	.349	.173
	3.50	.084	.058
	5.00	.000	.000

a. Najmanja granična vrednosti je razlika minimalne posmatrane vrednosti testa -1, a najveća granična vrednost je zbir najveće posmatrane vrednosti testa i 1. Ostale granične vrednosti su aritmetičke sredine dve susedne posmatrane vrednosti testa.

4.4. DIJAGNOSTIČKA VREDNOST CK8, CK10, CD13 I CK17 U DIFERENCIJALNOJ DIJAGNOSTICI DISPLAZIJA LARINKSA I BENIGNIH LEZIJA LARINKSA

ROC kriva je iskorišćena da bi se ispitala dijagnostička vrednost CK8, CK10, CK13 i CK17 u diferencijalnoj dijagnostici displazija larinksa u odnosu na benigne lezije larinksa (Slika 48).



Slika 48. ROC kriva za dijagnostičku vrednost CK8, CK10, Ck13 i CK17 u diferencijanoj dijagnozi displazija larinksa i benignih lezija larinksa.

Izračunate su vrednosti površine ispod krive za svaki marker (Tabela 23)

Tabela 23: Vrednosti površine ispod krive za CK8, CK10, CK13 i CK17 u diferencijalnoj dijagnostici displazija larinksa i benignih lezija larinksa

Citokeratini	Površina	Std. greška	Asimptotski Sig.b	Asimptotički 95% interval poverenja	
				Donja granica	Gornja granica
CK8	.500	.068	1.000	.367	.633
CK10	.733	.061	.001	.613	.853
CK13	.921	.029	.000	.865	.978
CK17	.462	.067	.576	.330	.594

U tabeli 24 su prikazane granične vrednosti za ekspresiju CK8, CK10, CK13 i CK17 u diferencijalnoj dijagnostici displazija larinksa i benignih lezija larinksa. Granična vrednost ≥ 1 je određena za CK13 kao dijagnostički značajna sa senzitivnošću 100%, specifičnošću 67,3% i površinom ispod krive 0,921. Za CK10 je kao dijagnostički značajna određena granična vrednost ≥ 1 sa senzitivnošću 71,4%, specifičnošću 69,2% i površinom ispod krive 0,733. Vrednosti površine ispod krive za CK8 (0,500) i CK17 (0,462) ukazuju da ovi markeri nisu dijagnostički značajni u diferencijalnoj dijagnostici displazija larinksa od benignih lezija larinksa.

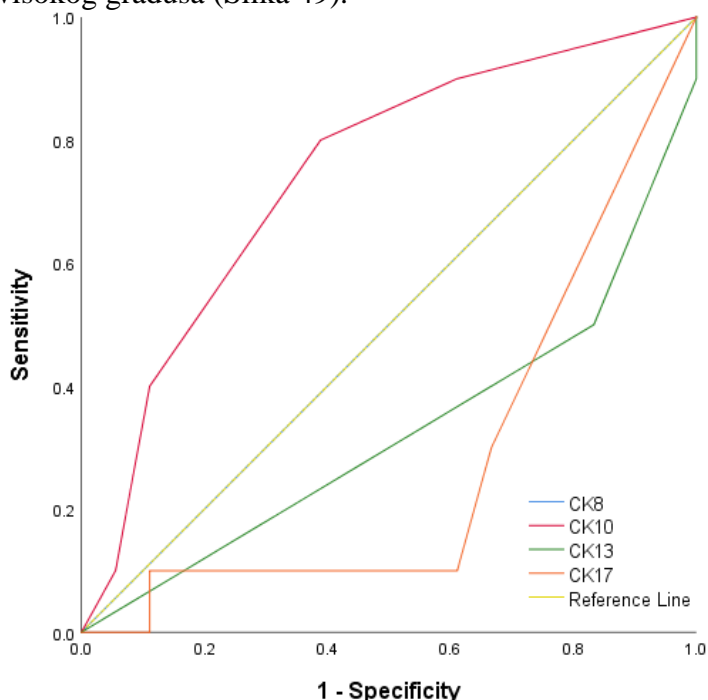
Tabela 24: Granične vrednosti za ekspresiju CK8, CK10, CK13 i CK17 u diferencijalnoj dijagnostici displazija larinksa i benignih lezija larinksa

<i>Koordinate krive</i>			
Citokeratini	Pozitivno ako je veće ili jednako od	Senzitivnost	1 - specifičnost
CK8	-1.00	1.000	1.000
	1.00	.000	.000
CK10	-1.00	1.000	1.000
	.50	.714	.308
	1.50	.536	.192
	2.50	.214	.019
	3.50	.071	.000
	5.00	.000	.000
CK13	-1.00	1.000	1.000
	.50	1.000	.327
	1.50	.964	.288
	2.50	.714	.077
	3.50	.143	.000
	5.00	.000	.000
CK17	-1.00	1.000	1.000
	.50	.536	.577
	1.50	.429	.500
	2.50	.107	.173
	3.50	.071	.058
	5.00	.000	.000

a. Najmanja granična vrednosti je razlika minimalne posmatrane vrednosti testa -1, a najveća granična vrednost je zbir najveće posmatrane vrednosti testa i 1. Ostale granične vrednosti su aritmetičke sredine dve susedne posmatrane vrednosti testa.

4.5. DIJAGNOSTIČKA VREDNOST CK8, CK10, CD13 I CK17 U DIFERENCIJALNOJ DIJAGNOSTICI DISPLAZIJA LARINKSA NISKOG GRADUSA I DISPLAZIJA LARINKSA VISOKOG GRADUSA

ROC kriva je iskorišćena da bi se ispitala dijagnostička vrednost CK8, CK10, CK13 i CK17 u diferencijalnoj dijagnostici displazija larinksa niskog gradusa u odnosu na displazije larinksa visokog gradusa (Slika 49).



Slika 49. ROC kriva za dijagnostičku vrednost CK8, CK10, Ck13 i CK17 u diferencijanoj dijagnozi displazija larinksa niskog gradusa i displazija larinksa visokog gradusa.

Izračunate su vrednosti površine ispod krive za svaki marker (Tabela 25).

Tabela 25: Vrednosti površine ispod krive za CK8, CK10, CK13 i CK17 u diferencijalnoj dijagnostici displazija larinksa niskog i visokog gradusa

Površina ispod krive

Citokeratini	Area	Površina	Std. greška	Asimptotički 95% interval poverenja	
				Donja granica	Gornja granica
CK8	.500	.116	1.000	.273	.727
CK10	.742	.099	.037	.548	.935
CK13	.325	.113	.131	.103	.547
CK17	.278	.102	.055	.078	.478

U tabeli 26 su prikazane granične vrednosti za ekspresiju CK8, CK10, CK13 i CK17 u diferencijalnoj dijagnostici displazija larinksa niskog i visokog gradusa. Granična vrednost ≥ 2 je određena za CK10 kao dijagnostički značajna sa senzitivnošću 80%, specifičnošću 61,1% i površinom ispod krive 0,742. Vrednosti površine ispod krive za CK8 (0,500), CK13 (0,325) i CK17 (0,278) ukazuju da ovi markeri nisu dijagnostički značajni u diferencijalnoj dijagnostici displazija niskog gradusa u odnosu na displazije larinksa visokog gradusa.

Tabela 26: Granične vrednosti za ekspresiju CK8, CK10, CK13 i CK17 u diferencijalnoj dijagnostici displazija larinksa niskog i visokog gradusa

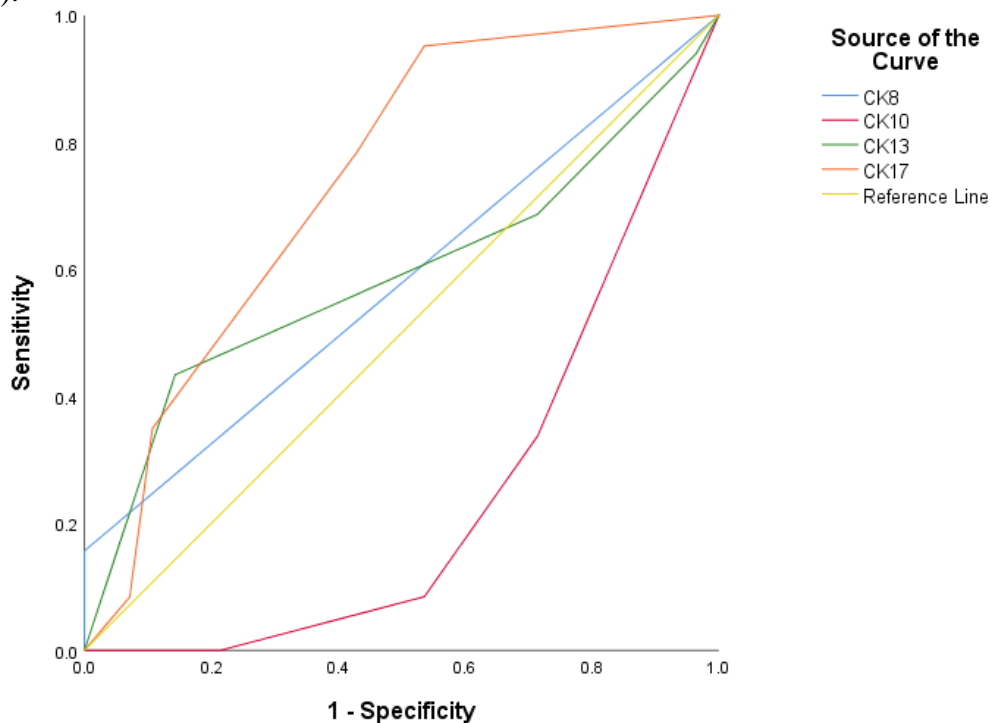
Koordinate krive

Citokeratini	Pozitivno ako je veće ili		
	jednako od	Senzitivnost	1 - specifičnost
CK8	-1.00	1.000	1.000
	1.00	.000	.000
CK10	-1.00	1.000	1.000
	.50	.900	.611
	1.50	.800	.389
	2.50	.400	.111
	3.50	.100	.056
	5.00	.000	.000
CK13	.00	1.000	1.000
	1.50	.900	1.000
	2.50	.500	.833
	3.50	.100	.167
	5.00	.000	.000
CK17	-1.00	1.000	1.000
	.50	.300	.667
	1.50	.100	.611
	2.50	.100	.111
	3.50	.000	.111
	5.00	.000	.000

a. Najmanja granična vrednosti je rezlika minimalne posmatrane vrednosti testa -1, a najveća granična vrednost je zbir najveće posmatrane vrednosti testa i 1. Ostale granične vrednosti su aritmetičke sredine dve susedne posmatrane vrednosti testa.

4.6. DIJAGNOSTIČKA VREDNOST CK8, CK10, CD13 I CK17 U DIFERENCIJALNOJ DIJAGNOSTICI DISPLAZIJA LARINKSA I SKVAMOCELULARNOG KARCINOMA LARINKSA

ROC kriva je iskorišćena da bi se ispitala dijagnostička vrednost CK8, CK10, CK13 i CK17 u diferencijalnoj dijagnostici skvamocelularnog karcinoma larinksa u odnosu na benigne lezije larinksa (Slika 50).



Slika 50. ROC kriva za dijagnostičku vrednost CK8, CK10, CK13 i CK17 u diferencijalnoj dijagnozi displazija larinksa i skvamocelularnog karcinoma larinksa.

Izračunate su vrednosti površine ispod krive za svaki marker (Tabela 27)

Tabela 27: Vrednosti površine ispod krive za CK8, CK10, CK13 i CK17 u diferencijalnoj dijagnostici displazija larinksa i skvamocelularnog karcinoma larinksa

Citokeratini	Površina	Std. greška	Asimptotski Sig.b	Asimptotički 95% interval poverenja	
				Donja granica	Gornja granica
CK8	.578	.058	.217	.464	.693
CK10	.242	.060	.000	.125	.359
CK13	.589	.056	.160	.479	.699
CK17	.739	.060	.000	.621	.857

U tabeli 28 su prikazane granične vrednosti za ekspresiju CK8, CK10, CK13 i CK17 u diferencijalnoj dijagnostici displazija larinksa i skvamocelularnog karcinoma larinksa. Granična vrednost ≥ 1 je određena za CK17 kao dijagnostički značajna sa senzitivnošću 95,2%, specifičnošću 46,4% i površinom ispod krive 0.739. Vrednosti površine ispod krive za CK8 (0,578), CK13 (0,589) i CK10 (0,242) ukazuju da ovi markeri nisu dijagnostički značajni u diferencijalnoj dijagnostici displazija larinksa i skvamocelularnog karcinoma larinksa.

Tabela 28: Granične vrednosti za ekspresiju CK8, CK10, CK13 i CK17 u diferencijalnoj dijagnostici displazija larinksa i skvamocelularnog karcinoma larinksa

<i>Koordinate krive</i>			
Citokeratini	Pozitivno ako je veće ili jednako od	Senzitivnost	1 - Specifičnost
CK8	-1.00	1.000	1.000
	.50	.157	.000
	1.50	.060	.000
	3.00	.012	.000
	5.00	.000	.000
CK10	-1.00	1.000	1.000
	.50	.337	.714
	1.50	.084	.536
	2.50	.000	.214
	3.50	.000	.071
CK13	.00	1.000	1.000
	1.50	.940	.964
	2.50	.687	.714
	3.50	.434	.143
	5.00	.000	.000
CK17	-1.00	1.000	1.000
	.50	.952	.536
	1.50	.783	.429
	2.50	.349	.107
	3.50	.084	.071
	5.00	.000	.000

a. Najmanja granična vrednosti je razlika minimalne posmatrane vrednosti testa -1, a najveća granična vrednost je zbir najveće posmatrane vrednosti testa i 1. Ostale granične vrednosti su aritmetičke sredine dve susedne posmatrane vrednosti testa.

4.7. POVEZANOST EKSPRESIJE CITOKERATINA CK8, CK10, CK13 I CK17 U SKVAMOCELULARNOM KARCINOMU LARINKSA SA GRADUSOM TUMORA

U našem istraživanju, od 83 slučaja sa dijagnostikovanim skvamocelularnim karcinomom larinksa, 20 slučajeva je sa dijagnostikovanim dobro diferentovanim karcinomom – gradus 1(G1), 54 sa srednje diferentovanim karcinomom – gradus 2 (G2), i 9 slučajeva je sa slabo diferentovanim karcinomom – gradus 3 (G3) (Tabela 29).

Tabela 29: Distribucija skvamocelularnih karcinoma po gradusu

Gradus tumora	G1	G2	G3
N	20	54	9

U tabeli 30 je predstavljena distribucija skorova imunohistohemijskog bojenja na CK8 po gradusima skvamocelularnog karcinoma larinksa. Od 20 slučajeva gradusa 1, u 18 nije zabeležena ekspresija CK8, dok je u dva slučaja ekspresija CK8 skorovana sa 1. Od 54 slučaja skvamocelularnog karcinoma gradusa G2, u 45 slučajeva nije uočena ekspresija CK8, dok je u 5 slučajeva ekspresija CK8 skorovana sa 1, u 3 slučaja skorovana sa 2 i u jednom slučaju skorovana sa 4. U skvamocelularnim karcinomima stadijuma G3, u 6 slučajeva nije uočena ekspresija CK8, jedan slučaj je skorovan sa 1 i dva slučaja su skorovana sa 2.

