

## Korelacja immunoekspresji filamentów cytokeratynowych w węzłach chłonnych z cechami morfologicznymi guza pierwotnego w raku krtani – Znaczenie prognostyczne klasyfikacji Annerotha, Batsakisa i Luny w powstawaniu mikroprzerzutów

Katarzyna Starska<sup>1</sup>, Marek Łukomski<sup>1</sup>, Iwona Lewy-Trenda<sup>2</sup>

*Wstęp.* W węzłach chłonnych określonych w rutynowym badaniu morfologicznym jako N0 mogą występować utajone ogniska komórek nowotworowych o średnicy  $\leq 2$  mm, tj. mikroprzerzutów (pN+), które mogą być przyczyną wznów węzłowych oraz skrócenia czasu przeżycia. Dlatego stale poszukuje się nowych wykładników kliniczno-morfologicznych dla wyodrębnienia cech prognostycznych w raku krtani, również pod kątem wykrywania mikroprzerzutów.

*Materiał i metody.* Dokonano analizy wyników badań klinicznych i morfologicznych 22 pacjentów leczonych z powodu raka płaskonabłonkowego krtani w Klinice Laryngologii i Onkologii Laryngologicznej UM w Łodzi w latach 1998-1999. Zastosowano kryteria zmodyfikowanej klasyfikacji Annerotha, Batsakisa i Luny dotyczące guza pierwotnego i reakcji na granicy nowotworu i podścieliska. Autorzy zestawili uzyskaną punktację z wynikami immunohistoanalizy antygenów cytokeratynowych (CK) w węzłach chłonnych dla oceny ryzyka występowania mikroprzerzutów węzłowych.

*Wyniki.* Badania wykazały, że suma punktów klasyfikacji oraz głębokość i sposób naciekania nowotworu są ważnymi czynnikami prognostycznymi w szacowaniu prawdopodobieństwa występowania utajonych ognisk komórek nowotworowych w węzłach chłonnych u chorych z rakiem płaskonabłonkowym krtani.

*Podsumowanie.* Wykonywanie rozszerzonych badań morfologicznych w oparciu o wykładniki zmodyfikowanej klasyfikacji Annerotha, Batsakisa i Luny u pacjentów z rakiem krtani może zwiększyć wykrywalność w ognisk mikroprzerzutów w węzłach chłonnych.

**Słowa kluczowe:** rak krtani, klasyfikacja Annerotha, Batsakisa i Luny, filamety cytokeratynowe, mikroprzerzuty

### Wstęp

Od ponad 17 lat Polska należy do krajów wysokiego ryzyka zachorowania na raka krtani, a współczynniki zachorowalności i umieralności utrzymują się na wysokim poziomie. Wyniki leczenia, mierzone liczbą wznów miejscowych i węzłowych oraz 3- i 5-letnim czasem przeżycia, są nadal dalekie od oczekiwań. Dlatego stale poszukuje się nowych wykładników kliniczno-morfologicznych, w oparciu o dokładne badania utkania nowotworowego i węzłów chłonnych z zastosowaniem technik immunohistochemicznych i metod biologii molekularnej, dla wyodrębnienia cech prognostycznych w raku krtani. Dyskusyjne

pozostają nadal wskazania do elektywnej operacji węzłowej u chorych z zaawansowanymi zmianami nowotworowymi, z węzłami klinicznie określonymi jako cN0 oraz rokowanie u pacjentów z niepotwierdzonymi w konwencjonalnym badaniu histopatologicznym przerzutami w usuniętych węzłach chłonnych pN0. Problem dotyczy możliwości występowania utajonych ognisk komórek nowotworowych o średnicy  $\leq 2$  mm w węzle tj. mikroprzerzutów (pN+), które mogą być przyczyną wznów węzłowych oraz skrócenia czasu przeżycia. Jedną z metod w wykrywaniu utajonych ognisk komórek nowotworowych w węzłach chłonnych jest oznaczanie antygenów cytokeratynowych. Cytokeratyny to polipeptydy należące do rodziny filamentów pośrednich o średnicy 7-11 nm i dużym ciężarze cząsteczkowym (40-68 kDa), które stanowią markery różnicowania komórek nabłonkowych.

