

## Prawdopodobieństwo niepowodzenia leczenia u chorych z zaawansowanym rakiem krtani

### Probability of treatment failure in patients with advanced cancer of the larynx

WIESŁAW DOBRÓŚ<sup>1/</sup>, JANUSZ RYŚ<sup>2/</sup>, ANNA KRUCZAK<sup>2/</sup>, KRZYSZTOF GIL<sup>3/</sup>, KRYSZYNA STANISZ-WALLIS<sup>4/</sup>

<sup>1/</sup> Oddział Otolaryngologii Szpitala Wojewódzkiego w Tarnowie, ul. Lwowska 178A, 33-100 Tarnów

<sup>2/</sup> Zakład Patologii Nowotworów Krakowskiego Oddziału Centrum Onkologii, Kraków, ul. Garncarska 11

<sup>3/</sup> Zakład Patofizjologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, ul. Grzegórzecka 16

<sup>4/</sup> Zakład Biostatystyki i Informatyki Medycznej Collegium Medicum, Kraków, ul. Kopernika 17

**Wprowadzenie.** Poszukiwane są czynniki o znaczeniu prognostycznym u chorych na raka krtani. Szczególne znaczenie mogą mieć parametry oceniające frakcję wzrostową guza.

**Cel.** Celem pracy było znalezienie czynników najsilniej wpływających na niepowodzenie leczenia chorych z zaawansowanym rakiem krtani oraz graficzna interpretacja wyników pozwalająca na przewidywanie przeżycia chorego.

**Materiał i metoda.** Badaniem objęto 90 chorych leczonych operacyjnie z powodu raka krtani w Klinice Otolaryngologii CM UJ w Krakowie. Okres obserwacji był nie krótszy niż 5 lat. Wielowymiarowej analizie statystycznej w modelu Coxa poddano czynniki kliniczne, histopatologiczne, ekspresję jądrowego antygenu proliferacyjnego – PCNA, wartości cytometrii przepływowej oraz wyniki morfometrycznej oceny jąder komórkowych. Na podstawie wyłonionych niezależnych czynników rokowniczych przedstawiono wzór szacujący prawdopodobieństwo niepowodzenia leczenia.

**Wyniki.** Wyłonione czynniki decydujące o gorszych wynikach leczenia to: obecność przerzutów w węzłach chłonnych ( $p=0,00001$ ), wysoki indeks PCNA ( $p=0,0006$ ), niski stopień zróżnicowania guza ( $p=0,008$ ), rozległość guza (guz obejmujący trzy piętra krtani i/lub przechodzący do gardła ( $p=0,033$ )) oraz duża zmienność pola jądra komórki ( $p=0,092$ ). Na ich podstawie opracowano wzór, w oparciu o który można obliczyć prawdopodobieństwo niepowodzenia leczenia nazwane Liczbowym Wskaźnikiem Prognostycznym (LWP). Przedstawiono krzywe przeżycia dla wybranych wartości LWP.

**Wnioski.** Obecność przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych jest najsilniejszym czynnikiem prognostycznym w raku krtani. Ocena frakcji wzrostowej guza wnosi dodatkową informację. Metody statystyczne pozwalają na graficzną interpretację wyników i przewidywanie niepowodzenia leczenia.

Otolaryngologia, 2003, 2(4), 167-172

**Słowa kluczowe:** jądrowy antygen proliferacyjny, kariometria, indeks proliferacyjny

**Introduction.** It is attempted to find prognostic factors in patients suffering from laryngeal cancer. Particular attention is paid to parameters enabling assessment of tumour growth fraction.

**Aim.** The study was designed to find factors exerting a major impact on treatment results in patients with advanced cancer of larynx, and to provide a graphic interpretation of the results which would enable predicting patients' life expectancy.

**Materials and methods.** A group of 90 patients who had undergone surgical treatment at the Department of Otolaryngology, Collegium Medicum, Jagiellonian University, Cracow, Poland were examined. The follow-up period was not shorter than 5 years. Multivariate analysis and the Cox proportional hazards regression model were used to assess the clinical and histopathological factors, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression, flow cytometry-assessed DNA content, and results of cell nuclei morphometric assay. The independent prognostic factors were used in the development of a formula to predict the probability of treatment failure.