Tabela 30: Distribucija skorova imunohistohemijskog bojenja na CK8 po gradusima skvamocelularnog karcinoma larinksa

Gradus tumora	CK8 skor				
	0	1	2	3	4
1	18	2	0	0	0
2	45	5	3	0	1
3	6	1	2	0	0

U tabeli 31 je predstavljena distirbucija skorova imunohistohemijskog bojenja na CK10 po gradusima skvamocelularnog karcinoma larinksa. U skvamocelularnim karcinomima gradusa G1, u 11 slučajeva nije uočena ekspresija CK10, u 6 slučajeva ekspresija CK10 je skorovana sa 1, a u tri slučaja je skorovana sa 2. U skvamocelularnim karcinomima gradusa G2, u 36 slučajeva nije uočena ekspresija CK10, u 14 slučajeva je ekspresija CK10 skorovana sa 1 i u četiri slučaja je skorovana sa 2. U skvamocelularnim karcinomima gradus G3, u 8 slučajeva nije uočena ekspresija CK10, dok je u jednom slučaju ekspresija CK10 skorovana sa 1.

Tabela 31: Distirbucija skorova imunohistohemijskog bojenja na CK10 po gradusima skvamocelularnog karcinoma larinksa

Gradus tumora	CK10 skor				
	0	1	2	3	4
1	11	6	3	0	0
2	36	14	4	0	0
3	8	1	0	0	0

U tabeli 32 je predstavljena distribucija skorova imunohistohemijskog bojenja na CK13 po gradusima skvamocelularnog karcinoma larinksa. U skvamocelularnim karcinomima gradusa G1, u jednom slučaju je ekspresija CK13 skorovana sa 1, u šest slučajeva je skorovana sa 2, u pet slučajeva je

skorovana sa 3 i u osam slučajeva je skorovana sa 4. U skvamocelularnim karcinomima gradusa G2, u četiri slučaja je ekspresija CK13 skorovana sa 1, u četrnaest slučajeva je skorovana sa 2, u petnaest slučajeva je skorovana sa 3 i u dvadeset jednom slučaju je skorovana sa 4. U skvamocelularnim karcinomima gradusa G3, u jednom slučaju je ekspresija CK13 skorovana sa 2, u jednom slučaju je sa 3, i u sedam slučajeva je skorovana sa 4.

Tabela 32: Distribucija skorova imunohistohemijskog bojenja na CK13 po gradusima skvamocelularnog karcinoma larinksa

Gradus tumora	CK13 skor				
	0	1	2	3	4
1	0	1	6	5	8
2	0	4	14	15	21
3	0	0	1	1	7

U tabeli 33 je predstavljena distribucija skorova imunohistohemijskog bojenja na CK17 po gradusima skvamocelularnog karcinoma larinksa. U skvamocelularnim karcinomima gradusa G1, u jednom slučaju nije uočena ekspresija CK17, u tri slučaja je ekspresija CK17 skorovana sa 1, u sedam slučajeva sa 2, u četiri slučaja sa 3 i u pet slučajeva sa 4. U skvamocelularnim karcinomima gradusa G2, u dva slučaja nije uočena ekspresija CK17, u osam slučajeva je ekspresija CK17 skorovana sa 1, u dvadeset pet slučajeva sa 2, u sedamnaest slučajeva sa 3 i u dva slučaja sa 4. U skvamocelularnim karcinomima gradusa G3, u jednom slučaju nije uočena ekspresija CK17, u tri slučaja je ekspresija CK17 skorovana sa 1, u četiri slučaja sa 2 i u jednom slučaju sa 3.

Tabela 33: Distirbucija skorova imunohistohemijskog bojenja na CK17 po gradusima skvamocelularnog karcinoma larinksa.

Gradus tumora	CK17 skor				
	0	1	2	3	4
1	1	3	7	4	5
2	2	8	25	17	2
3	1	3	4	1	0

Izračunati su Spirmanovi rho koeficijenti i predstavljeni su u tabeli 34.

Tabela 34: Korelacija ekspresije CK8, CK10, CK13 i CK17 sa gradusom skvamocelularnog karcinoma larinksa

Spearman's rho

		CK8	CK10	CK13	CK17
Gradus	Correlation Coefficient	.108	-.198	.143	-.219
	Sig. (2-tailed)	.333	.072	.198	.047

Na osnovu rezultata dobijenih statističkom obradom, zaključeno je da postoji značajna negativna korelacija između ekspresija CK17 i gradusa skvamocelularnog karcinoma larinksa.

4.8. POVEZANOST EKSPRESIJE CITOKERATINA CK8, CK10, CK13 I CK17 U SKVAMOCELULARNOM KARCINOMU LARINKSA SA STADIJUMOM TUMORA

U prikupljenom materijalu ima 83 slučaja sa dijagnostikovanim skvamocelularnim karcinomom larinksa. U stadijumu pT1 je 39 slučajeva, u stadijumu pT2 je 7 slučajeva, u stadijumu pT3 je 23 slučaja i u stadijumu pT4 je 14 slučajeva (Tabela 35).

Tabela 35: Distribucija skvamocelularnog karcinoma larinksa po stadijumima tumora

P Stadijum	pT1	pT2	pT3	pT4
N	39	7	23	14

U tabeli 36 je predstavljena distribucija skorova imunohistohemijskog bojenja na CK8 po stadijumima skvamocelularnog karcinoma larinksa. U stadijumu pT1, u 36 slučajeva nema ekspresije CK8, 2 slučaja imaju imunohistohemijski skor 1 i jedan slučaj ima imunohistohemijski skor 3. U stadijumu pT2, u 5 slučajeva nema ekspresije CK8, dok je jedan slučaj skorovan sa 1 i jedan slučaj skorovan sa 4. U stadijumu pT3, u 16 slučajeva nije uočena ekspresija CK8, 4 slučaja su skorovana sa 1 i tri slučaja su skorovana sa 2. U našim slučajevima stadijuma pT4, u 13 slučajeva nema ekspresije CK8 i jedan slučaj je skorovan sa 1.

Tabela 36: Distribucija skorova imunohistohemijskog bojenja na CK8 po stadijumima skvamocelularnog karcinoma larinksa.

Stadijum	CK8 skor				
	0	1	2	3	4
1	36	2	1	0	0
2	5	1	0	0	1
3	16	4	3	0	0
4	13	1	0	0	0

U tabeli 37 je predstavljena distribucija skorova imunohistohemijskog bojenja na CK10 po stadijumima skvamocelularnog karcinoma larinksa. U stadijumu pT1, u 21 slučaju nema ekspresije CK10, 12 slučajeva ima imunohistohemijski skor 1 i 6 slučajeva ima imunohistohemijski skor 2. U stadijumu pT2, u 6 slučajeva nema ekspresije CK10, dok je jedan slučaj skorovan sa 1. U stadijumu pT3, u 18 slučajeva nije uočena ekspresija CK10 a 5 slučajeva je skorovano sa 1. U stadijumu pT4, u 10 slučajeva nema ekspresije CK10, tri slučaja su skorovani sa 1 i jedan slučaj je skorovan sa 2.

Tabela 37: Distribucija skorova imunohistohemijskog bojenja na CK10 po stadijumima skvamocelularnog karcinoma larinksa

Stadijum	CK10 skor				
	0	1	2	3	4
1	21	12	6	0	0
2	6	1	0	0	0
3	18	5	0	0	0
4	10	3	1	0	0

U tabeli 38 je predstavljena distribucija skorova imunohistohemijskog bojenja na CK13 po stadijumima skvamocelularnog karcinoma larinksa. U stadijumu pT1, 2 slučaja su skorovana sa 1, 10 slučajeva je skorovano sa 2, 13 slučajeva sa 3 i 14 slučajeva sa 4. U stadijumu pT2, jedan slučaj je skorovan sa 1, 4 slučaja sa 2 i 2 slučaja sa 3. U stadijumu pT3, jedan slučaj je skorovan sa 1, 6 slučajeva je skorovano sa 2, tri slučaja su skorovana sa 3 i 13 slučajeva je skorovano sa 4. U stadijumu pT4, jedan slučaj je skorovan sa 1, jedan slučaj je skorovan sa 2, 3 slučaja su skorovana sa 4 i 9 slučajeva je skorovano sa 4.

Tabela 38: Distirbucija skorova imunohistohemijskog bojenja na CK13 po stadijumima skvamocelularnog karcinoma larinksa

Stadijum	CK13 skor				
	0	1	2	3	4
1	0	2	10	13	14
2	0	1	4	2	0
3	0	1	6	3	13
4	0	1	1	3	9

U tabeli 39 je predstavljena distribucija skorova imunohistohemijskog bojenja na CK17 po stadijumima skvamocelularnog karcinoma larinksa. U stadijumu pT1, u tri slučaja nema ekspresije CK17, 3 slučaja su skorovana sa 1, 14 slučajeva sa 2, 13 slučajeva sa 3 i 6 slučajeva sa 4. U stadijumu pT2, jedan slučaj je skorovan sa 1, 5 slučajeva sa 2 i jedan slučaj sa 4. U stadijumu pT3, u jednom slučaju nema ekspresije CK17, 6 slučajeva je skorovano sa 6, 13 slučajeva sa 2 i tri slučaja sa 3. U stadijumu pT4, 4 slučaja su skorovana sa 1, 4 slučaja su skorovana sa 2 i 6 slučajeva su skorovana sa 4.

Tabela 39: Distribucija skorova imunohistohemijskog bojenja na CK17 po stadijumima skvamocelularnog karcinoma larinksa.

Stadijum	CK17 skor				
	0	1	2	3	4
1	3	3	14	13	6
2	0	1	5	0	1
3	1	6	13	3	0
4	0	4	4	6	0

Izračunati su Spirmanovi rho koeficijenti i predstavljeni su u tabeli 40.

Tabela 40: Korelacija ekspresije CK8, CK10, CK13 i CK17 sa stadijumom skvamocelularnog karcinoma larinksa

Spearman's rho		CK8	CK10	CK13	CK17
Stadijum	Koeficijent korelacije	.132	-.182	.187	-.197
	Sig. (2-tailed)	.234	.099	.090	.075

Na osnovu rezultata dobijenih statističkom obradom, zaključeno je da nema značajne povezanosti ekspresije CK8, CK10, CK13 i CK17 u skvamocelularnom karcinomu larinksa sa stadijumom skvamocelularnog karcinoma larinksa.

4.9. POVEZANOST EKSPRESIJE CITOKERATINA CK8, CK10, CK13 I CK17 U SKVAMOCELULARNOM KARCINOMU LARINKSA SA PRISUSTVOM METASTAZA U LIMFNIM ČVOROVIMA

U korišćenom uzorku ukupno je 83 slučajeva skvamocelularnog karcinoma larinksa. Sa metastazama u limfne čvorove je 26 slučajeva, dok je bez metastaza 57 slučajeva. U stadijumu N1 je 6 slučajeva, u stadijumu N2 je 7 slučajeva, a u stadijumu N3 je 13 slučajeva.

U tabeli 41 je prikazana distribucija skorova CK8 u odnosu na prisustvo metastaza u limfnim čvorovima. U grupi sa metastazama u limfne čvorove, u 21 slučaju nema ekspresije CK8, u 4 slučaja je ekspresija CK8 sokrovana sa 4 i u jednom slučaju je skorovana sa 2. U grupi bez metastaza u limfne čvorove, u 49 slučajeva je ekspresija CK8 skorovana sa 0, 4 slučaja su skorovana sa 1, 3 slučaja su skorovana sa 2 i jedan slučaj je skorovan sa 4.

Tabela 41: Distribucija skorova CK8 u odnosu na prisustvo metastaza u limfnim čvorovima

Prisustvo metastaza	CK8 skor				
	0	1	2	3	4
da	21	4	1	0	0
ne	49	4	3	0	1

U tabeli 42 je prikazana distribucija skorova CK10 u odnosu na prisustvo metastaza u limfnim čvorovima. U grupi sa metastazama u limfne čvorove, u 21 slučaju nema ekspresije CK10, u 4 slučaja je ekspresija CK10 skrovana sa 1 i u jednom slučaju vana sa 2. U grupi bez metastaza u limfne čvorove, u 34 slučajeva nema ekspresije CK10, 17 slučajeva su skorovana sa 1 a 6 slučajeva sa 2.

Tabela 42: Distribucija skorova CK10 u odnosu na prisustvo metastaza u limfnim čvorovima.

Prisustvo metastaza	CK10 skor				
	0	1	2	3	4
da	21	4	1	0	0
ne	34	17	6	0	0

U tabeli 43 je prikazana distribucija skorova CK13 u odnosu na prisustvo metastaza u limfnim čvorovima. U grupi sa metastazama u limfne čvorove, u 7 slučajeva je skorovano sa 2, 7 slučajeva sa 3 i 12 slučajeva sa 5. U grupi bez metastaza u limfne čvorove, 5 slučajeva je skorovano sa 1, 14 slučajeva sa 2, 14 slučajeva sa 3 i 24 slučaja sa 4.

Tabela 43: Distribucija skorova CK13 u odnosu na prisustvo metastaza u limfnim čvorovima.

Prisustvo metastaza	CK13 skor				
	0	1	2	3	4
da	0	0	7	7	12
ne	0	5	14	14	24

U tabeli 44 je prikazana distribucija skorova CK17 u odnosu na prisustvo metastaza u limfnim čvorovima. U grupi sa metastazama u limfne čvorove, jedan slučaj je bez ekspresije CK17, 5 slučajeva je skorovano sa 1, 13 slučajeva sa 13 i 7 slučajeva sa 3. U grupi bez metastaza u limfne čvorove, u 3 slučaja nema ekspresije CK17, 9 slučajeva je skorovano sa 1, 23 slučaja sa 2, 15 slučajeva sa 3 i 7 slučajeva sa 4.

Tabela 44: Distribucija skorova CK17 u odnosu na prisustvo metastaza u limfnim čvorovima.

Prisustvo metastaza	CK17 skor				
	0	1	2	3	4
da	1	5	13	7	0
ne	3	9	23	15	7

Izračunati su Spearmanovi rho koeficijenti i predstavljeni su u tabeli 45.

Tabela 45: Korelacija ekspresije CK8, CK10, CK13 i CK17 sa stadijumom skvamocelularnog karcinoma larinksa

Spearman's rho		CK8	CK10	CK13	CK17
N stadijum	Koeficijent korelacije	.081	-.190	.067	-.098
	Sig. (2-tailed)	.468	.086	.547	.379

Na osnovu rezultata dobijenih statističkom obradom, zaključeno je da nema značajne povezanosti ekspresije CK8, CK10, CK13 i CK17 u skvamocelularnom karcinomu larinksa sa prisustvom metastaza u limfnim čvorovima.

4.10. POVEZANOST EKSPRESIJE CITOKERATINA CK8, CK10, CK13 I CK17 U SKVAMOCELULARNOM KARCINOMU LARINKSA SA DUBINOM INVAZIJE TUMORA

U tabeli 46 su prikazane prosečne dubine invazije u mm po skor u imunohistohemijskog bojenja na CK8. Prosečna dubina invazije za skor 0 je 9,56mm, prosečna dubina invazije za skor 1 je 11,1mm, prosečna dubina invazije za skor 2 je 13,57mm, nije bilo slučajeva skorovanog sa 3, i prosečna dubina invazije slučajeva skorovanih sa 4 je 9mm.

Tabela 46: Prosečna dubina invazije u mm po skor u imunohistohemijskog bojenja na CK8

CK8 skor	0	1	2	3	4
Prosečna dubina invazije mm	9,56	11,1	13,57	/	9

U tabeli 47 su prikazane prosečne dubine invazije u mm po skor u imunohistohemijskog bojenja na CK10. Prosečna dubina invazije za skor 0 je 9,56mm, prosečna dubina invazije za skor 1 je 9,10mm, prosečna dubina invazije za skor 2 je 9,5mm, nije bilo slučajeva skorovanog sa 3, nije bilo slučajeva skorovanog sa 4.

Tabela 47: Prosečna dubina invazije u mm po skor u imunohistohemijskog bojenja na CK10.