W literaturze podkreśla się również rokownicze znaczenie cech morfologicznych frontu guza pierwotnego, najbardziej inwazyjnej i najmniej zróżnicowanej części nowotworu, która determinuje agresywny wzrost nacieku nowotworowego, a tym samym może zwiększać ryzyko powstawania mikroprzerzutów.

<sup>1</sup> Klinika Laryngologii i Onkologii Laryngologicznej, Katedra Otolaryngologii

<sup>2</sup> Katedra Patomorfologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Celem pracy była:

1. Analiza cech morfologicznych nowotworu pierwotnego, podścieliska guza oraz węzłów chłonnych ocenianych wg zmodyfikowanej klasyfikacji Annerotha, Batsakisa i Luny,
2. Ocena związku między tymi wykładnikami, a ekspresją antygenów cytokeratynowych w węzłach chłonnych z histopatologicznie niepotwierdzonymi przerzutami dla określenia ryzyka występowania mikroprzerzutów.

## Materiał i metody

Badaniami objęto 22 chorych, w tym 17 mężczyzn i 5 kobiet, w wieku 58-87 lat (śr.  $63 \pm 5$  lat), którzy zostali poddani leczeniu chirurgicznemu z powodu raka płaskonabłonkowego krtani w Klinice Laryngologii i Onkologii Laryngologicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w latach 1998-1999. U wszystkich chorych wykonano całkowitą laryngektomię oraz jedno- lub obustronną ope-

rację usunięcia węzłów chłonnych szyi (limfadenktomię lub operację Crile'a). Rozległość zmian nowotworowych oceniono uwzględniając kryteria TNM.

Materiał tkankowy bezpośrednio po wykonanym zabiegu operacyjnym był utrwalany w roztworze 10% zbuforowanej formaliny. Wycinki z guza pierwotnego do badania mikroskopowego były pobierane standardowo. Jako miejsce reprezentatywne dla określenia głębokości nacieku nowotworowego wybierano punkt najgłębszego naciekania ściany krtani i tkanek otaczających. Z każdego węzła pobierano jeden lub dwa wycinki, po poprzednim przecięciu węzła w jego największym wymiarze. Wycinki pobrane do badania zatopione były w bloczki parafinowe i rutynowo krojone na skrawki grubości 4-5  $\mu\text{m}$  (co najmniej 3-4 z guza pierwotnego i każdego węzła chłonnego), przyklejane na szkiełka podstawowe i dalej poddane zwykłej procedurze barwienia H&E. Ocenę histopatologiczną preparatów guza pierwotnego wykonywano w oparciu o kryteria, zmodyfikowanej wg własnego pomysłu, klasyfikacji Annerotha, Batsakisa i Luny (Tab. I). Oceniano