**Results.** The presence of lymph node metastases ( $p=0.00001$ ), high PCNA index ( $p=0.0006$ ), poorly differentiated tumours ( $p=0.008$ ), tumour expanse (tumours involving three larynx levels and/or infiltrating pharynx,  $p=0.033$ ) and high variation of cell nuclear area ( $p=0.092$ ) were found to correlate with poorer treatment results. Accordingly, a formula was developed to predict treatment failure probability, named Numeric Prognostic Index (NPI). Survival curves are also presented for selected NPI values.

**Conclusions.** Presence of metastases in regional lymph nodes is the most important prognostic factor. The assessment of tumour growth fraction provides some additional information. The statistical methods allow for graphic interpretation of results and prediction of treatment failure.

Otolaryngologia, 2003, 2(4), 167-172

**Key words:** proliferating cell nuclear antigen, kariometry, proliferation index

Kliniczna ocena zaawansowania choroby nowotworowej i histopatologiczna ocena stopnia zróżnicowania guza to podstawowe czynniki decydujące o wyborze sposobu leczenia. Ciągłe trwają jednak poszukiwania cech biologicznych guza, które pozwoliłyby przewidzieć jego zachowanie i wyodrębnić chorych o wysokim ryzyku nie-

powodzenia leczenia. Celem obiektywizacji oceny materiału histologicznego wprowadzono ilościowe oceny złożoności histologicznej nowotworu. Znana jest metoda Jakobssona [1] uwzględniająca osiem cech morfologicznych. Uproszczoną odmianą tej metody jest morfologiczna ocena brzegu guza [2,3]. Dokonuje się tu oceny sposobu

i stadium naciekania, zróżnicowania komórek oraz jąder, liczby mitoz i nacieków limfocytów. Wysoka suma punktów ma świadczyć o dużej złośliwości histopatologicznej raka.

Jądrowy antygen proliferacyjny (*Proliferating Cell Nuclear Antigen* - PCNA) jest polipeptydem i przypisuje mu się rolę białka pomocniczego polimerazy delta. Jego ekspresja związana jest z cyklem komórkowym, może służyć jako marker proliferacji i czynnik prognostyczny niektórych nowotworów [4-6].

Podobne znaczenie w ocenie stopnia złośliwości nowotworu może mieć analiza DNA zawartego w jądrze komórkowym. Za pomocą cytometrii przepływowej można ocenić odsetek komórek poszczególnych faz cyklu życiowego. Wysoki odsetek fazy S oraz G2/M spotyka się częściej w guzach nowotworowych, jest on wyrazem szybkiego wzrostu i może łączyć się z gorszym rokowaniem [7].

Wprowadzenie komputerowej analizy obrazu jako metody badawczej pozwala dokonać oceny morfometrycznej jąder komórkowych. Najczęściej analizowane parametry planimetryczne jąder to ocena ich powierzchni, obwodu, przekątnej długiej i krótkiej, parametrów kształtu (okrągłości, stopnia wydłużenia). Mierzone są również parametry densytometryczne, takie jak gęstość optyczna i średnia jasność danej powierzchni. Parametry te mogą mieć znaczenie rokownicze [8,9].

Różna ocena wartości prognostycznej czynników klinicznych oraz dążenie do poszerzenia systemu TNM o dodatkowe informacje o chorym spowodowały, że podjęto próbę analizy cech klinicznych, histopatologicznych, frakcji wzrostowej guza i morfometrycznej oceny jąder komórek u chorych z zaawansowanym rakiem krtani celem wyłonienia najistotniejszych czynników mogących wpływać na wyniki leczenia. Analiza frakcji wzrostowej guza przeprowadzona została w oparciu o aktywność proliferacyjną wyrażoną liczbą komórek PCNA pozytywnych, ploidalność guza, odsetek komórek S-fazy i indeks proliferacyjny (S+G2/M). Za pomocą kariometrii oceniono polimorfizm jąder komórkowych oraz częściowo ich strukturę.

## MATERIAŁ I METODY

Badaniami objęto 90 chorych na raka krtani leczonych operacyjnie w Klinice Otolaryngologii CM UJ w Krakowie w latach 1987-1988. Wiek chorych wahał się od 36 do ponad 74 (średnia wieku 54 lata). Oceny zaawansowania choroby nowotworowej dokonano na podstawie systemu TNM wg UICC. W grupie badanych było 59 chorych z guzem o zaawansowaniu T3 oraz 31 pacjentów z guzem o zaawansowaniu T4. Dodatkowo chorych podzielono na dwie grupy w zależności od lokalizacji guza w zakresie krtani. Pierwsza grupa obejmowała