CK10 skor	0	1	2	3	4
Prosečna dubina invazije mm	9,56	9,10	9,50	/	/

U tabeli 48 su prikazane prosečne dubine invazije u mm po skor u imunohistohemijskog bojenja na CK13. Nije bilo slučajeva skvamocelularnog karcinoma skorovanog sa 0. Prosečna dubina invazije za skor 1 je 9,75mm, prosečna dubina invazije za skor 2 je 9,62mm, prosečna dubina invazije za skor 3 je 8,80mm i prosečna dubina invazije slučajeva skorovanih sa 4 je 9,56mm.

Tabela 48: Prosečna dubina invazije u mm po skor u imunohistohemijskog bojenja na CK13.

CK13 skor	0	1	2	3	4
Prosečna dubina invazije mm	/	9,75	9,62	8,80	9,56

U tabeli 49 su prikazane prosečne dubine invazije u mm po skor u imunohistohemijskog bojenja na CK17. Prosečna dubina invazije za skor 0 je 9,04, za skor 1 je 9,62mm, prosečna dubina invazije za skor 3 je 9,84mm, a prosečna dubina invazije za skor 4 je 10,24mm

Tabela 49: Prosečna dubina invazije u mm po skor u imunohistohemijskog bojenja na CK17.

CK17 skor	0	1	2	3	4
Prosečna dubina invazije mm	9,04	9,62	9,63	9,84	10,24

Izračunati su Spearmanovi rho koeficijenti i predstavljeni su u tabeli 50.

Tabela 50: Korelacija ekspresije CK8, CK10, CK13 i CK17 sa stadijumom skvamocelularnog karcinoma larinksa

Spearman's rho		CK8	CK10	CK13	CK17
Dubina invazije (mm)	Koeficijent korelacije	.378	-.175	.023	-.297
	Sig. (2-tailed)	.002	.154	.855	.014

Na osnovu rezultata dobijenih statističkom obradom, zaključeno je da postoji značajna povezanosti ekspresije CK8 i u skvamocelularnom karcinomu larinksa sa dubinom invazije tumora i značajna negativna korelacija između ekspresije CK17 u skvamocelularnom karcinomu karinksa i dubine invazije tumora.

5. DISKUSIJA

Ovo je prvo istraživanje u kome je ispitana dijagnostička korisnost CK13 u benignim i malignim lezijama larinksa. CK13 se pokazao kao dijagnostički značajan imunohistohemijski marker u diferencijalnoj dijagnozi benignih lezija i displazija larinksa, kao i u diferencijalnoj dijagnozi između benignih lezija i skvamocelularnog karcinoma larinksa.

U normalnom epitelu larinksa je ekspresija CK13 homogena i uniformna u suprabazalnim ćelijama epitela. U benignim lezijama je ekspresija CK13 homogena i uniformna u 35 od 52 slučaja (67,3%) dok se gubitak ekspresije CK13 uočava u 17 od 52 benigne lezije (32,7%). U svim benignim lezijama je gubitak CK13 uočen u epitelu koji se morfološki ne razlikuje od normalnog epitela. U svim slučajevima displazije larinksa i skvamocelularnog karcinoma larinksa je uočen gubitak ekspresije CK13. Nakon statističke obrade, za CK13 je odabrana granična vrednost ≥ 1 kao dijagnostički značajna (senzitivnost 100%, specifičnost 67,3% i površina ispod krive 0,926) za diferencijalnu dijagnozu između skvamocelularnog karcinoma larinksa i benignih lezija larinksa. Ukoliko postoji diferencijalno dijagnostička dilema između benigne lezije i skvamocelularnog karcinoma, a u leziji je uočen gubitak ekspresije CK13, lezija je skvamocelularni karcinom. Granična vrednost ≥ 1 (senzitivnost 100%, specifičnost 67,3% i površina ispod krive 0,921) je odabrana kao dijagnostički značajna za diferencijalnu dijagnozu između displazije larinksa i benignih lezija larinksa. Ukoliko na osnovu morfološke slike postoji diferencijalno dijagnostička dilema između benigne lezije i displazije larinksa, a uočen je bilo kakav gubitak ekspresije CK13 u leziji, lezija je displazija larinksa. Prema našim saznanjima, imunohistohemijski marker CK13 nije do sada ispitivan kao dijagnostički marker u lezijama larinksa. Do sada su samo Guang He i saradnici (173) istraživali promene na genu CK13 u skvamocelularnom karcinomu larinksa i otkrili su da postoji delecija CK13 gena. Takođe su zaključili da je ekspresija CK13 gena značajno veća u normalnom tkivu larinksa nego u skvamocelularnom karcinomu larinksa, što je u skladu sa rezultatima dobijenim u našem istraživanju (173). Gubitak ekspresije CK13 gena je bio izraženiji u slabije diferencijalnim tumorima. Pretpostavili su da CK13 gen može biti tumor supresorski gen (173). Van Der Velden i saradnici su ispitivali imunohistohemijsku ekspresiju CK13 u skvamocelularnom karcinomu larinksa i uočili da postoji smanjenje ekspresije u odnosu na normalan epitel larinksa, što je u skladu sa našim rezultatima (203). Uočili su da je smanjene ekspresije CK13 intenzivnije u karcinomima višeg gradusa. Autori nisu ispitivali dijagnostički značaj gubitka ekspresije CK13. Ekspresija CK13 je ispitivana u epitelnim tumorima drugih regija. Uočili smo da postoji gubitak ekspresije CK13 u 17 od 52 (32,7%) benignih lezija u epitelu koji je bez patoloških promena, što objašnjava nižu specifičnost ovog markera. Van der Velden i saradnici su ispitivali ekspresiju CK13 u benignim lezijama i došli do zaključka da je ekspresija CK13 nehomogena u lezijama sa hiperkeratozom (167), što se razlikuje od naših zapažanja. Razlike u zaključcima su posledica malog uzorka u pomenutoj studiji (u studiju je bilo uključeno samo 12 benignih lezija) i u različitim klonovima antitela koja su korišćena za imunohistohemijsko bojenje. Ekspresija CK13 nije ispitivana do sada u displazijama larinksa.

Ekspresija CK13 je ispitivana u displazijama i skvamocelularnim karcinomima drugih regija.

Gubitak ekspresije CK13 se pokazao kao značajan za dijagnozu oralnih displazija i skvamocelularnog karcinoma oralne regije (204, 205, 206) što je u skladu sa našim rezultatima. Farrukh S et al. (204) su u svom istraživanju uočili gubitak ekspresije CK13 u 50% uzoraka sa displazijama oralnog epitela i skvamocelularnim karcinomom, što je značajno manje u odnosu na rezultate dobijene u našem istraživanju. Razlike su posledica drugačije interpretacije gubitka ekspresije CK13. U našem istraživanju kao gubitak ekspresije je smatran niži intenzitet ekspresije CK13 u odnosu na zdravo tkivo, odnosno nehomogena ekspresija CK13, dok su Farrukh i sar. kao gubitak ekspresije smatrali samo potpuno odsustvo ekspresije CK13. U svom istraživanju su ipak napomenuli da su u svim analiziranim

slučajevima sa dijagnostikovanim displazijama oralnog epitela i skvamocelularim karcinomom uočili smanjen intenzitet ekspresije i nehomogenu ekspresiju CK13 što je u skladu sa našima rezultatima. Sakamoto i saradnici su u svom istraživanju ekspresije CK13 u skvamocelularnom karcinomu i displazijama oralne regije detektovali gubitak ekspresije u 89 od 90 skvamocelularnih karcinoma oralne regije i u 35 od 50 slučajeva displazije oralnog epitela (176). Zaključeno je da gubitak ekspresije nije posledica gubitka ekspresije CK13 u ćelijama, već da je posledica povećanog broja ćelija koje uopšte ne ekspresiraju CK13. U studiji je ispitivana ekspresija više različitih citokeratina među kojima su bili i CK10 i CK17 i zaključeno je da je CK13 najkonstantniji marker sa aberantnom ekspresijom u premalignim i malignim lezijama oralne mukoze. (176), što je u skladu sa našim rezultatima.

Razlozi za gubitak ekspresije CK13 u tkivu malignih epitelnih tumora nisu jasni. Smatra se da bi gen za CK13 mogao biti tumor supresorski gen (173). Zaključeno je da ćelije u kojima nema ekspresije CK13 imaju veliku predispoziciju da krenu u nekontrolisanu hiperproliferaciju. Zaključeno je da nedostatak CK13 utiče na povećanu aktivnost ciklina E1 i E2, što za posledicu ima stimulaciju proliferacije ćelije (171). Mi pretpostavljamo da bi gubitak CK13 mogao biti rani događaj u karcinogenezi skvamocelularnog karcinoma larinksa i da su kasnije mutacije odgovorne za morfološke promene u epitelu.

CK 17 je vrlo senzitivna, ali slabo specifičan marker za dijagnozu skvamocelularnog karcinoma larinksa. Statističkom obradom podataka, odabrana je granična vrednost ≥ 1 (senzitivnost 95,2%, specifičnost 43,3%, površina ispod krive 0,692) kao dijagnostički značajna. Ukoliko postoji dijagnostička dilema između benigne lezije i skvamocelularnog karcinoma, a CK17 se ekspresira u leziji, lezija bi se mogla proglasiti skvamocelularnim karcinomom. Ekspresija CK17 u skvamocelularnom karcinomu larinksa je do sada ispitivana u jednom istraživanju gde je zaključeno da je CK17 specifičan 100% i senzitivna 95% imunohistohemijski marker za skvamocelularni karcinom larinksa (134). Ovi rezultati se ne slažu u potpunosti sa našim rezultatima. U našem istraživanju je ekspresija CK17 specifična za dijagnostiku skvamocelularnog karcinoma larinksa, ali je senzitivnost ove metode znatno niža 43,3% u odnosu da senzitivnost iste metode u pomenutoj studiji 95%. Razlike u senzitivnosti između dve studije su posledica većeg broja benignih lezija koje su uključene u našu studiju, za koje se ispostavilo da ekspresiraju CK17. U našu studiju smo uključili 20 slučajeva polipa larinksa od kojih 19 (95%) ekspresiraju CK17 i 12 slučajeva papilarne keratoze larinksa od kojih 8 (68,3%) ekspresiraju CK17. U studiji Cohen-Kerem i saradnika (134) je bilo uključeno samo 6 polipa larinksa. Moguće je da su razlike u rezultatima posledica i razlike u klonovima korišćenih antitela. Takođe, postoji razlika u interpretaciji podataka, jer je u našoj studiji korišćen semikvantitativni metod skorovanja ekspresije antitela, dok je u studiji Cohen-Kerem i saradnika korišćen metod kompjuterizovane histomorfometrije, koji, iako precizniji, nije pogodan za upotrebu u dijagnostičke svrhe. Regenbogen i saradnici su u svom istraživanju u koje je bilo uključeno 25 slučajeva sa dijagnostikovanim skvamocelularnim karcinomom larinksa došli do zaključka da je CK17 sa senzitivnošću od 84% i specifičnošću od 95% vrlo pouzdan imunohistohemijski marker za dijagnostikovanje skvamocelularnog karcinoma larinksa (192), što je u suprotnosti sa našim rezultatima. Razlike u rezultatima su posledica razlike u veličini uzorka (Regenbogen i saradnici su u istraživanju imali samo 25 slučajeva skvamocelularnog karcinoma larinksa), korišćena različitih klonova CK17 i posledica toga što su Regenbogen i saradnici upoređivali ekspresiju CK17 u karcinomima sa ekspresijom CK17 u normalnom epitelu larinksa, za razliku od našeg istraživanja gde je ekspresija CK17 u karcinomima upoređivana sa ekspresijom CK17 u benignim lezijama larinksa u kojima se ispostavilo da postoji ekspresija CK17.

Zaključili smo da CK17 nije imunohistohemijski marker koji je najpogodniji za interpretaciju. Pozitivnost u našim slučajevima varira od vrlo slabe do jake, a obrazac ekspresije od fokalnog do difuznog u istoj leziji. Ovo je naročito uočljivo u slučajevima skvamocelularnog karcinoma pacijenata koji su podvrgnuti totalnoj laringektomiji. Preseci na kojima je rađeno imunohistohemijsko bojenje su

velike površine i uočeno je da postoje delovi tumora u kojima nema ekspresije CK17, delovi tumora u kojima postoji fokalna ekspresija ili ekspresija u pojedinačnim ćelijama, a da postoje i delovi tumora u kojima je ekspresija CK17 mrljasta ili difuzna (u obliku plaža). Takav nejednak i nehomogen način ekspresije CK17 predstavlja problem za dijagnostiku na malim biopsijama, jer nepostojanje ekspresije CK17 na delu tumora koji je bioptiran ne znači da se u tumoru ne ekspresira CK17, već znači da samo nije bioptiran deo tumora koji ekspresira CK17.

Ekspresija CK17 je ispitivana u skvamocelularnim karcinomima oralne regije i zaključeno je da je CK17 dijagnostički značajan marker za dijagnozu skvamocelularnih karcinoma te regije (207, 208, 209). U pomenutim studijama je ekspresija CK17 uočena u manjem procentu tumora, nego što je to slučaj u našem istraživanju u kome je uočena ekspresija CK17 u svim slučajevima skvamocelularnog karcinoma larinksa. Ove razlike su posledica drugačijeg skorovanja ekspresije CK17. CK 17 se pokazao kao značajan dijagnostički marker za karcinome orofaringealne regije (210). Ekspresija CK17 u leziji takođe ukazuje na skvamocelularni karcinom cerviksa uterusa (166, 211, 212) i kože (213).

Ekspresija CK17 nije po našim saznanjima ispitivana u displazijama larinksa. U našim istraživanju se pokazalo da CK17 nije značajan dijagnostički marker za razlikovanje benignih lezija larinksa od displazija larinksa. Ekspresija CK17 nije uočena u 13 (46,4%) naših slučajeva displazije, pa je stoga površina ispod krive, koja je dobijena statističkom analizom 0,462, što nije dijagnostički značajan rezultat. CK 17 se takođe nije pokazao kao značajan dijagnostički marker za razlikovanje displazija visokog gradusa od displazija niskog gradusa. U istraživanjima koja su se bavila ekspresijom CK17 u displazijama epitela oralne regije, zaključeno je da je CK17 dobar dijagnostički marker za dijagnostikovanje oralne displazije i da povećanje ekspresije CK17 korelira sa višim gradusom displazije, što ga čini dobrim dijagnostičkim markerom za gradiranje displazija oralne regije (208, 214). Iste karakteristike ekspresije CK17 su uočene i u displazijama cerviksa uterusa, (166, 211, 212), displastičnih promena u koži (213) i diferentovanih vulvarnih intraepitelnih neoplazija (214, 215), gde se može koristiti za dijagnostikovanje i gradiranje displazije. Rezultati dobijeni u prethodno navedenim studijama se razlikuju od naših rezultata. Razlike u rezultatima mogu biti posledica manjeg broja slučajeva displazija u našoj studiji, drugačije patogeneze nastanka displazija larinksa u odnosu na displazije cerviksa uterusa, vulve i kože, ili drugačijeg embrionalnog porekla larinksa i oralne sluznice. CK17 je senzitivan, ali slabo specifičan marker za razlikovanje displazija larinksa od skvamocelularnog karcinoma larinksa. Nakon statističke obrade odabrana granična vrednost ≥ 1 kao dijagnostički značajna (senzitivnost 95,2%, specifičnost 46,4% i površina ispod krive 0,739) za diferencijalnu dijagnozu između displazija larinksa i skvamocelularnog karcinoma larinksa. Ukoliko postoji diferencijalno dijagnostička dilema između displazije i skvamocelularnog karcinoma larinksa, a u leziji se ekspresira CK17, lezija je verovatno skvamocelularni karcinom larinksa.

Ovi rezultati ukazuju da povišena ekspresija CK17 u leziji ukazuje na malignu prirodu lezije, što je u skladu sa istraživanjima sprovedenim na lezijama oralne regije (207, 208, 209), cerviksa uterusa (166, 211, 212) i vulve (215).