Tab. I. Zmodyfikowana klasyfikacji Annerotha, Batsakisa i Luny

Cecha	Opis	Skala
Stopień rogowacenia	wysoce rogowacjący (>50% kom.)	1
	średnio rogowacjący (20-50% kom.)	2
	minimalnie rogowacjący (5-20% kom.)	3
	brak rogowacenia (<5% kom.)	4
Pleomorfizm jąder	niewielki (>75% dojrzałych)	1
	umiarkowany (50-75%)	2
	znaczny (25-50%)	3
	wybitny (0-25%)	4
Liczba figur podziału	1-2 mitozy w polu widzenia	1
	2-3 mitozy wpw	2
	3-4 mitozy wpw	3
	$\geq 5$ mitoz wpw	4
Typ inwazji	dobrze ograniczone marginesy	1
	nacieki litymi sznurami i wstęgami	2
	nacieki małymi grupami (>15 kom.)	3
	naciekanie pojedynczymi komórkami	4
Głębokość inwazji	inwazja do <i>lamina propria</i>	1
	inwazja do tkanki mięśniowej	2
	głęboka inwazja do <i>periosteum</i>	3
Nacieki limfoidalny	znaczny	1
	umiarkowany	2
	niewielki	3
	brak nacieku	4
Nacieki eozynofilowy	21-30 kom. wpw	1
	11-20 kom. wpw	2
	3-10 kom. wpw	3
	0-2 kom. wpw	4
Komórki wrzecionowate	brak	1
	obecne	2
Zatory naczyńniowe	brak	1
	obecne	2
Mikroprzerzuty	brak	1
	obecne	2

10 wykładników opisujących cechy histopatologiczne nowotworu (stopień rogowacenia, pleomorfizm jąder, figury podziału) oraz rodzaj reakcji guz – tkanki otaczające (sposób i stadium naciekania, obecność nacieku limfoidalnego i eozynofilowego, komórek wrzecionowatych, inwazję naczyń, obecność mikroprzerzuców). Preparaty oceniano w mikroskopie świetlnym (pow. 200x, liczbę mitoz pow. 400x). Ocena guza została przedstawiona jako suma uzyskanych punktów. Odczyny immunohistochemiczne z przeciwciałami poliklonalnymi (NCL-C11 Multi-Cytokeratin 4/5/6/8/10/13/18, RTU-D Novostatin Universal Detection Kit, NCL-L-DAB Liquid DAB Substrate Kit) firmy Novocastra, UK wykonano na 2-3 różnych skrawkach pochodzących z tego samego węzła (skrawki o grubości 3-4 µm przyklejano na szkiełko podstawowe powleczone polysyną) ściśle według wskazówek producenta, dołączonych do każdego z odczynników. W badaniach morfologicznych węzłów chłonnych za mikroprzerzut przyjęto ognisko o średnicy  $\leq 3$  mm. Uzyskane wyniki ekspresji filamentów cytokeratynowych w węzłach chłonnych zestawiono z wykładnikami morfologicznymi. W analizie statystycznej uzyskanych wyników zastosowano modelowanie za pomocą jednoczynnikowej regresji logistycznej szacowania ryzyka wystąpienia mikroprzerzutów, przy poziomie istotności  $p=0,05$ .

## Wyniki

W badanym materiale przeważającą grupę stanowili chorzy z zaawansowanymi zmianami nowotworowymi (zajmującymi wszystkie piętra krtani) i wywodzącymi się z okolicy nadgłośnia – 18 chorych (81,8%). Największą

grupę stanowili chorzy z III i IV stopniem zaawansowania zmian – 20 pacjentów (90%).

U 16 chorych (72,7%) wykonano jednostronną limfadenektomię, w tym u 2 operację Crile'a; u pozostałych 6 pacjentów (27,3%) – obustronną limfadenektomię. W preparatach histopatologicznych wszystkich usuniętych węzłów chłonnych, barwionych H&E nie potwierdzono obecności przerzutów. Ocena immunohistochemiczna z zastosowaniem poliklonalnych przeciwciała anti-CK potwierdziła jednak obecność ognisk z komórek nowotworowych (mikroprzerzutów) u 11 pacjentów (50%).

Na podstawie badania patomorfologicznego guza pierwotnego zanotowano, że najczęstszym typem histologicznym raka płaskonabłonkowego krtani były postaci średnioróżnicowane G2 – 12 chorych (54,5%).