chorych z guzem zajmującym dwa piętra krtani natomiast grupa druga - chorych z guzem zajmującym trzy piętra i/lub naciekającym gardło. W badanej grupie nie było chorych z odległymi przerzutami. Węzły chłonne oceniono jako niebadalne u 50 chorych (N0), powiększone jednostronnie stwierdzono u 19 (N1) chorych, a obustronnie u 13 (N2). Pakiet przerzutowo zmienionych węzłów był obecny u 8 chorych (N3). U 52 chorych wykonano operacje całkowitego usunięcia krtani, a u 38 częściowego. U chorych wykonano 144 operacje radykalne zmodyfikowane i 10 operacji radykalnych układu chłonnego szyi. Histopatologicznie stwierdzono przerzuty w węzłach chłonnych u 26 chorych, natomiast u 64 przerzutów nie stwierdzono. Nie było chorych z odległymi przerzutami.

Do oceny histopatologicznej użyto preparatów barwionych hematoksylina i eozyną. Określono stopień zróżnicowania (G1=18, G2=52, G3=20 chorych) oraz oceniono morfologię brzegu guza (*Tumor Front Grading*). Metodą półilościową oceniono sześć cech, a każdej przyporządkowano punkty od 1 do 4. Oceniono zróżnicowanie komórek, polimorfizm jąder, sposób naciekania, stadium naciekania, nacieki limfocytów i liczbę figur podziału. Do badania immunohistochemicznego wykorzystano 5  $\mu$  skrawki sporządzone z bloczków parafinowych. Do wykrycia reakcji immunologicznej użyto kompleksu avidyna-biotyna sprzężonego z peroksydazą. Jako przeciwciała użyto mysie przeciwciała monoklonalne przeciw PCNA (Dako M 879). Oceniono odsetek pozytywnie wybarwionych jąder ustalając indeksy PCNA (niski 2-20%, średni 21-50% i wysoki 51-73% pozytywnie wybarwionych jąder).

Do oceny ploidalności guzów posłużono się materiałem zatopionym w parafinie przy użyciu metody cytofluorometrii przepływowej. Określono również odsetek komórek fazy S, G2/M oraz indeks proliferacyjny ( $IP = S + G2/M$ ).

Do badań morfometrycznych użyto również preparaty barwione hematoksylina i eozyną, które były analizowane pod powiększeniem 630x w mikroskopie Axio-phot sprzężonym z zestawem półautomatycznej komputerowej analizy obrazu. Wykorzystano program Vist (Vicom) oraz *Picture Analyser*. Analizowane były następujące parametry opisujące jądra komórek: pole, obwód, oś mała, oś duża, wskaźnik okrągłości, średnia jasność i gęstość optyczna jądra oraz zmienność danego parametru u poszczególnych chorych. Liczbowe wyniki otrzymano w pikselach i przeliczono je na mikrometry ( $\mu$ m). Szczegółowo metodykę przedstawiono we wcześniejszych pracach [10-12].

Analizy statystycznej dokonano w oparciu o program Statistica, wersja 5.0. Jako kryterium skuteczności leczenia przyjęto 5-letnie przeżycie bez objawów choroby. Prawdopodobieństwo przeżyć i niepowodzeń obliczono metodą Kaplana-Meiera, a różnice pomiędzy przebiegiem

krzywych porównano testem log-rank. Za poziom statystycznej istotności przyjęto  $p < 0,05$ . Dla czynników ilościowych bazę podzielono na grupy według mediany. Dodatkowo poszukiwano poziomów odcięcia dla ustalenia granicy danego czynnika wpływającej na przeżycie chorych (test log-rank i chi-kwadrat). Dla wszystkich czynników przeprowadzono statystykę wielowymiarową regresji Coxa, aby uzyskać współczynnik beta do obliczenia ryzyka względnego oraz aby wyłonić czynniki prognostyczne.

## WYNIKI

W dokonanej analizie stwierdzono wpływ na wyniki leczenia pojedynczych czynników. Gorzej rokowali chorzy w wieku powyżej 60 lat. Przeżyło ich 40% w porównaniu do 63,3% chorych w wieku równym lub poniżej 60 lat ( $p = 0,007$ ). Podobnie źle rokowali chorzy z guzami T4 w porównaniu do T3. Przeżyło ich odpowiednio 41,9% i 62,7% ( $p = 0,039$ ). Dla chorych z guzem zlokalizowanym w zakresie trzech pięter krtani i/lub przejściem do gardła uzyskano 32,0% 5-letnich przeżyć. Dla pozostałych (guz ograniczony do dwóch pięter krtani) uzyskano 64,6% przeżyć ( $p = 0,001$ ). Źle rokowała obecność przerzutów w węzłach. Przeżyło odpowiednio 67,1% i 26,9% chorych bez i z przerzutami w węzłach ( $p < 0,001$ ).