Poznato je da citokeratin 17 igra ulogu u kancerogenezi i procesu zapaljenja. S obzirom da polip larinksa nastaje kao odgovor strme na zapaljenje ili traumu, moglo bi se pretpostaviti da je povišena ekspresija CK17 u epitelu polipa larinksa indukovana upravo zapaljenjem. U prilog ove tvrdnje govore rezultati istraživanja u kome je zaključeno da citokini koje luče T-limfociti stimulišu ekspresiju citokeratina CK1, CK10, CK6, CK16 i CK17 (216). Poznato je da IFN- γ stimuliše ekspresiju CK17 (217), a povišen nivo IFN- γ je detektovan u glasnim žicama nakon traume (218), što bi moglo biti potencijalno objašnjenje za povišenu ekspresiju CK17 u epitelu polipa larinksa. CK17 se u našem istraživanju pokazao kao marker koji ukazuje na maligni potencijal lezije i ekspresira se u svim karcinomima larinksa uključenim u naše istraživanje. CK17 se ponaša kao onkogen. CK17 indukuje proliferaciju ćelije preko interakcije sa STAT-3 (182), preko svoje interakcije sa komponentama AKT/mTOR signalne kaskade (183). Interaguje sa AIRE i podstiče proces tumorigeneze koji je

posredovan Gli-2 (181). CK 17 ulazi u nukleus gde se vezuje za p27 i na taj način sprečava zaustavljanje ćelijskog ciklusa u G1 fazi, pa ćelija ulazi u S fazu ćelijskog ciklusa (186). Koji je tačan mehanizam delovanja CK17 u patogenezi skvamocelularnog karcinoma larinksa još nije poznato.

U diferencijalno dijagnostičkoj dilemi između displazije larinksa i benignih lezija larinksa, CK10 se pokazao kao koristan marker. Ekspresija CK10 nije uočena u normalnom epitelu larinksa. U benignim tumorima larinksa ekspresija CK10 je uočena u 16 (30,7%) slučajeva, a u displazijama je na CK10 pozitivno 20 (70,2%) slučajeva. Ekspresija CK10 je uočena u čak 9 (90%) slučajeva displazije niskog gradusa, 11 (61,2%) slučajeva displazije visokog gradusa i 28 (33,7%) slučajeva skvamocelularnog karcinoma larinksa. Da se uočiti da se CK10 ekspresira u lezijama sa malignim potencijalom, ali da je procenat slučajeva sa ekspresijom CK10 obrnuto proporcionalan malignom potencijalu lezije, to jest, da se pojavljuje u najvećem procentu displazija niskog gradusa, pa da procenat slučajeva pozitivnih na CK10 pada u našim uzorcima displazija visokog gradusa i da je procenat slučajeva pozitivnih na CK10 najniži u našim uzorcima skvamocelularnog karcinoma larinksa. Statističkom obradom podataka, odabrana je granična vrednost ≥ 1 (senzitivnost 71,4%, specifičnost 69,4%, površina ispod krive 0,733) kao dijagnostički značajna. Ukoliko na osnovu morfološke slike postoji diferencijalno dijagnostička dilema između benigne lezije i displazije larinksa, a CK10 se ekspresira u leziji, sugestivno je da se radi o displaziji larinksa. CK10 se pokazao kao koristan marker u diferencijalnoj dijagnostici displazija niskog gradusa i displazija visokog gradusa. Statističkom obradom podataka, odabrana je granična vrednost ≥ 2 (senzitivnost 80,0%, specifičnost 61,1%, površina ispod krive 0,742) kao dijagnostički značajna. Ukoliko postoji diferencijalno dijagnostička dilema između displazije visokog gradusa i displazije niskog gradusa, a u leziji je više od 5% ćelija pozitivno na CK10, verovatno se radi o displaziji niskog gradusa. CK10 je imunohistohemijski marker koji se ekspresira u normalnom, keratinizujućem epitelu kože, u tonzilarnim kriptama i u Hassal-ovim korpuskulima. U svim ostalim nekeratinizujućim epitelima se ne ekspresira, ili se ekspresira samo u pojedinačnim, retkim, suprabazalnim ćelijama (219). U istraživanju Carrilho i saradnika, uočena je ekspresija CK10 i u normalnoj sluznici ektocerviksa, a gubitak ekspresije CK10 je smatran dijagnostički značajnim za dijagnozu displazije i skvamocelularnog karcinoma cerviksa uterusa (166). Gubitak ekspresije CK10 bio je izraženiji u displazijama višeg gradusa, dok je najizraženiji gubitak bio u skvamocelularnom karcinomu (166). Ovakvi rezultati su dijametralno suprotni od naših rezultata. Moguća objašnjenja za razlike su drugačija patogeneza nastanka lezija cerviksa (infekcija HPV-om je glavni etiološki faktor u nastanku displazija i karcinoma cerviksa uterusa, dok u nastanku displazija i skvamocelularnog karcinoma HPV ne igra značajnu ulogu) i drugačije osobine epitela dve regije, s obzirom na različito embrionalno poreklo cerviksa i larinksa. Gubitak ekspresije CK10 u aktiničnom heilitisu je dijagnostički znak displazije (169), što je opet u potpunoj suprotnosti sa našim rezultatima da je pojava ekspresije CK10 početni znak maligne transformacije. Objašnjenje za ove razlike se opet može naći u drugačijoj patogenezi lezije (UV zračenje kao etiološki faktor u nastanku displazija u aktiničnom heilitisu) i drugačijim osobinama epitela usne i larinksa. U displazijama ezofagusa je uočena ekspresija CK10 (220) kao i u ortokeratotičnim displazijama (221), što je u skladu sa našim rezultatima. CK10 se nije pokazao kao dijagnostički značajan imunohistohemijski marker za dijagnostiku skvamocelularnog karcinoma larinksa. Cohen-Kerem i saradnici su u svom istraživanju zaključili da je CK10 vrlo senzitivan (senzitivnost 90,9%) i umereno specifičan (specifičnost 69,2%) imunohistohemijski marker za dijagnostiku skvamocelularnog karcinoma larinksa (164). Razlike u rezultatima su posledica različite metodologije jer su Cohen-Kerem i saradnici PCR metodom i Southern Blot metodom merili količinu CK10 iRNK u uzorku. Takođe, navedene razlike u uzorcima su posledica različitosti uzorka. Cohen-Kerem i saradnici su upoređivali količinu CK10 iRNK ekstrahovanu iz skvamocelularnog karcinoma larinksa sa količinom CK10 iRNK ekstrahovanom iz normalnog epitela larinksa, u kome se ne ekspresira CK10, a u uzorku nisu imali benigne lezije larinksa u kojima se, kao što smo zaključili može ekspresirati CK10.

CK8 se nije pokazao kao značajan dijagnostički marker u dijagnostici benignih lezija, displazija i skvamocelularnog karcinoma larinksa.

Zaključili smo da je CK13 odličan marker za određivanje linija resekcije. Ekspresija CK13 se gubi u svim lezijama sa malignim potencijalom koje su uključene u naše istraživanje (displazije niskog i visokog gradusa i skvamocelularni karcinom larinksa). Ekspresija CK13 je jaka i homogena u normalnom epitelu larinksa, pa je gubitak ekspresije CK13 je lako uočljiv. Smatramo da se tumor nalazi na linijama resekcije kad bojenje na CK13 na linijama resekcije nije uniformno, odnosno kada postoji gubitak ekspresije CK13 u epitelu. CK13 je značajan marker kada postoji dilema da li se radi o epitelu prelaznog tipa, ili o displastičnom epitelu, s obzirom da je bojenje epitela prelaznog tipa jako i homogeno, za razliku od displazije.

Do sada je CK17 predložen kao pouzdan marker koji bi pomogao u interpretaciji da li se tumor nalazi ili ne nalazi na linijama resekcije, što se razlikuje od naših rezultata. Cohen-Kerem i saradnici su koristili kompjutersku histomorfometriju u interpretaciji svojih rezultata (134), što nije lako primenljivo u praktičnom radu, a po našem iskustvu, postoje vrlo velike varijabilnosti u ekspresiji CK17 u lezijama sa malignim potencijalom, što ga čini nepouzdanim markerom za određivanje linija resekcije. Naime, CK17 nije ekspresiran u svim lezijama sa malignim potencijalom. U 13 (46,4%) svih slučajeva sa dijagnostikovanom displazijom larinksa i u 4 (4,8%) naših uzoraka sa dijagnostikovanim skvamocelularnim karcinomom nema ekspresije CK17. CK17 se pri tome u istoj leziji ekspresira na različite načine. Postoje oblasti u istoj leziji u kojima nema ekspresije CK17 i oblasti u kojima je ekspresija fokalna, mrljasta ili što je ređe homogena u vidu plaža. Zbog nepostojanja ekspresije u svim lezijama sa malignim potencijalom i nehomogene ekspresije, CK17 po našem mišljenju nije adekvatan imunohistohemijski marker za određivanje linija resekcije.

U našem istraživanju smo došli od zaključka da postoji negativna korelacija između procenta ćelija u leziji koje su pozitivne na CK17 i gradusa (diferentovanosti) skvamocelularnog karcinoma. Zaključili smo da se najveći procenat ćelija pozitivnih na CK17 nalazi u dobro diferentovanim karcinomima a najmanji procenat CK17 pozitivnih ćelija se nalazi u slabo diferentovanim skvamocelularnim karcinomima, odnosno ekspresija CK17 se gubi sa povećavanjem gradusa tumora. Cohen-Kerem i saradnici su u svom istraživanju došli do zaključka da ekspresija CK17 nije povezana sa gradusom tumora (134). Razlike u rezultatima su posledica drugačije interpretacije pozitivnosti CK17 kao i broja ispitanika, jer su Cohen-Kerem i saradnici imali manji uzorak od 57 skvamocelularnih karcinoma larinksa, dok je u našem istraživanju broj slučajeva skvamocelularnog karcinoma larinksa bio 83. E-S Xu i saradnici su u svom istraživanju na karcinomima regije glave i vrata, u koje je bilo uključeno 3 skvamocelularna karcinoma larinksa, došli do zaključka da se ekspresija CK17 smanjuje u slabije diferentovanim karcinomima ove regije (210), što je u skladu sa našim zaključcima. Regenbogen i saradnici su u svom istraživanju u koje je bilo uključeno 25 slučajeva sa dijagnostikovanim skvamocelularnim karcinomom larinksa, došli do zaključka da se ekspresija CK17 u karcinomima smanjuje sa porastom gradusa tumora (192), što je u skladu sa našim rezultatima. Ekspresija CK17 je veća u dobro i umereno diferentovanim skvamocelularnim karcinomima nego u slabo diferentovanim karcinomima oralne sluznice (190), što je u skladu sa našim rezultatima. Safadi i saradnici su u svom istraživanju na karcinomima oralne i orofaringealne regije zaključili da je ekspresija CK13 veća u dobro diferentovanim karcinomima (165), što je u suprotnosti sa rezultatima koje smo mi dobili. Razlika u zaključcima može da bude posledica toga što Safadi i saradnici nisu u svoju studiju uključili skvamocelularne karcinome larinksa koji se po svojim osobinama razlikuju od karcinoma oralne i orofaringealne regije (222).

Na osnovu rezultata dobijenih statističkom obradom podataka smo došli do zaključka da ne postoji povezanost između ekspresije citokeratina CK8, CK10, CK13 i CK17 sa stadijumom skvamocelularnog karcinoma larinksa. Po našim saznanjima, ekspresija ovih citokeratina nije upoređivana sa stadijumima tumora do sada.

Na osnovu rezultata dobijenih statističkom analizom smo došli do zaključka da ne postoji povezanost između ekspresije citokeratina CK8, CK10, CK13 i CK17 sa prisustvom metastaza skvamocelularnog karcinoma larinksa u limfnim čvorovima. E-S Xu su u svom istraživanju na karcinomima regije glave i vrata, u koje je bilo uključeno 3 slučaja skvamocelularnog karcinoma larinksa, zaključili da je smanjenje ekspresije CK17 u tumorima prediktor pojave metastaza u limfnim čvorovima (210). Ovi rezultati se razlikuju od naših rezultata. Razlike mogu da budu posledica drugačijeg uzorkovanja materijala. Za istraživanje E-S Xu su korišćeni tkivni mikronizovi, gde su za imunohistohemijsku analizu birani mali reprezentativni fokusi prečnika par milimetara, dok su u našem istraživanju za imunohistohemijsku analizu korišćeni celi preseki tumorskog tkiva, što je uzevši u obzir nehomogenu ekspresiju CK17 u tumorima, moglo da dovede do razlike u rezultatima. U pomenuto istraživanje su bila uključena samo 3 slučaja skvamocelularnog karcinoma larinksa, što je značajno manji uzorak od našeg. U pomenutom istraživanju je najveći broj slučajeva bio iz drugih regija glave i vrata. Skvamocelularni karcinom larinksa se po patogenezi razlikuje od skvamocelularnog karcinoma drugih regija glave i vrata, što je dokazano komparativnom genetskom studijom u kojoj je otkriveno da postoje razlike u genetskom obrascu između skvamocelularnog karcinoma larinksa i skvamocelularnih karcinoma drugih regija glave i vrata i da su karcinomi larinksa sličniji po biološkom ponašanju karcinomima respiratornog trakta (222.).

Na osnovu rezultata dobijenih statističkom obradom, zaključeno je da postoji značajna pozitivna povezanost ekspresije CK8 i značajna negativna korelacija ekspresije CK17 u skvamocelularnom karcinomu larinksa sa dubinom invazije tumora. Što je ekspresija CK8 prisutna u većem procentu ćelija u leziji, dubina invazije je veća, a što je ekspresija CK17 prisutna u većem procentu ćelija u tumoru, dubina invazije je manja. Safadi i saradnici su u svojem istraživanju na skvamocelularnim karcinomima oralne i orofaringealne regije zaključili da povećana ekspresija CK8 u tumoru korelira sa većom dubinom invazije, a da ne postoji povezanost između ekspresije CK10 i CK13 u tumoru sa dubinom invazije (165), što je u skladu sa našim rezultatima. U istraživanje Safadi i saradnika nisu bili uključeni skvamocelularni karcinomi larinksa. Pokazalo se da je povećana ekspresija CK17 u skvamocelularnom karcinomu analne regije povezana sa većom dubinom invazije (223), što nije u korelaciji sa našim rezultatima. Moguća objašnjenja za razlike u rezultatima su drugačija patogeneza i drugačije biološko ponašanje skvamocelularnog karcinoma analne regije od skvamocelularnog karcinoma larinksa. E-S Xu i saradnici su u svom istraživanju na skvamocelularnim karcinomima glave i vrata zaključili da je smanjena ekspresija CK17 u tumoru povezana sa većom dubinom invazije (210), što je u skladu sa našim rezultatima. Iako su rezultati navedenog istraživanja u skladu sa našim, Xu i saradnici su svoje istraživanje bazirali na tkivnom mikronizu na kome nije moguće adekvatno proceniti ekspresiju CK17 zbog heterogenog obrasca ekspresije CK17 u istoj leziji. Takođe, u njihovo istraživanje su bila uključena samo tri slučaja skvamocelularnog karcinoma larinksa, što je značajno manji uzorak od našeg.

6. ZAKLJUČCI:

1.

Citokeratin 13 je dijagnostički značajan marker za razlikovanje benignih lezija larinksa od lezija sa malignim potencijalom (displazija larinksa) i skvamocelularnog karcinoma larinksa. Ukoliko se u leziji gubi ekspresija CK13, lezija ima maligni potencijal i u pitanju je ili displazija ili skvamocelularni karcinom larinksa. Ukoliko u leziji koja je izgubila ekspresiju CK13 postoji i ekspresija CK17, lezija se može okarakterisati kao skvamocelularni karcinom.