Analiza sumy punktów uzyskanych na podstawie oceny guza pierwotnego wg klasyfikacji Annerotha, Batsakisa i Luny wykazała, że suma punktów wahała się od 11 do 20 (średnio 15,6 pkt.) dla guzów z węzłami CKpoli+ oraz od 10 do 16 (średnio 12,1 pkt.) dla guzów z węzłami CKpoli-. Najliczniejszą grupę wśród nowotworów CKpoli+ stanowiły przypadki o liczbie  $16 \div 20$  punktów – 7 chorych (63,6%). Dla guzów z węzłami CKpoli- najliczniejszą grupę stanowiły nowotwory o  $11 \div 15$  punktów – 6 chorych (54,5%). Uwzględniając wybrane cechy guza pierwotnego w zależności od ekspresji policytokeratyn w węzłach chłonnych zanotowano, że najliczniejszą grupę stanowiły guzy o średnim zróżnicowaniu komórkowym, odpowiednio dla guzów CKpoli+ 9 (81,8%) i dla CKpoli- 5 (45,4%) chorych. Liczba figur podziału w utkaniu nowotworowym w większości przypadków wynosiła 2-3 wpw (5 osób – 45,4%) i 3-4 wpw (5 osób – 45,4%) dla guzów

Tab. II. Wyniki analizy ryzyka wystąpienia mikroprzerzutów w węzłach chłonnych w zależności od wybranych cech morfologicznych guza pierwotnego

Badany czynnik	Współczynnik regresji	SE	Ryzyko względne	95% przedział ufności dla ryzyka względnego	
Liczba figur podziału					
1 – 2 mitozy			1,000		
2 – 3 mitozy	0,576	0,321	1,957	0,931	4,154
<b>3 – 4 mitozy</b>	<b>0,724</b>	<b>0,361</b>	<b>2,539</b>	<b>1,218</b>	<b>5,210</b>
5 lub więcej mitoz	0,306	0,536	1,458	0,556	4,041
Głębokość inwazji					
<i>in situ</i> i do <i>lamina propria</i>			1,000		
<i>lamina propria</i> + <b>okoliczne mięśnie</b>	<b>0,969</b>	<b>0,415</b>	<b>2,656</b>	<b>1,168</b>	<b>5,950</b>
<b>głęboka inwazja z periosteum</b>	<b>1,428</b>	<b>0,343</b>	<b>4,349</b>	<b>2,090</b>	<b>7,999</b>
Typ inwazji					
dobrze ograniczone marginesy			1,000		
naciek litymi sznurami i wstęgami	-0,110	0,651	0,896	0,250	3,205
naciek małymi grupami	0,356	0,639	1,433	0,399	5,078
<b>naciek pojedynczymi komórkami</b>	<b>0,511</b>	<b>0,861</b>	<b>1,657</b>	<b>1,308</b>	<b>9,014</b>
Suma punktów klasyfikacji ABL					
6 – 10			1,000		
11 – 15	0,223	0,783	3,125	0,713	14,39
<b>16 – 20</b>	<b>2,184</b>	<b>0,729</b>	<b>7,470</b>	<b>1,561</b>	<b>34,60</b>
<b>21 – 25</b>	<b>2,605</b>	<b>0,851</b>	<b>11,540</b>	<b>2,349</b>	<b>65,75</b>

Wartości ryzyka istotnie większe od jedności wydrukowano pogrubioną czcionką

CKpoli+. W grupie CKpoli- najliczniej występowały nowotwory o pośredniej liczbie figur podziału – 6 chorych (54,5%). W badanym materiale guzów CKpoli+ dominowały raki głęboko naciekające otaczające tkanki ze zniszczeniem chrząstki – 7 chorych (63,3%). W grupie pacjentów z węzłami CKpoli- przeważały nowotwory charakteryzujące się naciekiem podśluzówkowym – 6 chorych (54,5%). Uwzględniając typ inwazji guza u pacjentów z potwierdzonymi mikroprzerzutami zanotowano, że najliczniejszą grupę stanowiły nowotwory naciekające małymi grupami komórek – 5 pacjentów (45,4%).