Na rokowanie miał wpływ również stopień zróżnicowania guza. Gorzej rokowali chorzy z guzami nisko zróżnicowanymi w porównaniu do chorych z guzami średnio i wysoko zróżnicowanymi (przeżyło odpowiednio 25,0%, 63,4% i 66,7%,  $p = 0,006$ ). W ocenie brzegu guza czynnikiem rokowniczym był sposób naciekania. Przeżyło odpowiednio 65,5% i 37,5% chorych z guzem o wyraźnej granicy (punkty 1 i 2, typ wzrostu rozprężający) i jej braku (punkty 3 i 4, typ wzrostu naciekający). W sumacyjnej ocenie punktowej liczba punktów równa lub większa niż 15 rokowała źle (przeżyło 44,8%). Lepsze wyniki leczenia uzyskano dla chorych o punktacji niższej niż 15 (przeżyło 68,3%,  $p = 0,026$ ).

Ustalono trzy indeksy PCNA o znaczeniu rokowniczym: niski (2-20%), średni (21-50%) i wysoki (51-73%). Uzyskano dla nich odpowiednio 78,8%, 52,9% i 26,1% przeżyć 5-letnich ( $p < 0,001$ ). Ploidalność guza nie miała wpływu na wyniki leczenia. Natomiast wysoki odsetek komórek fazy S ( $S \geq 15,8\%$ ,  $p = 0,026$ ) oraz wysoki IP ( $IP \geq 16,0\%$ ,  $p = 0,021$ ) w grupie guzów diploidalnych źle rokowały chorym. Niższe wartości fazy S ( $S < 12,0$ ;  $12,0 \leq S < 15,8$ ) i IP ( $IP < 11,4$ ;  $11,4 \leq IP < 16,0$ ) pozwoliły uzyskać lepsze wyniki leczenia.

W ocenie morfometrycznej jąder komórek uzyskano gorsze wyniki leczenia, jeśli: pole jądra  $\geq 64,82 \mu\text{m}^2$  ( $p = 0,009$ ), obwód jądra  $\geq 32,45 \mu\text{m}$  ( $p = 0,011$ ), gęstość optyczna jądra  $\geq 22215,63$  ( $p = 0,009$ ) i wskaźnik okrą-

głości jądra  $\geq 0,76$  ( $p = 0,014$ ). Podobnie gorsze wyniki uzyskano, jeżeli zmienność pola jądra  $\geq 20,10 \mu\text{m}^2$  ( $p = 0,011$ ), zmienność obwodu jądra  $\geq 4,77 \text{ mm}$  ( $p = 0,013$ ) lub zmienność gęstości optycznej jądra komórek  $\geq 6930,85$  ( $p = 0,011$ ). Wielowymiarowej analizie statystycznej w modelu Coxa poddano czynniki kliniczne, histopatologiczne, indeks PCNA, wartości cytofluorometrii oraz kariometrii. Wyłonił pięć niezależnych zmiennych o istotnym wpływie na progresję choroby. Najistotniejszymi czynnikami rokowniczymi były obecność przerzutów w węzłach chłonnych ( $p = 0,00001$ ) oraz ocena indeksu PCNA (niski, średni, wysoki,  $p = 0,0006$ ). Słabszym czynnikiem wpływającym na wyniki leczenia był stopień zróżnicowania guza (wysoki, średni, niski,  $p = 0,008$ ) oraz jego lokalizacja (guz ograniczony do jednego lub dwóch pięter, guz obejmujący trzy piętra i/lub przechodzący do gardła,  $p = 0,033$ ). Do modelu została również włączona zmienność pola jądra komórek. Zmienność pola jądra równa lub większa niż  $20,10 \mu\text{m}^2$  rokowała źle. Ten ostatni czynnik w modelu Coxa był naj słabszy rokowniczo ( $p = 0,092$ ).