Ukoliko postoji diferencijalno dijagnostička dilema između benigne lezije i displazije larinksa, a u leziji se ekspresira CK10, lezija se može okarakterisati kao displazija.

Ukoliko postoji diferencijalno dijagnostička dilema između displazije niskog gradusa i displazije visokog gradusa, a u leziji se ekspresira CK10 u 5% ili više ćelija, lezija se može okarakterisati kao displazija niskog gradusa.

Ukoliko postoji diferencijalno dijagnostička dilema između displazije larinksa i skvamocelularnog karcinoma larinksa, a u leziji se ekspresira CK17, lezija je verovatno skvamocelularni karcinom larinksa.

Gubitak ekspresije CK13 je sa specifičnošću od 100% znak da lezija ima maligni potencijal. Pojava ekspresije CK17 je znak visokog malignog potencijala lezije. CK17 se može koristiti kao pomoćni dijagnostički marker uz CK13 za postavljanje dijagnoze skvamocelularnog karcinoma larinksa. Pojava ekspresije CK10 je znak da se radi o displaziji larinksa. Ekspresija CK10 je učestalija u displazijama niskog gradusa nego u displazijama visokog gradusa, pa se CK10 može koristiti kao pomoćni dijagnostički marker uz CK13 za razlikovanje benignih lezija od displazija larinksa i za razlikovanje displazija niskog gradusa od displazija visokog gradusa. CK8 se ekspresira samo u skvamocelularnim karcinomima larinksa, ali CK8 se nije pokazao kao dijagnostički značajan marker za skvamocelularni karcinom larinksa. Dijagnostička vrednost CK13, CK10 i CK17 u diferencijalnoj dijagnostici benignih lezija larinksa, displazija larinksa i skvamocelularnog karcinoma larinksa je prikazana na slici 51.

2.

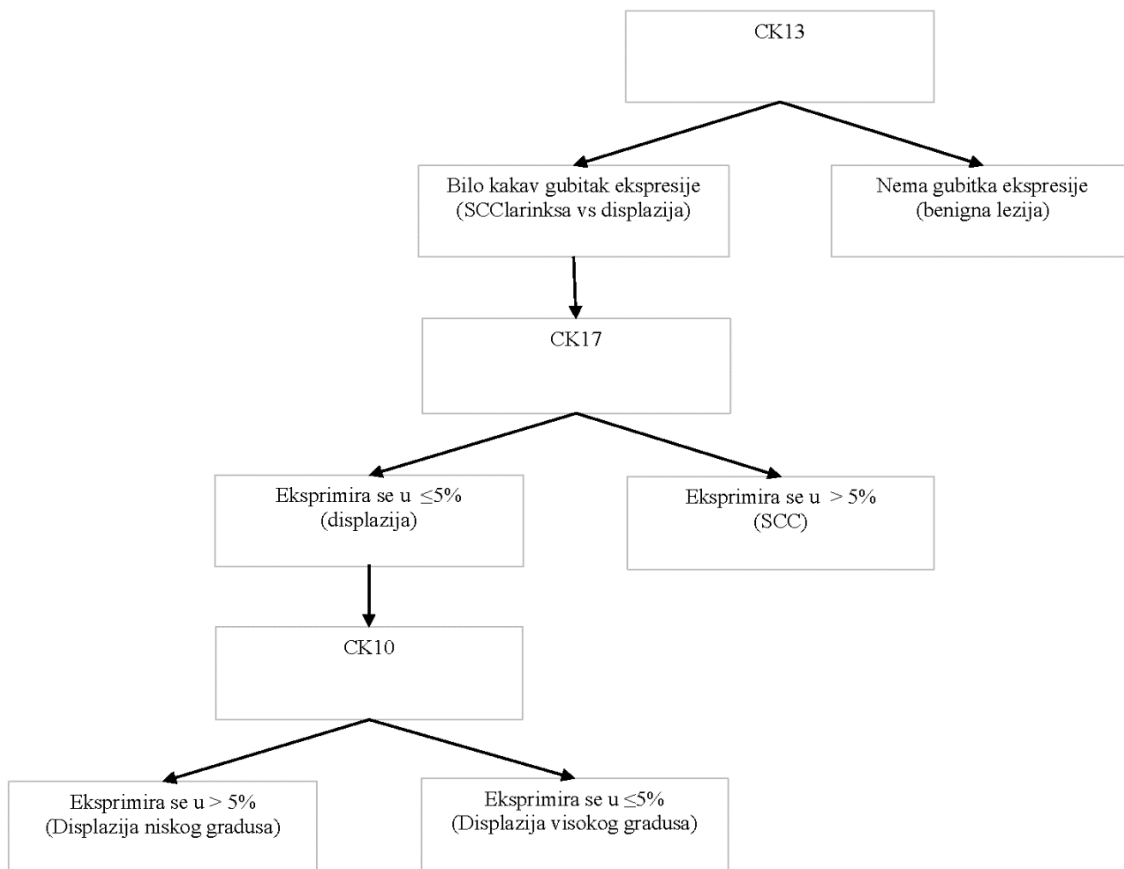
CK13 je dijagnostički koristan marker za određivanje linija resekcije displazija i skvamocelularnog karcinoma. S obzirom da se ekspresija CK13 gubi ili slabi u svim lezijama sa malignim potencijalom, a da je ekspresija CK13 homogena i konstantna u normalnom epitalu larinksa, svaki gubitak ili slabljenje ekspresije CK13 u epitelu označava da se na tom mestu nalazi lezija. Da nema lezije na linije resekcije se može tvrditi ukoliko je ekspresija CK13 homogena. Ekspresija CK8, CK13 i CK17 nije bila od dijagnostičkog značaja za određivanje statusa linija resekcije.

3.

Ne postoji povezanost ekspresije CK8, CK10, CK13 i CK17 sa stadijumom skvamocelularnog karcinoma larinksa, ali postoji negativna povezanost ekspresije CK17 sa gradusom tumora. Ukoliko je ekspresija CK17 prisutna u većem procentu ćelija u tumoru, tumor je bolje diferentvan, odnosno, nižeg je gradusa. Postoji pozitivna korelacija ekspresije CK8 i negativna korelacija ekspresije CK17 sa dubinom invazije tumora, što sugeriše da je ekspresija CK8 u skvamocelularnom karcinomu larinksa loš prognostički faktor.

4.

Ne postoji povezanost ekspresije CK8, CK10, CK13 i CK17 sa prisustvom metastaza skvamocelularnog karcinoma larinksa u limfnim čvorovima vrata.



Slika 51: Dijagnostički algoritam korišćenja CK13, CK17 i CK10 u dijagnostici lezija larinksa

7. LITERATURA

1. El-Naggar AK.,C Han J.K.C.G, Randis J.R , Takata T., Slootweg P. J.(Eds): WHO Classification of Head and Neck Tumours (4th edition).
2. Megwalu UC, Sikora AG. Survival outcomes in advanced laryngeal cancer. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 2014;140(9):855–60.
3. Karatzanis AD, Psychogios G, Waldfahrer F, Kapsreiter M, Zenk J, Velegarakis GA, et al. Management of locally advanced laryngeal cancer. *J Otolaryngol Head Neck Surg* 2014;43(1):4.
4. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=1&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1, accessed 11.07.2021.
5. Institute of Public Health of Serbia „Dr Milan Jovanović Batut” Cancer incidence and mortality in central Serbia 2014. Belgrade 2016.
6. Steuer CE, El-Deiry M, Parks JR, Higgins KA, Saba NF. An update on larynx cancer. *CA Cancer J Clin.* 2017 Jan;67(1):31-50.
7. Karamanou M, Markatos K, Lymperi M, Agapitos E, Androutsos G. A historical overview of laryngeal carcinoma and the first total laryngectomies. *J BUON.* 2017 May-Jun;22(3):807-811.
8. Green RM (transl). *Asclepiades. His Life and Writings: Antonio Cocchi’s Life of Asclepiades and Christian Gottlieb Gumpert’s Fragments from Asclepiades.* New Haven, Licht, 1955.
9. Wright J. *A History of Laryngology and Rhinology* Philadelphia, Lea and Febinger, 1914.
10. Alberti PW. Panel discussion: the historical development of laryngectomy. II. The evolution of laryngology and laryngectomy in the mid-19th century. *Laryngoscope.* 1975 Feb;85(2):288-98.
11. Pieters BM, Eindhoven GB, Acott C, van Zundert AA. Pioneers of laryngoscopy: indirect, direct and video laryngoscopy. *Anaesth Intensive Care.* 2015 Jul;43 Suppl:4-11.
12. Castellengo M. Manuel Garcia Jr: a clear-sighted observer of human voice production. *Logoped Phoniatr Vocol.* 2005;30(3-4):163-70.
13. Hussein K, Panning B. Rekonstruktion der Befundung des Larynxkarzinoms Kaiser Friedrichs III. durch Rudolf Virchow [Reconstruction of the examination of the laryngeal carcinoma of Emperor Frederick III by Rudolf Virchow]. *Pathologe.* 2018 Mar;39(2):172-177. German.
14. Hunter K. A short history of otolaryngology; opening address, winter session 1951-52, Royal Victoria Hospital, Belfast. *Ulster Med J.* 1951 Nov;20(2):106-17.
15. Sedivy R. Die Krankheit Kaiser Friedrichs III. und Virchows Rolle [The Malady of Emperor Frederick III. and Virchow's diagnostic role]. *Wien Med Wochenschr.* 2015 Apr;165(7-8):140-51. German.
16. Cardesa A, Zidar N, Alos L, Nadal A, Gale N, Klöppel G. The Kaiser's cancer revisited: was Virchow totally wrong? *Virchows Arch.* 2011 Jun;458(6):649-57.
17. Butlin HT. *On the Operative Surgery of Malignant Disease.* London, Churchill, 1900, pp 187-190.
18. Nogueira JF Jr, Hermann DR, Américo Rdos R, Barauna Filho IS, Stamm AE, Pignatari SS. A brief history of otorhinolaryngology: otology, laryngology and rhinology. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2007 Sep-Oct;73(5):693-703.
19. Lev MH, Curtin HD. Larynx. *Neuroimaging Clin N Am.* 1998 Feb;8(1):235-56. PMID: 9449763.

20. Suárez-Quintanilla J, Fernández Cabrera A, Sharma S. Anatomy, Head and Neck, Larynx. 2022 Sep 5. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan.
21. R. G. Williams & R. Eccles (1990) A New Clinical Measure of External Laryngeal Size Which Predicts the Fundamental Frequency of the Larynx, *Acta Oto-Laryngologica*, 110:1-2, 141-148.
22. Armstrong WB, Netterville JL. Anatomy of the larynx, trachea, and bronchi. *Otolaryngol Clin North Am*. 1995 Aug;28(4):685-99.
23. McCullagh KL, Shah RN, Huang BY. Anatomy of the Larynx and Cervical Trachea. *Neuroimaging Clin N Am*. 2022 Nov;32(4):809-829.
24. Freeland AP, Nostrand AW. The applied anatomy of the anterior commissure and subglottis. *Can J Otolaryngol*. 1975;4(4):644-59.
25. Beitler JJ, Mahadevia PS, Silver CE, Wadler S, Rubin JS, Bello JA, Mitnick RJ, Vikram B. New barriers to ventricular invasion in paraglottic laryngeal cancer. *Cancer*. 1994 May 15;73(10):2648-52.
26. Chen SA, Muller S, Chen AY, Hudgins PA, Shin DM, Khuri F, Saba NF, Beitler JJ. Patterns of extralaryngeal spread of laryngeal cancer: thyroid cartilage penetration occurs in a minority of patients with extralaryngeal spread of laryngeal squamous cell cancers. *Cancer*. 2011 Nov 15;117(22):5047-51.
27. Prades JM, Peoc'h M, Petcu C, Karkas A, Dumollard JM, Gavid M. The anterior commissure of the human larynx revisited. *Surg Radiol Anat*. 2017 Aug;39(8):871-876.
28. Schoenwolf G, Bleyl S, Brauer P, Francis-West P. *Larsen's Human Embryology*. 4th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, 2009.
29. Mor N, Blitzer A. Functional Anatomy and Oncologic Barriers of the Larynx. *Otolaryngol Clin North Am*. 2015 Aug;48(4):533-45.
30. Wenig Bruce M. *Atlas of Head and Neck Pathology*. 3ed ed . Philadelphia: Elsevier; 2016.
31. Brandwein-Weber MS. *Textbook of Head and Neck Pathology*. Cham Springer International Publishing; 2018.
32. Zhukhovitskaya A, Battaglia D, Khosla SM, Murry T, Sulica L. Gender and age in benign vocal fold lesions. *Laryngoscope*. 2015 Jan;125(1):191-6.
33. Akif Kiliç M, Okur E, Yildirim I, Güzelsoy S. The prevalence of vocal fold nodules in school age children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2004 Apr;68(4):409-12.
34. Sataloff RT. Professional singers: the science and art of clinical care. *Am J Otolaryngol*. 1981 Aug;2(3):251-66.
35. Won SJ, Kim RB, Kim JP, Park JJ, Kwon MS, Woo SH. The prevalence and factors associate with vocal nodules in general population: Cross-sectional epidemiological study. *Medicine (Baltimore)*. 2016 Sep;95(39):e4971.
36. Pontes P, Kyrillos L, Behlau M, De Biase N, Pontes A. Vocal nodules and laryngeal morphology. *J Voice*. 2002 Sep;16(3):408-14.
37. Shergill GS, Shergill AK. Large vocal cord polyp: an unusual cause of dyspnoea. *BMJ Case Rep*. 2015 Sep 2;2015:bcr2015211542.
38. Martins RH, Defaveri J, Domingues MA, de Albuquerque e Silva R. Vocal polyps: clinical, morphological, and immunohistochemical aspects. *J Voice*. 2011 Jan;25(1):98-106.
39. Chen M, Chen J, Yang Y, Cheng L, Wu HT. Possible association between *Helicobacter pylori* infection and vocal fold leukoplakia. *Head Neck*. 2018 Jul;40(7):1498-1507.
40. Tavaluc R, Tan-Geller M. Reinke's Edema. *Otolaryngol Clin North Am*. 2019 Aug;52(4):627-635.