Siłę wpływu poszczególnych czynników na przeżycie chorych przedstawiono w postaci ryzyka względnego (tab. I). Jako podstawę najlepiej rokującą dla chorych w zakresie danego czynnika przyjęto ryzyko względne równe 1. Wartości ryzyka względnego większe od 1 dla poszczególnych poziomów danego czynnika przedstawiają więc zwiększone prawdopodobieństwo niepowodzenia w porównaniu do podstawy. Z parametrów kariometrii do modelu Coxa została włączona zmienność pola jądra komórek. Wartość „p” dla tego parametru wyniosła 0,092, a współczynnik beta był równy 0,02. Ze względu

Tabela I. Wpływ czynników wybranych w krokowej analizie modelu Coxa na prognozowanie w raku krtani

Czynnik	współczynnik beta	składnik LWP <sup>1</sup>	ryzyko względne	wartość p
Przerzuty do węzłów	0,455 (~0,46)			0,00001
brak	0	0	1 (podstawa)	
do 1 w.	1	0,46	1,58	
> 1 w.	2	0,92	2,49	
indeks PCNA	0,753 (~0,75)			0,0006
niski	0	0	1 (podstawa)	
średni	1	0,75	2,12	
wysoki	2	1,5	4,49	
Stopień zróżnicowania	0,820			0,008
wysoki	0	0	1 (podstawa)	
średni	1	0,82	2,27	
niski	2	1,64	5,15	
Lokalizacja <sup>2</sup>	0,825 (~0,83)			0,033
0	0	0	1 (podstawa)	
1	0,83	0,83	2,28	
Zmienność pola jądra	0,02			0,092
			1 (podstawa)	
			1,02	

<sup>1</sup> LWP – Liczbowy Wskaźnik Programowy

<sup>2</sup> gdzie 0 – guz ograniczony do dwóch pięter krtani

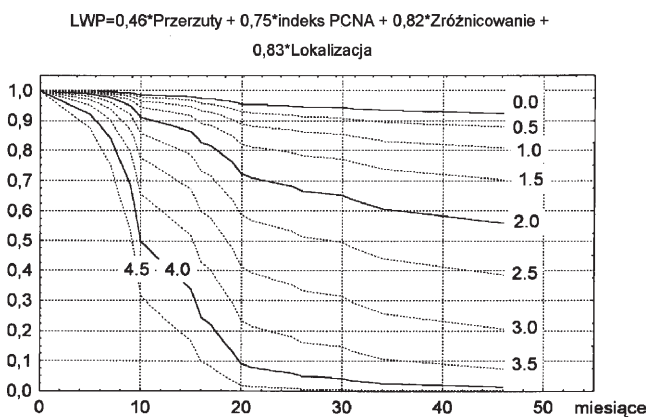
1 – guz obejmujący trzy piętra krtani i/lub przejście do gardła

na niską wartość współczynnika beta zdecydowano się nie włączać zmienności pola jądra do tworzonego wzoru. Dlatego w rubryce „składnik LWP” (tab. I) nie podano wartości dla zmienności pola jądra komórek. Na podstawie analizy modelu Coxa przedstawiono wzór wskazujący na prawdopodobieństwo niepowodzenia leczenia, nazwany Liczbowym Wskaźnikiem Progностycznym (LWP).

$$LWP_1 = 0,46 * \text{Przerzuty} + 0,75 * \text{indeks PCNA} + 0,82 * \text{Zróżnicowanie} + 0,83 * \text{Lokalizacja}$$

W tabeli I przedstawiono również podział poszczególnych niezależnych czynników rokowniczych i odpowiadające mu składniki LWP, celem ułatwienia korzystania ze wzoru. Suma wybranych składników LWP poszczególnych poziomów czynników daje LWP. Poniżej przedstawiono przykłady obliczeń. Otrzymana suma punktów (LWP) może być naniesiona na hipotetyczne krzywe przeżyć (ryc. 1) i można w ten sposób przewidzieć prawdopodobieństwo przeżycia przez chorego określonego czasu. Hipotetyczne krzywe przeżycia obliczono dla wybranych wartości Liczbowego Wskaźnika Progностycznego korzystając z modelu Coxa (Program S.A.S.).

Celem ułatwienia obliczeń dla poziomu najlepiej rokującego poszczególnych cech wprowadzono oznaczenie zerowe (0). Suma tych poziomów daje oczywiście zero, co odpowiada krzywej „0” na rycinie 1.



Ryc. 1. Krzywe przeżycia Kaplan-Meier'a dla różnych wartości liczbowego wskaźnika przeżywania (oceniono stan węzłów chłonnych, indeks PCNA, stopień zróżnicowania i lokalizację guza)

**Przykład 1.** Jeśli rozpoczynamy leczenie u chorego z niskim indeksem PCNA (0), bez przerzutu do węzła (0), z wysokim stopniem zróżnicowania (0) i rakiem ograniczonym do dwóch pięter krtani (0) to suma poszczególnych składników, podana w nawiasach, wyniesie 0. Prawdopodobieństwo przeżycia tego chorego obrazuje krzywa 0.

**Przykład 2.** Chory z wysokim indeksem PCNA (indeks 2 - składnik LWP=1,5), obecny przerzut do jednego węzła (poziom 1 - składnik LWP=0,46), stopień zróż-

Tabela II. Wpływ czynników wybranych w krokowej analizie modelu Coxa na prognozowanie w raku krtani po wyłączeniu indeksu PCNA

Czynnik	współczynnik beta	składnik LWP <sup>1</sup>	ryzyko względne	wartość p
Przerzuty do węzłów	0,697 (~0,7)			0,0001
brak	0	0	1	
do 1 w.	1	0,7	2,01	
> 1 w.	2	1,4	4,03	
Lokalizacja <sup>2</sup>	1,008 (~1,01)			0,007
0		0	1	
1		1,01	2,74	
Zmienność gęstości optycznej jądra	0,000116 (~0,00012)			0,024
jednakowo gęste jądra		0	1	
Współczynnik różnicowania	0,756 (~0,76)			0,032
wysoki		0	1	
średni		0,76	2,13	
niski		1,52	4,54	

<sup>1</sup> LWP – Liczbowy Wskaźnik Programowy

<sup>2</sup> gdzie 0 – guz ograniczony do dwóch pięter krtani

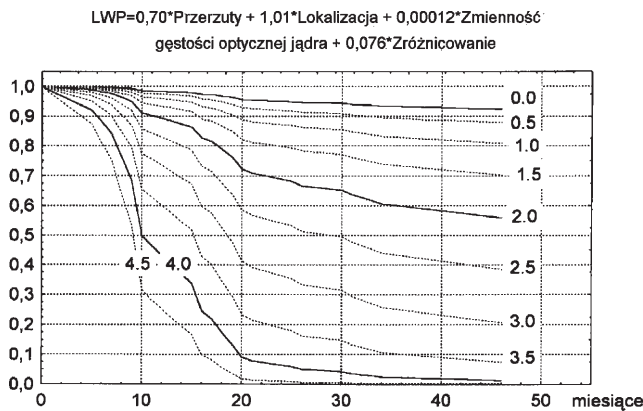
1 – guz obejmujący trzy piętra krtani i/lub przejście do gardła

nicowania guza niski (poziom 2, składnik LWP=1,64), guz przechodzący do gardła (poziom 1, składnik LWP=0,83). Suma poszczególnych składników wynosi 4,43. Prawdopodobieństwo przeżycia tego chorego obrazuje krzywa o zbliżonym wyniku LWP (ryc. 1).

Dodatkowo sporządzono kolejny model Coxa, który obejmował wszystkie przedstawione wcześniej czynniki, poza indeksem PCNA. Celem było podanie LWP i jego graficznej interpretacji dla innych czynników, aby umożliwić korzystanie ze wzoru w razie braku możliwości wykonania badania immunohistochemicznego, a posiadania danych kariometrii. W modelu Coxa zostały wyłączone omówione wcześniej czynniki kliniczne oraz zmienność gęstości optycznej jądra komórek (tab. II). Zmienność gęstości optycznej jądra pojawiła się po usunięciu indeksu PCNA z modelu, gdyż była z nim skorelowana i indeks PCNA okazywał się silniejszym czynnikiem. Interpretacja wzoru i możliwość korzystania pozostaje bez zmian, jak w przykładach podanych powyżej. Graficzną interpretację LWP dla tych czynników przedstawiono na rycinie 2.

$$LWP_2 = 0,70 * \text{Przerzuty} + 1,01 * \text{Lokalizacja} + 0,00012 * \text{Zmienność gęstości optycznej jądra} + 0,76 * \text{Zróżnicowanie}$$

We wzorze tym, poza sumowaniem wybranych składników LWP, każdorazowo niezbędne jest mnożenie wyniku oceny zmienności gęstości optycznej jądra komórek przez ustalony współczynnik. Suma tych czynników daje LWP. Zastosowana metoda oceny zmienności gęstości optycznej jądra jako składnika LWP pozwala określić jej wpływ na przeżycie chorych w sposób ciągły, a nie skokowy.