41. Cipriani NA, Martin DE, Corey JP, Portugal L, Caballero N, Lester R, Anthony B, Taxy JB. The clinicopathologic spectrum of benign mass lesions of the vocal fold due to vocal abuse. *Int J Surg Pathol*. 2011 Oct;19(5):583-7.
42. Gray SD, Hammond E, Hanson DF. Benign pathologic responses of the larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1995 Jan;104(1):13-8.
43. Wang CT, Lai MS, Cheng PW. Long-term Surveillance Following Intralesional Steroid Injection for Benign Vocal Fold Lesions. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 2017 Jun 1;143(6):589-594.
44. Bishop DR. Gnepp's diagnostic surgical pathology of the head and neck, (Third Edition), Philadelphia: Elsevier; 2021.
45. Barillari MR, Volpe U, Mirra G, Giugliano F, Barillari U. Surgery or Rehabilitation: A Randomized Clinical Trial Comparing the Treatment of Vocal Fold Polyps via Phonosurgery and Traditional Voice Therapy with "Voice Therapy Expulsion" Training. *J Voice*. 2017 May;31(3):379.e13-379.e20.
46. Lee M, Sulica L. Recurrence of benign phonotraumatic vocal fold lesions after microlaryngoscopy. *Laryngoscope*. 2020 Aug;130(8):1989-1995.
47. Fancello V, Melis A, Piana AF, Castiglia P, Cossu A, Sotgiu G, Bozzo C, King EV, Meloni F. HPV Type 6 and 18 Coinfection in a Case of Adult-Onset Laryngeal Papillomatosis: Immunization with Gardasil. *Case Rep Otolaryngol*. 2015;2015:916023.
48. Thompson L, Goldblum J. *Head and Neck pathology*. Philadelphia: Elsevier; 2019.
49. Derkay CS. Recurrent respiratory papillomatosis. *Laryngoscope*. 2001 Jan;111(1):57-69.
50. Smith EM, Swarnavel S, Ritchie JM, Wang D, Haugen TH, Turek LP. Prevalence of human papillomavirus in the oral cavity/oropharynx in a large population of children and adolescents. *Pediatr Infect Dis J*. 2007 Sep;26(9):836-40.
51. Aaltonen LM, Auvinen E, Dillner J, Lehtinen M, Paavonen J, Rihkanen H, Vaheri A. Poor antibody response against human papillomavirus in adult-onset laryngeal papillomatosis. *J Med Microbiol*. 2001 May;50(5):468-471.
52. DeVoti J, Hatam L, Lucs A, Afzal A, Abramson A, Steinberg B, Bonagura V. Decreased Langerhans cell responses to IL-36γ: altered innate immunity in patients with recurrent respiratory papillomatosis. *Mol Med*. 2014 Aug 28;20(1):372-80.
53. Seedat RY. Juvenile-Onset Recurrent Respiratory Papillomatosis Diagnosis and Management - A Developing Country Review. *Pediatric Health Med Ther*. 2020 Feb 4;11:39-46.
54. Gerein V, Schmandt S, Babkina N, Barysik N, Coerdts W, Pfister H. Human papilloma virus (HPV)-associated gynecological alteration in mothers of children with recurrent respiratory papillomatosis during long-term observation. *Cancer Detect Prev*. 2007;31(4):276-81.
55. Ilboudo M, Zohoncon TM, Traore IMA, Traore EMA, Kande A, Obiri-Yeboah D, Djigma FW, Gyebre YMC, Simpore J. Implication of low risk human papillomaviruses, HPV6 and HPV11 in laryngeal papillomatosis in Burkina Faso. *Am J Otolaryngol*. 2019 May-Jun;40(3):368-371.
56. Buchinsky FJ, Valentino WL, Ruzskay N, Powell E, Derkay CS, Seedat RY et al. Age at diagnosis, but not HPV type, is strongly associated with clinical course in recurrent respiratory papillomatosis. *PLoS One*. 2019 Jun 13;14(6):e0216697.
57. Doyle DJ, Gianoli GJ, Espinola T, Miller RH. Recurrent respiratory papillomatosis: juvenile versus adult forms. *Laryngoscope*. 1994 May;104(5 Pt 1):523-7.
58. Wilcox LJ, Hull BP, Baldassari CM, Derkay CS. Diagnosis and management of recurrent respiratory papillomatosis. *Pediatr Infect Dis J*. 2014 Dec;33(12):1283-4.
59. Zhang XX, Wang J, Xiao Y, Ma LJ. Analysis of long-term effect of juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*. 2018 Nov 7;53(11):825-829. Chinese.

60. Xiao Y, Zhang X, Ma L, Wang J. Long-term outcomes of juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis. *Clin Otolaryngol*. 2021 Jan;46(1):161-167.
61. Wang J, Han DM, Ma LJ, Ye JY, Xiao Y, Yang QW. Risk factors of juvenile onset recurrent respiratory papillomatosis in the lower respiratory tract. *Chin Med J (Engl)*. 2012 Oct;125(19):3496-9.
62. Lin HW, Richmon JD, Emerick KS, de Venecia RK, Zeitels SM, Faquin WC, Lin DT. Malignant transformation of a highly aggressive human papillomavirus type 11-associated recurrent respiratory papillomatosis. *Am J Otolaryngol*. 2010 Jul-Aug;31(4):291-6.
63. Fortes HR, von Ranke FM, Escuissato DL, Araujo Neto CA, Zanetti G, Hochhegger B, Souza CA, Marchiori E. Recurrent respiratory papillomatosis: A state-of-the-art review. *Respir Med*. 2017 May;126:116-121.
64. Carifi M, Napolitano D, Morandi M, Dall'Olio D. Recurrent respiratory papillomatosis: current and future perspectives. *Ther Clin Risk Manag*. 2015 May 5;11:731-8.
65. Fusconi M, Grasso M, Greco A, Gallo A, Campo F, Remale M, Turchetta R, Pagliuca G, DE Vincentiis M. Recurrent respiratory papillomatosis by HPV: review of the literature and update on the use of cidofovir. *Acta Otorhinolaryngol Ital*. 2014 Dec;34(6):375-81.
66. Drejet S, Halum S, Brigger M, Skopelja E, Parker NP. A Systematic Review. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2017 Mar;156(3):435-441.
67. Manley C, Hutchinson C, Mahajan A, Ibrahim O, Folch E, Kumar R. Treatment of Recurrent Respiratory Papillomatosis: Case Series and Review of Technique. *Surg Technol Int*. 2021 May 20;38:139-143.
68. Đukić V., *Rekurentna respiratorna papilomatoza*, Beograd: Partenon; 2016.
69. Hellquist H, Lundgren J, Olofsson J. Hyperplasia, keratosis, dysplasia and carcinoma in situ of the vocal cords--a follow-up study. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 1982 Feb;7(1):11-27.
70. Batsakis JG, Raymond AK, Rice DH. The pathology of head and neck tumors: papillomas of the upper aerodigestive tracts, Part 18. *Head Neck Surg*. 1983 Mar-Apr;5(4):332-44.
71. Tsutsumi K, Nakajima T, Gotoh M, Shimosato Y, Tsunokawa Y, Terada M, Ebihara S, Ono I. In situ hybridization and immunohistochemical study of human papillomavirus infection in adult laryngeal papillomas. *Laryngoscope*. 1989 Jan;99(1):80-5.
72. Friedberg SA, Stagman R, Hass GM. Papillary lesions of the larynx in adults. A pathologic study. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1971 Oct;80(5):683-92.
73. Park JC, Altman KW, Prasad VMN, Broadhurst M, Akst LM. Laryngeal Leukoplakia: State of the Art Review. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2021 Jun;164(6):1153-1159.
74. Batsakis JG, Suarez P, el-Naggar AK. Proliferative verrucous leukoplakia and its related lesions. *Oral Oncol*. 1999 Jul;35(4):354-9.
75. Barnes L, Peel RL. Papillary keratosis of larynx versus verrucous carcinoma of larynx. In: Barnes L, Peel RL, eds. *Head and Neck Pathology. A Text/Atlas of Differential Diagnosis*. New York: : Igaku-Shoin, 1990:80–81.
76. Ferlito A, Recher G. Ackerman's tumor (verrucous carcinoma) of the larynx: a clinicopathologic study of 77 cases. *Cancer*. 1980 Oct 1;46(7):1617-30.
77. Bouquot JE, Gnepp DR. Laryngeal precancer: a review of the literature, commentary, and comparison with oral leukoplakia. *Head Neck*. 1991 Nov-Dec;13(6):488-97.
78. Odell E, Eckel HE, Simo R, Quer M, Paleri V, Klussmann JP, et al. European Laryngological Society position paper on laryngeal dysplasia Part I: aetiology and pathological classification. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2021 Jun;278(6):1717-1722.
79. Santi I, Kroll LE, Dietz A, Becher H, Ramroth H. To what degree is the association between educational inequality and laryngeal cancer explained by smoking, alcohol consumption, and occupational exposure? *Scand J Work Environ Health*. 2014 May 1;40(3):315-22.

80. Fusconi M, Campo F, Gallo A, Zambetti G, Martellucci S, Seccia A, de Vincentiis M. Laryngeal Cancer, HPV DNA vs E6/E7 mRNA Test: A Systematic Review. *J Voice*. 2017 Mar;31(2):248.e1-248.e5.
81. Müller KM, Krohn BR. Smoking habits and their relationship to precancerous lesions of the larynx. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1980;96(2):211-7.
82. Auerbach O, Hammond EC, Garfinkel L. Histologic changes in the larynx in relation to smoking habits. *Cancer*. 1970 Jan;25(1):92-104.
83. Bosatra A, Bussani R, Silvestri F. From epithelial dysplasia to squamous carcinoma in the head and neck region: an epidemiological assessment. *Acta Otolaryngol Suppl*. 1997;527:47-8.
84. Coca-Pelaz A, Rodrigo JP, Takes RP, Silver CE, Paccagnella D, Rinaldo A, et al. Relationship between reflux and laryngeal cancer. *Head Neck*. 2013 Dec;35(12):1814-8.
85. Anis MM, Razavi MM, Xiao X, Soliman AMS. Association of gastroesophageal reflux disease and laryngeal cancer. *World J Otorhinolaryngol Head Neck Surg*. 2018 Apr 11;4(4):278-281.
86. Waters HH, Seth R, Hoschar AP, Benninger MS. Does HPV have a presence in diffuse high grade pre-malignant lesions of the larynx? *Laryngoscope*. 2010;120 Suppl 4:S201.
87. Pagliuca G, Martellucci S, Degener AM, Pierangeli A, Greco A, Fusconi M, et al. Role of Human Papillomavirus in the Pathogenesis of Laryngeal Dysplasia. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2014 Jun;150(6):1018-23.
88. van Balkum M, Buijs B, Donselaar EJ, Erkelens DC, Goulin Lippi Fernandes E, Wegner I, Grolman W, Janssen LM. Systematic review of the diagnostic value of laryngeal stroboscopy in excluding early glottic carcinoma. *Clin Otolaryngol*. 2017 Feb;42(1):123-130.
89. Hellquist H, Ferlito A, Mäkitie AA, Thompson LDR, Bishop JA, Agaimy A, Hernandez-Prera JC, Gnepp DR, Willems SM, Slootweg PJ, Rinaldo A. Developing Classifications of Laryngeal Dysplasia: The Historical Basis. *Adv Ther*. 2020 Jun;37(6):2667-2677.
90. Kambic V, Lenart I. Notre classification des hyperplasies de l'épithélium du larynx au point de vue pronostic [Our classification of hyperplasia of the laryngeal epithelium from the prognostic point of view]. *J Fr Otorhinolaryngol Audiophonol Chir Maxillofac (1967)*. 1971 Dec 20;20(10):1145-50.
91. Kurita T, Chitose SI, Sato K, Sakazaki T, Fukahori M, Sueyoshi S, Umeno H. Pathological mechanisms of laryngeal papillomatosis based on laryngeal epithelial characteristics. *Laryngoscope Invest Otolaryngol*. 2019 Jan 7;4(1):89-94.
92. Fleskens SA, Bergshoeff VE, Voogd AC, van Velthuysen ML, Bot FJ, Speel EJ, Kremer B, Takes R, Slootweg P. Interobserver variability of laryngeal mucosal premalignant lesions: a histopathological evaluation. *Mod Pathol*. 2011 Jul;24(7):892-8.
93. Thompson LD. Laryngeal Dysplasia, Squamous Cell Carcinoma, and Variants. *Surg Pathol Clin*. 2017 Mar;10(1):15-33.
94. Wenig BM. Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: dysplasia and select variants. *Mod Pathol*. 2017 Jan;30(s1):S112-S118.
95. Mehlum CS, Larsen SR, Kiss K, Groentved AM, Kjaergaard T, Möller S, Godballe C. Laryngeal precursor lesions: Interrater and intrarater reliability of histopathological assessment. *Laryngoscope*. 2018 Oct;128(10):2375-2379.
96. Cho KJ, Song JS. Recent Changes of Classification for Squamous Intraepithelial Lesions of the Head and Neck. *Arch Pathol Lab Med*. 2018 Jul;142(7):829-832.
97. Is p16 immunohistochemistry a reliable surrogate marker? *Br J Cancer*. 2013 Mar 19;108(5):1157-62.
98. Nankivell P, Weller M, McConkey C, Paleri V, Mehanna H. Biomarkers in laryngeal dysplasia: a systematic review. *Head Neck*. 2011 Aug;33(8):1170-6.

99. Rodrigo JP, Villaronga MÁ, Menéndez ST, Hermida-Prado F, Quer M, Vilaseca I, Allonca E, Pedregal Mallo D, Astudillo A, García-Pedrero JM. A Novel Role For Nanog As An Early Cancer Risk Marker In Patients With Laryngeal Precancerous Lesions. *Sci Rep.* 2017 Sep 11;7(1):11110.
100. Manterola L, Aguirre P, Larrea E, Arestín M, Gaafar A, Elorriaga K, Goicoechea I, Armesto M, Fernández-Mercado M, Zabalza I, López-Duque JC, Larruskain E, Sistiaga JA, Landa M, Zabala A, Santaolalla F, Municio JA, Ispizua Á, García-Pedrero JM, Rodrigo JP, Lawrie CH. Mutational profiling can identify laryngeal dysplasia at risk of progression to invasive carcinoma. *Sci Rep.* 2018 Apr 26;8(1):6613.
101. Barnes L. *Surgical pathology of head and neck.* Marcel Dekker: New York 2001.
102. Isenberg JS, Crozier DL, Dailey SH. Institutional and comprehensive review of laryngeal leukoplakia. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2008 Jan;117(1):74-9.
103. Karatayli-Ozgursoy S, Pacheco-Lopez P, Hillel AT, Best SR, Bishop JA, Akst LM. Laryngeal dysplasia, demographics, and treatment: a single-institution, 20-year review. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.* 2015 Apr;141(4):313-8.
104. Luers JC, Sircar K, Drebber U, Beutner D. The impact of laryngeal dysplasia on the development of laryngeal squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2014 Mar;271(3):539-45.
105. van Hulst AM, Kroon W, van der Linden ES, Nagtzaam L, Ottenhof SR, Wegner I, Gunning AC, Grolman W, Braunius W. Grade of dysplasia and malignant transformation in adults with premalignant laryngeal lesions. *Head Neck.* 2016 Apr;38 Suppl 1:E2284-90.
106. Eckel HE, Simo R, Quer M, Odell E, Paleri V, Klussmann JP, Remacle M, Sjögren E, Piazza C. European Laryngological Society position paper on laryngeal dysplasia Part II: diagnosis, treatment, and follow-up. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2021 Jun;278(6):1723-1732.
107. Gale N, Gnepp DR, Poljak M, Strojan P, Cardesa A, Helliwell T, Šifrer R, Volavšek M, Sandison A, Zidar N. Laryngeal Squamous Intraepithelial Lesions: An Updated Review on Etiology, Classification, Molecular Changes, and Treatment. *Adv Anat Pathol.* 2016 Mar;23(2):84-91.
108. Huang G, Luo M, Zhang J, Liu H. Laser surgery versus radiotherapy for T1a glottic carcinoma: a meta-analysis of oncologic outcomes. *Acta Otolaryngol.* 2017 Nov;137(11):1204-1209.
109. Cosway B, Paleri V. Laryngeal dysplasia: an evidence-based flowchart to guide management and follow up. *J Laryngol Otol.* 2015 Jun;129(6):598-9.
110. Lerner MZ, Mor N, Paek H, Blitzer A, Strome M. Metformin Prevents the Progression of Dysplastic Mucosa of the Head and Neck to Carcinoma in Nondiabetic Patients. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2017 Apr;126(4):340-343.
111. Al-Mamgani A, van Rooij PH, Mehilal R, Verduijn GM, Tans L, Kwa SL. Radiotherapy for T1a glottic cancer: the influence of smoking cessation and fractionation schedule of radiotherapy. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2014 Jan;271(1):125-32.
112. Sun Z, Sun X, Chen Z, Du J, Wu Y. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Risk Factors, Molecular Alterations, Immunology and Peptide Vaccines. *Int J Pept Res Ther.* 2022;28(1):19.
113. Jones TM, De M, Foran B, Harrington K, Mortimore S. Laryngeal cancer: United Kingdom National Multidisciplinary guidelines. *J Laryngol Otol.* 2016;130(S2):S75-S82.
114. Dombrowski ND, Wolter NE, Irace AL, Robson CD, Perez-Atayde AR, Mack JW, Rahbar R. Squamous cell carcinoma of the head and neck in children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2019 Feb;117:131-137.
115. Cattaruzza MS, Maisonneuve P, Boyle P. Epidemiology of laryngeal cancer. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1996 Sep;32B(5):293-305.