Ryc. 2. Krzywe przeżycia Kaplan-Meier'a dla różnych wartości LWP (oceniono stan węzłów chłonnych, lokalizację guza, zmienność gęstości optycznej jądra i stopień zróżnicowania guza)

## DYSKUSJA

Dokonana analiza wielowymiarowa metodą proporcjonalnych hazardów Coxa miała za zadanie wyłonić niezależne czynniki rokownicze. W wykonanej wcześniej analizie jednoczynnikowej znaleziono szereg cech wpływających na przeżycia. Cechy te mogą nawzajem oddziaływać na siebie, wzmacniając się lub osłabiając. Analiza Coxa polega na eliminacji czynników zależnych od siebie lub słabszych. Pozwala również na porównywanie czynników mierzonych różnymi metodami (ilościowych z nieilościowymi).

W dokonanej analizie Coxa wyłoniono pięć niezależnych czynników rokowniczych, tj. indeks PCNA ( $p=0,0006$ ), lokalizacja guza ( $p=0,033$ ), obecność przerzutów w węzłach ( $p=0,00001$ ), stopień zróżnicowania ( $p=0,008$ ) oraz zmienność pola jądra komórek ( $p=0,092$ ). Prace dotyczące oceny czynników rokowniczych w raku krtani tą metodą są nieliczne i zwykle przedstawiają tylko część analizowanych tu cech. W szczególności nie natrafiono w literaturze na ocenę morfometryczną jąder komórek z równoczesną analizą zawartości DNA i ekspresji PCNA. Pera i wsp. [14] z 20 czynników klinicznych i histopatologicznych wyłonili jako niezależne cechy rokownicze obecność przerzutów w węzłach, rozległość guza, stopień zróżnicowania, typ wzrostu i lokalizację. W ich materiale liczba zajętych węzłów nie miała wpływu na przeżycie, przeciwnie do naszych danych. Natomiast, podobnie jak w przedstawionym materiale, gorzej rokowali chorzy z guzami słabo zróżnicowanymi. Welkoborsky i wsp. [2] dokonali analizy 40 chorych z rakiem krtani. Na rokowanie wpływała nieprawidłowa zawartość DNA, ekspresja PCNA i ocena brzegu guza. Natomiast Truelson i wsp. [15], którzy ocenili czynniki histopatologiczne i zawartość DNA w komórkach guza znaleźli dwa niezależne czynniki wpływające na rokowanie. Był to sposób naciekania i zawartości DNA. W dodatkowej analizie do modelu Coxa zostały włączo-

ne przerzuty do węzłów. Wyniki są więc zróżnicowane i zależne od liczby analizowanych czynników. Metoda Coxa pozwala jednak dodatkowo ocenić ryzyko względne wyłonionych niezależnych czynników prognostycznych. Na tej podstawie było możliwe przedstawienie liczbowego wskaźnika prognostycznego (LWP) i jego graficznej interpretacji. W dostępnej literaturze nie znaleziono prognostycznego wskaźnika liczbowego opracowanego dla raka krtani. Natomiast wskaźnik ten został opracowany dla innych nowotworów, jednak graficzna interpretacja była znacznie uproszczona [16,17]. Na podstawie przedstawionego wykresu można przewidzieć losy chorego, jeśli dostępne są wymagane dane. Celem ułatwienia korzystania ze wzoru przygotowano jego drugą wersję, obejmującą czynniki kliniczne i zmienność gęstości optycznej jądra komórek. W przyszłości możliwa jest modyfikacja LWP i jego graficznej interpretacji w zależności od dostępnych danych.

Podobną interpretację czynników rokowniczych u chorych z rakiem jamy ustnej przedstawili Bundgaard i wsp. [16], określając wynik jako indeks prognostyczny. W ich materiale czynnikami rokowniczymi były rozległość guza (T) oraz objętość jądra, którą obliczają własną metodą. Również Partin i wsp. [17] przedstawili LWP jakkolwiek nieco uproszczony dla raka stercza. W materiale tym czynnikami rokowniczymi były m. in. zmienność okrągłości jąder i kliniczne zaawansowanie choroby.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że w dokonanej analizie najistotniejszymi czynnikami wpływającymi na przeżycie chorych okazały się przede wszystkim cechy kliniczne i histopatologiczne, tj. stopień zróżnicowania guza. Szczególnie interesujące są wyniki kariometrii, gdyż komputerowa analiza obrazu jest metodą stosunkowo tanią, sprzęt może być wielokrotnie wykorzystany bez dodatkowych kosztów (np. odczynniki). Przedstawione wyniki wskazują, że wprawdzie poszczególne czynniki w analizie jednowymiarowej mają wartość prognostyczną, to w analizie wielowymiarowej są eliminowane i nie ma potrzeby wykonywania wszystkich badań. Istniejące zależności pomiędzy ekspresją PCNA, a wynikami kariometrii pozwalają na wybór metody postępowania.