116. DeRienzo DP, Greenberg SD, Fraire AE. Carcinoma of the larynx. Changing incidence in women. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1991 Jun;117(6):681-4.
117. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 2016 Jan-Feb;66(1):7-30.
118. Rothman KJ, Cann CI, Flanders D, Fried MP. Epidemiology of laryngeal cancer. *Epidemiol Rev.* 1980;2:195-209.
119. Kuper H, Boffetta P, Adami HO. Tobacco use and cancer causation: association by tumour type. *J Intern Med.* 2002 Sep;252(3):206-24.
120. Bosetti C, Gallus S, Franceschi S, Levi F, Bertuzzi M, Negri E, Talamini R, La Vecchia C. Cancer of the larynx in non-smoking alcohol drinkers and in non-drinking tobacco smokers. *Br J Cancer.* 2002 Aug 27;87(5):516-8.
121. Stell PM, McGill T. Asbestos and laryngeal carcinoma. *Lancet.* 1973 Aug 25;2(7826):416-7.
122. Paget-Bailly S, Cyr D, Luce D. Occupational exposures and cancer of the larynx-systematic review and meta-analysis. *J Occup Environ Med.* 2012 Jan;54(1):71-84.
123. Di Maso M, Talamini R, Bosetti C, Montella M, Zucchetto A, Libra M, Negri E, Levi F, La Vecchia C, Franceschi S, Serraino D, Polesel J. Red meat and cancer risk in a network of case-control studies focusing on cooking practices. *Ann Oncol.* 2013 Dec;24(12):3107-12..
124. Garavello W, Lucenteforte E, Bosetti C, Talamini R, Levi F, Tavani A, Franceschi S, Negri E, La Vecchia C. Diet diversity and the risk of laryngeal cancer: a case-control study from Italy and Switzerland. *Oral Oncol.* 2009 Jan;45(1):85-9.
125. Gama RR, Carvalho AL, Longatto Filho A, Scorsato AP, López RV, Rautava J, Syrjänen S, Syrjänen K. Detection of human papillomavirus in laryngeal squamous cell carcinoma: Systematic review and meta-analysis. *Laryngoscope.* 2016 Apr;126(4):885-93.
126. Chernock RD, Wang X, Gao G, Lewis JS Jr, Zhang Q, Thorstad WL, El-Mofty SK. Detection and significance of human papillomavirus, CDKN2A(p16) and CDKN1A(p21) expression in squamous cell carcinoma of the larynx. *Mod Pathol.* 2013 Feb;26(2):223-31.
127. Young RJ, Urban D, Angel C, Corry J, Lyons B, Vallance N, Kleid S, Iseli TA, Solomon B, Rischin D. Frequency and prognostic significance of p16(INK4A) protein overexpression and transcriptionally active human papillomavirus infection in laryngeal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2015 Mar 17;112(6):1098-104.
128. Nikolaos S Mastronikolis, Theodoros A Papadas, Panos D Goumas, Irene-Eva Triantaphyllidou, Dimitrios A Theocharis, Nikoletta Papageorgakopoulou, Demitrios H Vynios. Head and Neck: Laryngeal tumors: an overview *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* 2008-12-01.
129. Michaels L, Hellquist H (2001). *Ear, Nose and Throat Histopathology.* 2nd ed. Springer Verlag: Berlin.
130. A Cardesa, PJ. Slootweg: *Pathology of the Head and Neck* (2nd edition). Springer Berlin, Heidelberg 2017.
131. Mallofré C, Cardesa A, Campo E, et al. Expression of cytokeratins in squamous cell carcinomas of the larynx: immunohistochemical analysis and correlation with prognostic factors. *Pathol Res Pract.* 1993;189(3):275-282.
132. Bai Y, Shao Y, Li H, Xue W, Quan F, Wu S. Ki-67 is overexpressed in human laryngeal carcinoma and contributes to the proliferation of HEP2 cells. *Oncol Lett.* 2016;12(4):2641-2647.
133. Bradford CR, Kumar B, Bellile E, et al. Biomarkers in advanced larynx cancer. *Laryngoscope.* 2014;124(1):179-187.

134. Cohen-Kerem R, Madah W, Sabo E, Rahat MA, Greenberg E, Elmalah I. Cytokeratin-17 as a potential marker for squamous cell carcinoma of the larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2004 Oct;113(10):821-7.
135. Bryne M, Jenssen N, Boysen M. Histological grading in the deep invasive front of T1 and T2 glottic squamous cell carcinomas has high prognostic value. *Virchows Arch*. 1995;427(3):277-281.
136. Bryne M. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication?. *Oral Dis*. 1998;4(2):70-77. doi:10.1111/j.1601-0825.1998.tb00260.x.
137. Carter RL, Barr LC, O'Brien CJ, Soo KC, Shaw HJ. Transcapsular spread of metastatic squamous cell carcinoma from cervical lymph nodes. *Am J Surg*. 1985;150(4):495-499.
138. Beibei Y, Rong Y, Yunfei Y, Wenchao Z. Research Progress Regarding Surgical Margins, Molecular Margins, and Prognosis of Laryngeal Carcinoma. *Ear Nose Throat J*. 2021;100(8):597-603.
139. Huang SH, O'Sullivan B. Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2017;18(7):40. doi:10.1007/s11864-017-0484-y.
140. Raitiola H, Pukander J, Laippala P. Glottic and supraglottic laryngeal carcinoma: differences in epidemiology, clinical characteristics and prognosis. *Acta Otolaryngol*. 1999;119(7):847-851.
141. Allegra E, Bianco MR, Ralli M, Greco A, Angeletti D, de Vincentiis M. Role of Clinical-Demographic Data in Survival Rates of Advanced Laryngeal Cancer. *Medicina (Kaunas)*. 2021;57(3):267.
142. Chiesa F, Mauri S, Tradati N, et al. Surfing prognostic factors in head and neck cancer at the millennium. *Oral Oncol*. 1999;35(6):590-596. doi:10.1016/s1368-8375(99)00043-3.
143. Hu M, Ampil F, Clark C, Sonavane K, Caldito G, Nathan CA. Comorbid predictors of poor response to chemoradiotherapy for laryngeal squamous cell carcinoma. *Laryngoscope*. 2012;122(3):565-571.
144. Mayne ST, Cartmel B, Kirsh V, Goodwin Jr WJ. Alcohol and tobacco use prediagnosis and postdiagnosis, and survival in a cohort of patients with early stage cancers of the oral cavity, pharynx, and larynx. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18(12):3368-74.
145. Cohen JI, Clayman GL. Unit IV: laryngopharyngeal operations. In: *Atlas of head & neck surgery*. Philadelphia: Elsevier; 2011.
146. Watkinson J.C., Clarke R. et al *Scott-Brown's Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery*, 7th edn. Vol 3. CRC press: London 2018.
147. Warner L, Chudasama J, Kelly CG, Loughran S, McKenzie K, Wight R, Dey P. Radiotherapy versus open surgery versus endolaryngeal surgery (with or without laser) for early laryngeal squamous cell cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014 Dec 12;2014(12):CD002027.
148. Aaltonen LM, Rautiainen N, Sellman J, Saarilahti K, Mäkitie A, Rihkanen H, Laranne J, Kleemola L, Wigren T, Sala E, Lindholm P, Grenman R, Joensuu H. Voice quality after treatment of early vocal cord cancer: a randomized trial comparing laser surgery with radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2014 Oct 1;90(2):255-60.
149. Misono S, Marmor S, Yueh B, Virnig BA. Treatment and survival in 10,429 patients with localized laryngeal cancer: a population-based analysis. *Cancer*. 2014 Jun 15;120(12):1810-7.
150. Laccourreye O, Malinvaud D, Ménard M, Consoli S, Giraud P, Bonfils P. Otorhinolaryngologists' personal treatment preferences (total laryngectomy or laryngeal preservation) when faced with advanced stage laryngeal cancer. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*. 2014 Dec;131(6):339-343.
151. Laccourreye O, Malinvaud D, Ménard M, Consoli S, Giraud P, Bonfils P. Total laryngectomy or laryngeal preservation for advanced laryngeal cancer. Impact of the functional risk upon the patient's preferences. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*. 2014 Apr;131(2):93-7.

152. Jacob JT, Coulombe PA, Kwan R, Omary MB. Types I and II Keratin Intermediate Filaments. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018 Apr 2;10(4):a018275.
153. Szeverenyi I, Cassidy AJ, Chung CW, Lee BT, Common JE, Ogg SC, Chen H, Sim SY, Goh WL, Ng KW, Simpson JA, Chee LL, Eng GH, Li B, Lunny DP, Chuon D, Venkatesh A, Khoo KH, McLean WH, Lim YP, Lane EB. The Human Intermediate Filament Database: comprehensive information on a gene family involved in many human diseases. *Hum Mutat.* 2008 Mar;29(3):351-60.
154. Moll R, Divo M, Langbein L. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol.* 2008 Jun;129(6):705-33.
155. Vaidya M, Dmello C, Mogre S. Utility of Keratins as Biomarkers for Human Oral Precancer and Cancer. *Life (Basel).* 2022 Feb 25;12(3):343. doi: 10.3390/life12030343.
156. Owens DW, Lane EB. Keratin mutations and intestinal pathology. *J Pathol.* 2004 Nov;204(4):377-85.
157. Jackson BW, Grund C, Schmid E, Bürki K, Franke WW, Illmensee K. Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. Intermediate filaments of the cytokeratin type and desmosomes in preimplantation embryos. *Differentiation.* 1980;17(3):161-79.
158. Moll R. Cytokeratine als Differenzierungsmarker. Expressionsprofile von Epithelien und epithelialen Tumoren [Cytokeratins as markers of differentiation. Expression profiles in epithelia and epithelial tumors]. *Veroff Pathol.* 1993;142:1-197.
159. Gould VE, Bloom KJ, Franke WW, Warren WH, Moll R. Increased numbers of cytokeratin-positive interstitial reticulum cells (CIRC) in reactive, inflammatory and neoplastic lymphadenopathies: hyperplasia or induced expression? *Virchows Arch.* 1995;425(6):617-29.
160. Magin TM, Vijayaraj P, Leube RE. Structural and regulatory functions of keratins. *Exp Cell Res.* 2007 Jun 10;313(10):2021-32.
161. Ku NO, Omary MB. A disease- and phosphorylation-related nonmechanical function for keratin 8. *J Cell Biol.* 2006 Jul 3;174(1):115-25.
162. Jaquemar D, Kupriyanov S, Wankell M, Avis J, Benirschke K, Baribault H, Oshima RG. Keratin 8 protection of placental barrier function. *J Cell Biol.* 2003 May 26;161(4):749-56.
163. Ku NO, Soetikno RM, Omary MB. Keratin mutation in transgenic mice predisposes to Fas but not TNF-induced apoptosis and massive liver injury. *Hepatology.* 2003 May;37(5):1006-14.
164. Cohen-Kerem R, Lahat N, Elmalah I, Greenberg E, Resnick MB, Doweck I, Rahat MA. Detection of cytokeratins in normal and malignant laryngeal epithelia by means of reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2002 Feb;111(2):149-54.
165. Safadi RA, Abdullah NI, Alaaraj RF, Bader DH, Divakar DD, Hamasha AA, Sughayer MA. Clinical and histopathologic prognostic implications of the expression of cytokeratins 8, 10, 13, 14, 16, 18 and 19 in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Arch Oral Biol.* 2019 Mar;99:1-8.
166. Carrilho C, Alberto M, Buane L, David L. Keratins 8, 10, 13, and 17 are useful markers in the diagnosis of human cervix carcinomas. *Hum Pathol.* 2004 May;35(5):546-51.
167. van der Velden LA, Schaafsma HE, Manni JJ, Link M, Ruiter DJ, Ramaekers FC, Kuijpers W. Cytokeratin and vimentin expression in normal epithelium and benign lesions of the vocal cords. *Acta Otolaryngol.* 1996 Mar;116(2):325-31.
168. Caporali S, Didona B, Paradisi M, Mauriello A, Campione E, Falconi M, Iacovelli F, Minieri M, Pieri M, Bernardini S, Terrinoni A. Post Zygotic, Somatic, Deletion in KERATIN 1 V1 Domain Generates Structural Alteration of the K1/K10 Dimer, Producing a Monolateral Palmar Epidermolytic Nevus. *Int J Mol Sci.* 2021 Jun 27;22(13):6901.

169. Garcia NG, Oliveira DT, Lauris JR, Domingues MA, Minicucci EM, Soares CT. Loss of cytokeratin 10 indicates malignant transformation in actinic cheilitis. *Clin Oral Investig*. 2016 May;20(4):745-52.
170. Westin M, Rekabdar E, Blomstrand L, Klintberg P, Jontell M, Robledo-Sierra J. Mutations in the genes for keratin-4 and keratin-13 in Swedish patients with white sponge nevus. *J Oral Pathol Med*. 2018 Feb;47(2):152-157.
171. Simonson L, Vold S, Mowers C, Massey RJ, Ong IM, Longley BJ, Chang H. Keratin 13 deficiency causes white sponge nevus in mice. *Dev Biol*. 2020 Dec 1;468(1-2):146-153. doi: 10.1016/j.ydbio.2020.07.016. Epub 2020 Aug 3.
172. Chu C, Geng Y, Zhou Y, Sicinski P. Cyclin E in normal physiology and disease states. *Trends Cell Biol*. 2021 Sep;31(9):732-746.
173. He G, Fu WN, Qiu GB, Zhao Z, Xu ZM, Sun XH, Sun KL. [Studies of the deletion and expression of cytokeratin 13 gene in laryngeal squamous cell carcinoma]. *Yi Chuan Xue Bao*. 2002 May;29(5):390-5. Chinese.
174. Schaaij-Visser TB, Bremmer JF, Braakhuis BJ, Heck AJ, Slijper M, van der Waal I, Brakenhoff RH. Evaluation of cornulin, keratin 4, keratin 13 expression and grade of dysplasia for predicting malignant progression of oral leukoplakia. *Oral Oncol*. 2010 Feb;46(2):123-7.
175. Yagyuu T, Obayashi C, Ueyama Y, Takano M, Tanaka Y, Kawaguchi M, Takeda M, Kasai T, Kirita T. Multivariate analyses of Ki-67, cytokeratin 13 and cytokeratin 17 in diagnosis and prognosis of oral precancerous lesions. *J Oral Pathol Med*. 2015 Aug;44(7):523-31.
176. Sakamoto K, Aragaki T, Morita K, Kawachi H, Kayamori K, Nakanishi S, Omura K, Miki Y, Okada N, Katsube K, Takizawa T, Yamaguchi A. Down-regulation of keratin 4 and keratin 13 expression in oral squamous cell carcinoma and epithelial dysplasia: a clue for histopathogenesis. *Histopathology*. 2011 Mar;58(4):531-42.
177. Naganuma K, Hatta M, Ikebe T, Yamazaki J. Epigenetic alterations of the keratin 13 gene in oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2014 Dec 20;14:988.
178. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*. 1982 Nov;31(1):11-24.
179. Paladini RD, Takahashi K, Bravo NS, Coulombe PA. Onset of re-epithelialization after skin injury correlates with a reorganization of keratin filaments in wound edge keratinocytes: defining a potential role for keratin 16. *J Cell Biol*. 1996 Feb;132(3):381-97.
180. Lauer G, Wiedmann-Al-Ahmad M, Otten JE, Hübner U. Immunohistochemical study during healing of free palatal mucosa grafts on plastic-embedded samples. *J Oral Pathol Med*. 2001 Feb;30(2):104-12.
181. Hobbs RP, DePianto DJ, Jacob JT, Han MC, Chung BM, Batazzi AS, Poll BG, Guo Y, Han J, Ong S, Zheng W, Taube JM, Čiháková D, Wan F, Coulombe PA. Keratin-dependent regulation of Aire and gene expression in skin tumor keratinocytes. *Nat Genet*. 2015 Aug;47(8):933-8.
182. Yang L, Jin L, Ke Y, Fan X, Zhang T, Zhang C, Bian H, Wang G. E3 Ligase Trim21 Ubiquitylates and Stabilizes Keratin 17 to Induce STAT3 Activation in Psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2018 Dec;138(12):2568-2577.
183. Kim S, Wong P, Coulombe PA. A keratin cytoskeletal protein regulates protein synthesis and epithelial cell growth. *Nature*. 2006 May 18;441(7091):362-5.
184. Hobbs RP, Jacob JT, Coulombe PA. Keratins Are Going Nuclear. *Dev Cell*. 2016 Aug 8;38(3):227-33.