Podsumowując, obecnie dostępne metody statystyczne pozwalają na przedstawienie czynników prognostycznych i zależności pomiędzy nimi w formie liczbowej. Opracowany LWP wskazuje na prawdopodobieństwo niepowodzenia leczenia chorego. Obecność przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych to najsilniejszy czynnik prognostyczny, natomiast ocena frakcji wzrostowej guza wnosi dodatkową, istotną informację.

Wykaz skrótów:

LWP - Liczbowy Wskaźnik Prognostyczny  
PCNA - Proliferating Cell Nuclear Antigen  
NPI - Numeric Prognostic Index

**Piśmiennictwo**

1. Jakobsson PA, Eneroth CM, Killander D i wsp. Histologic classification and grading of malignancy in carcinoma of the larynx. *Acta Radiol Ther Phys Biol* 1973; 12: 1-8.
2. Welkoborsky HJ, Hinni M, Dienes HP i wsp. Predicting recurrence and survival in patients with laryngeal cancer by means of DNA cytometry, tumor front grading, and proliferation markers. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995; 104: 503-10.
3. Jacob R, Welkoborsky HJ, Mann WJ i wsp. Heterogeneity of squamous cell carcinomas of the head and neck-analysis of tumor biologic factors and proliferation rates. *Laryngoscope* 1996; 106: 1170-1175.
4. Golusiński W, Szmeja Z, Olofsson J i wsp. Wartość diagnostyczna i prognostyczna onkogenu p53, wybranych markerów nowotworowych (Ki-67, PCNA, DNA ploidi) ultrastruktury u chorych na raka krtani. *Otolaryngol Pol* 1996; 6: 607-617.
5. Lorz M, Meyer-Breiting E, Bettinger R. Proliferating cell nuclear antigen counts as markers of cell proliferation in head and neck cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1994; 251: 91-94.
6. Morawski K, Namysłowski G, Gabriel A i wsp. Ocena przydatności oznaczenia antygenu proliferacyjnego PCNA i białka P53 w przewidywaniu wznów u chorych operowanych z powodu raka krtani. *Otolaryngol. Pol.* 2000; 4: 393-399.
7. Skotnicka E, Hassmann E, Dziecioł J i wsp. Zawartość DNA jako czynnik prognostyczny w raku płaskonabłonkowym krtani. *Otolaryngol Pol* 1999; 1: 23-28.
8. Oberholzer M, Christen H, Ettlin R i wsp. Some fundamental aspects of morphometry in clinical pathology, demonstrated on a simple, multipurpose analysis system. *Anal Quant Cytol Histol* 1991; 13: 316-320.
9. Stephens JK, Bibbo M, Dytek H i wsp. Correlation between automated karyometric measurements of squamous cell carcinoma of the esophagus and histopathologic and clinical features. *Cancer* 1989; 64: 83-87.
10. Harmer MH. TNM classification of malignant tumours. International Union Against Cancer, Geneva 1978.
11. Dobroś W, Gil K, Chłap Z i wsp. Nuclear morphometry for the prediction of survival rate in the advanced cancer of the larynx. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1999; 256: 257-261.
12. Dobroś W, Lackowska B, Ryś J i wsp. DNA analysis of laryngeal carcinoma cells by flow cytometry; The histoclinical factors and their significance. *J Otolaryngol* 2000; 29: 371-376.
13. Dobroś W, Ryś J, Niezabitowski A i wsp. The prognostic value of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the advanced cancer of larynx. *Auris Nasus Larynx* 1998; 25: 295-301.
14. Pera E, Moreno A i wsp. Prognostic factors in laryngeal carcinoma. *Cancer* 1986; 58: 928-934.
15. Truelson JM, Fisher SG, Beals TE i wsp. DNA content and histologic growth pattern correlate with prognosis in patients with advanced squamous cell carcinoma of larynx. *Cancer* 1992; 70: 56-62.
16. Bundgaard T, Sørensen FB, Gaihede M i wsp. Stereologic, histopathologic, flow cytometric and clinical parameters in the prognostic evaluation of 74 patients with intraoral squamous cell carcinoma. *Cancer* 1992; 1: 1-13.
17. Partin AW, Steinberg GD, Pitcock RV i wsp. Use of nuclear morphometry, Gleason histologic scoring, clinical stage, and age to predict disease-free survival among patients with prostate cancer. *Cancer* 1992; 70: 161-168.