185. Chung BM, Arutyunov A, Ilagan E, Yao N, Wills-Karp M, Coulombe PA. Regulation of C-X-C chemokine gene expression by keratin 17 and hnRNP K in skin tumor keratinocytes. *J Cell Biol.* 2015 Mar 2;208(5):613-27.
186. Escobar-Hoyos LF, Shah R, Roa-Peña L, Vanner EA, Najafian N, Banach A, Nielsen E, Al-Khalil R, Akalin A, Talmage D, Shroyer KR. Keratin-17 Promotes p27KIP1 Nuclear Export and Degradation and Offers Potential Prognostic Utility. *Cancer Res.* 2015 Sep 1;75(17):3650-62.
187. Yan X, Yang C, Hu W, Chen T, Wang Q, Pan F, Qiu B, Tang B. Knockdown of KRT17 decreases osteosarcoma cell proliferation and the Warburg effect via the AKT/mTOR/HIF1 α pathway. *Oncol Rep.* 2020 Jul;44(1):103-114.
188. Liu Z, Yu S, Ye S, Shen Z, Gao L, Han Z, Zhang P, Luo F, Chen S, Kang M. Keratin 17 activates AKT signalling and induces epithelial-mesenchymal transition in oesophageal squamous cell carcinoma. *J Proteomics.* 2020 Jan 16;211:103557.
189. Zhang H, Zhang Y, Xia T, Lu L, Luo M, Chen Y, Liu Y, Li Y. The Role of Keratin17 in Human Tumours. *Front Cell Dev Biol.* 2022 Feb 24;10:818416.
190. Kitamura R, Toyoshima T, Tanaka H, Kawano S, Matsubara R, Goto Y, Jinno T, Maruse Y, Oobu K, Nakamura S. Cytokeratin 17 mRNA as a prognostic marker of oral squamous cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2017 Dec;14(6):6735-6743. doi: 10.3892/ol.2017.7066.
191. Mikami T, Cheng J, Maruyama S, Kobayashi T, Funayama A, Yamazaki M, Adeola HA, Wu L, Shingaki S, Saito C, Saku T. Emergence of keratin 17 vs. loss of keratin 13: their reciprocal immunohistochemical profiles in oral carcinoma in situ. *Oral Oncol.* 2011 Jun;47(6):497-503.
192. Regenbogen E, Mo M, Romeiser J, Shroyer ALW, Escobar-Hoyos LF, Burke S, Shroyer KR. Elevated expression of keratin 17 in oropharyngeal squamous cell carcinoma is associated with decreased survival. *Head Neck.* 2018 Aug;40(8):1788-1798.
193. Lan YJ, Chen H, Chen JQ, Lei QH, Zheng M, Shao ZR. Immunolocalization of vimentin, keratin 17, Ki-67, involucrin, β -catenin and E-cadherin in cutaneous squamous cell carcinoma. *Pathol Oncol Res.* 2014 Apr;20(2):263-6.
194. Escobar-Hoyos LF, Yang J, Zhu J, Cavallo JA, Zhai H, Burke S, Koller A, Chen EI, Shroyer KR. Keratin 17 in premalignant and malignant squamous lesions of the cervix: proteomic discovery and immunohistochemical validation as a diagnostic and prognostic biomarker. *Mod Pathol.* 2014 Apr;27(4):621-30.
195. Chalooob MK, Hussein AG, Qasim BJ. Correlation of P16 (Ink4a) and CK17 to HPV (16E6+18E6) in Premalignant and Malignant Lesions of Uterine Cervix: A Clinicopathologic Study. *Iran J Pathol.* 2016 Fall;11(4):377-390.
196. Wang YF, Lang HY, Yuan J, Wang J, Wang R, Zhang XH, Zhang J, Zhao T, Li YR, Liu JY, Zeng LH, Guo GZ. Overexpression of keratin 17 is associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer. *Tumour Biol.* 2013 Jun;34(3):1685-9.
197. Liu J, Liu L, Cao L, Wen Q. Keratin 17 Promotes Lung Adenocarcinoma Progression by Enhancing Cell Proliferation and Invasion. *Med Sci Monit.* 2018 Jul 11;24:4782-4790.
198. Chen P, Shen Z, Fang X, Wang G, Wang X, Wang J, Xi S. Silencing of keratin 17 by lentivirus-mediated short hairpin RNA inhibits the proliferation of PANC-1 human pancreatic cancer cells. *Oncol Lett.* 2020 May;19(5):3531-3541.
199. Kim K, Lee HW, Chae SW, Kim DH, Do IG, Lee HJ, Do SI, Min KW, Pyo JS, Shin JH, Sohn JH. Cytokeratin 17 Expression is Associated With Poor Prognosis in Gallbladder Adenocarcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2017 May/June;25(5):346-350.
200. Haye K, Babu S, Oblein L, Gupta R, Akalin A, Escobar-Hoyos LF, Shroyer KR. Keratin 17 Expression Predicts Poor Clinical Outcome in Patients With Advanced Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2021 Feb 1;29(2):144-151.

201. Wei L, Sun J, Zhang N, Zheng Y, Wang X, Lv L, Liu J, Xu Y, Shen Y, Yang M. Noncoding RNAs in gastric cancer: implications for drug resistance. *Mol Cancer*. 2020 Mar 19;19(1):62.
202. Ujiiie D, Okayama H, Saito K, Ashizawa M, Thar Min AK, Endo E, Kase K, Yamada L, Kikuchi T, Hanayama H, Fujita S, Sakamoto W, Endo H, Saito M, Mimura K, Saze Z, Momma T, Ohki S, Kono K. KRT17 as a prognostic biomarker for stage II colorectal cancer. *Carcinogenesis*. 2020 Jul 10;41(5):591-599.
203. van der Velden LA, Schaafsma HE, Manni JJ, Ruiter DJ, Ramaekers FC, Kuijpers W. Cytokeratin and vimentin expression in normal epithelium and squamous cell carcinomas of the larynx. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 1997;254(8):376-83.
204. Farrukh S, Syed S, Pervez S. Differential Expression of Cytokeratin 13 in Non-Neoplastic, Dysplastic and Neoplastic Oral Mucosa in a High Risk Pakistani Population. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(13):5489-92.
205. Wils LJ, Poell JB, Evren I, Koopman MS, Brouns EREA, de Visscher JGAM, Brakenhoff RH, Bloemena E. Incorporation of differentiated dysplasia improves prediction of oral leukoplakia at increased risk of malignant progression. *Mod Pathol*. 2020 Jun;33(6):1033-1040.
206. Yamashina M, Sato K, Tonogi M, Tanaka Y, Yamane GY, Katakura A. Evaluation of superficial oral squamous cell malignancy based on morphometry and immunoexpression of cytokeratin 13 and cytokeratin 17. *Acta Cytol*. 2014;58(1):67-75.
207. Matsuhira A, Noguchi S, Sato K, et al. Cytokeratin 13, Cytokeratin 17, Ki-67 and p53 Expression in Upper Layers of Epithelial Dysplasia Surrounding Tongue Squamous Cell Carcinoma. *Bull Tokyo Dent Coll*. 2015;56(4):223-231.
208. Sanguansin S, Kosanwat T, Juengsomjit R, Poomsawat S. Diagnostic Value of Cytokeratin 17 during Oral Carcinogenesis: An Immunohistochemical Study. *Int J Dent*. 2021;2021:4089549. Published 2021 Nov 22.
209. Wei KJ, Zhang L, Yang X, et al. Overexpression of cytokeratin 17 protein in oral squamous cell carcinoma in vitro and in vivo. *Oral Dis*. 2009;15(1):111-117.
210. Xu ES, Yang MH, Liu CY, et al. Decreasing cytokeratin 17 expression in head and neck cancer predicts nodal metastasis and poor prognosis: The first evidence. *Clin Otolaryngol*. 2018;43(4):1010-1018.
211. Maddox P, Sasieni P, Szarewski A, Anderson M, Hanby A. Differential expression of keratins 10, 17, and 19 in normal cervical epithelium, cervical intraepithelial neoplasia, and cervical carcinoma. *J Clin Pathol*. 1999;52(1):41-46.
212. Martens J, Baars J, Smedts F, Holterheus M, Kok MJ, Vooijs P, Ramaekers F. Can keratin 8 and 17 immunohistochemistry be of diagnostic value in cervical cytology? A feasibility study. *Cancer*. 1999 Apr 25;87(2):87-92.
213. Fernandez-Flores A. Cytokeratin 17 immunoexpression in actinic keratosis (bowenoid and nonbowenoid) and in Bowen disease. *Ann Diagn Pathol*. 2016 Feb;20:1-6.
214. Maryam Nazir Kiani, Muhammad Asif, Fakeha Meraj Ansari, Nighat Ara, Muhammad Ishaque, Amna Riaz Khan. Diagnostic utility of Cytokeratin 13 and Cytokeratin 17 in Oral Epithelial Dysplasia and Oral Squamous Cell Carcinoma, *Asian Pac J Cancer Biol*. 2020;Jul:153–158.
215. Podoll MB, Singh N, Gilks CB, Moghadamfalahi M, Sanders MA. Assessment of CK17 as a Marker for the Diagnosis of Differentiated Vulvar Intraepithelial Neoplasia. *Int J Gynecol Pathol*. 2017;36(3):273-280.
216. Zhang J, Fang H, Wang R, Dang E, Jiang M, Wang G. Effect of Calcipotriol on IFN- γ -Induced Keratin 17 Expression in Immortalized Human Epidermal Keratinocyte Cells. *Med Sci Monit*. 2017 Dec 22;23:6049-6056.

217. Jin L, Wang G. Keratin 17: a critical player in the pathogenesis of psoriasis. *Med Res Rev.* 2014 Mar;34(2):438-54.
218. Welham NV, Lim X, Tateya I, Bless DM. Inflammatory factor profiles one hour following vocal fold injury. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2008 Feb;117(2):145-52.
219. Uhlig R, Abboud M, Gorbokon N, Lennartz M, Dwertmann Rico S, Kind S, et al. Cytokeratin 10 (CK10) expression in cancer: A tissue microarray study on 11,021 tumors. *Ann Diagn Pathol.* 2022 Oct;60:152029.
220. Shirakawa Y, Naomoto Y, Kimura M, Kawashima R, Yamatsuji T, Tamaki T, Hamada M, Haisa M, Tanaka N. Topological analysis of p21WAF1/CIP1 expression in esophageal squamous dysplasia. *Clin Cancer Res.* 2000 Feb;6(2):541-50.
221. Kobayashi T, Maruyama S, Abé T, Cheng J, Takagi R, Saito C, Saku T. Keratin 10-positive orthokeratotic dysplasia: a new leucoplakia-type precancerous entity of the oral mucosa. *Histopathology.* 2012 Nov;61(5):910-20. doi: 10.1111/j.1365-2559.2012.04283.x.
222. Almadori G, Bussu F, Paludetti G. Predictive factors of neck metastases in laryngeal squamous cell carcinoma. Towards an integrated clinico-molecular classification. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2006 Dec;26(6):326-34.
223. Nazarian RM, Primiani A, Doyle LA, Linskey KR, Duncan LM, Odze RD, Zukerberg LR. Cytokeratin 17: an adjunctive marker of invasion in squamous neoplastic lesions of the anus. *Am J Surg Pathol.* 2014 Jan;38(1):78-85.

REFERECE IZ DOKTORSKE TEZE

1. Boricic N, Boricic I, Soldatovic I, Milovanovic J, Trivic A, Terzic T. Utility of CK8, CK10, CK13, and CK17 in Differential Diagnostics of Benign Lesions, Laryngeal Dysplasia, and Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Diagnostics (Basel)*. 2022 Dec 16;12(12):3203.
2. Boricic N. Terzić T. Displazije larinksa, savremeno shvatanje. *MedPodml* 2023, Vol 74. DOI 10.5937/mp74-41084. Ahead of print.

Biografija kandidata

Novica Boričić, je rođen 29.08.1981. godine u Beogradu. Upisao je Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu 2000.godine. Diplomirao je 2008. godine sa prosečnom ocenom tokom studiranja 9.54. Od 2009-2010. učestvovao u projektu Ministarstva nauke i tehnologije RS br. 145026. Od 2011. učestvuje u projektu Ministarstva nauke i tehnologije RS br.145026. Od maja 2013.godine je zaposlen na Institutu za patologiju „dr Đorđe Joannović“ Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Specijalističke studije iz oblasti patologije je upisao u aprilu 2014.godine na Medicinskom fakultetu u Beogradu, a završni specijalistički ispiti položio sa odličnim uspehom u januaru 2019. Doktorske studije na smeru „Biologija tumora i oksidativnih oboljenja“ upisao je 2017.godine na Medicinskom fakultetu u Beogradu, pod mentorstvom prof.dr Tatjane Terzić.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора _____ Др Новица Боричић _____

Број индекса _____ ММ-2017 5181 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

ДИЈАГНОСТИЧКИ ЗНАЧАЈ ЕКСПРЕСИЈЕ ЦИТОКЕРАТИНА ВИСОКЕ МОЛЕКУЛАРНЕ ТЕЖИНЕ И НИСКЕ МОЛЕКУЛАРНЕ ТЕЖИНЕ У СКВАМОЦЕЛУЛАРНОМ КАРЦИНОМУ ЛАРИНКСА И БЕНИГНИМ ЛЕЗИЈАМА ЛАРИНКСА

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 31.01.2023.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора др Новица Боричић

Број индекса ММ-2017 5181

Студијски програм Биологија тумора и оксидативна обољења

Наслов рада ДИЈАГНОСТИЧКИ ЗНАЧАЈ ЕКСПРЕСИЈЕ ЦИТОКЕРАТИНА ВИСОКЕ МОЛЕКУЛАРНЕ ТЕЖИНЕ И НИСКЕ МОЛЕКУЛАРНЕ ТЕЖИНЕ У СКВАМОЦЕЛУЛАРНОМ КАРЦИНОМУ ЛАРИНКСА И БЕНИГНИМ ЛЕЗИЈАМА ЛАРИНКСА

Ментори Проф. др Татјана Терзић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду

Потпис аутора

У Београду, 31.01.2023.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

ДИЈАГНОСТИЧКИ ЗНАЧАЈ ЕКСПРЕСИЈЕ ЦИТОКЕРАТИНА ВИСОКЕ МОЛЕКУЛАРНЕ ТЕЖИНЕ И НИСКЕ МОЛЕКУЛАРНЕ ТЕЖИНЕ У СКВАМОЦЕЛУЛАРНОМ КАРЦИНОМУ ЛАРИНКСА И БЕНИГНИМ ЛЕЗИЈАМА ЛАРИНКСА која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA) (Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 31.01.2023.

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.