W badanej grupie uzyskano 54,5% (12 chorych) przeżyć 3-letnich oraz 31,8% (7 chorych) przeżyć 5-letnich. Zestawiając wyniki sumy punktów klasyfikacji Annerotha, Batsakisa i Luny dla guzów z węzłami CKpoli+ stwierdzono, że 3-letni czas przeżycia zanotowano u 4 chorych (36,4%), dla których średnia suma punktów wynosiła 16,8, podczas gdy 5-letni czas przeżycia stwierdzono tylko w 1 przypadku z sumą 18 punktów. W grupie z węzłami CKpoli- rozkład 3- i 5-letnich czasów przeżycia przedstawiał się odpowiednio: 8 pacjentów (72,7%) ze średnią liczbą 12,7 punktów oraz 6 chorych (54,5%) z liczbą 11,4 punktów.

W analizie statystycznej oceny ryzyka pojawienia się mikroprzerzutów w węzłach chłonnych, w zależności od uzyskanych wyników histopatologicznych stwierdzono najsilniejszą zależność istotną statystycznie ( $p < 0,0005$ ) dla sumy punktów klasyfikacji powyżej 16 punktów. Do cech morfologicznych, dla których stwierdzono najsilniejszą korelację istotną statystycznie ( $p < 0,05$ ) należały cechy tj. sposób naciekania guza i głębokość nacieku (Tab. II).

## Omówienie

Morfologiczna ocena zmian nowotworowych, szczególnie obwodowej części guza, stanowi jedną z metod wykorzystywanych w ocenie rokowania u pacjentów leczonych z powodu nowotworu złośliwego. Rozbieżności w ostatecznych wnioskach dotyczące prognozowania na podstawie badań histopatologicznych tłumaczy się istnieniem różnic w charakterze wzrostu tkanki części centralnych i obwodowych nacieku nowotworowego [1-8]. Klasyfikacja zaproponowana przez Annerotha, Batsakisa i Lunę [9], pierwotnie dotycząca raka płaskonabłonkowego jamy ustnej, uwzględniająca wybrane cechy histologiczne guza oraz rodzaj reakcji na granicy tkanki nowotworowej i podścieliska guza również stanowi podstawę do prognozowania u tych pacjentów.

Zastosowanie klasyfikacji Annerotha, Batsakisa i Luny umożliwiło autorom wskazanie grupy chorych z wyraźnie lepszym rokowaniem ( $< 10$  punktów). Badania własne, dotyczące materiału pooperacyjnego dużej grupy pacjentów, oceniające związek sumy punktów wg zmodyfikowanej klasyfikacji Annerotha, Batsakisa i Luny i 5-letniego czasu przeżycia u chorych na raka krtani wykazały, że uzyskana punktacja ma związek z prognozą.

Przedstawione wyniki badań dotyczące 22 chorych z rakiem krtani także potwierdziły znaczenie tej klasyfikacji w przewidywaniu wystąpienia mikroprzerzutów do wę-

złów chłonnych. Wysoka suma punktów, przekraczająca wartość 16, wiązała się ze zwiększonym ryzykiem obecności ognisk pojedynczych komórek nowotworowych w węzłach chłonnych określonych w rutynowym badaniu jako negatywne (pN0). Taka liczba punktów korelowała również ze skróceniem czasu 3- i 5-letniego przeżycia u chorych z rakiem krtani.

W wielu pracach dotyczących raka krtani autorzy podejmowali się wieloczynnikowej oceny morfologicznej guza dla wyznaczenia czynników prognostycznych i zanotowali podobne spostrzeżenia [4, 9, 10-20]. Jacobsson [13] stwierdził, że suma punktów w przedstawionej przez niego skali oraz cechy tj. polimorfizm komórkowy i sposób naciekania nowotworu są istotnymi czynnikami prognostycznymi. Również klasyfikacja zaproponowana przez Crissmana [4, 10] stanowi samodzielny czynnik rokowniczy. Inni autorzy, w oparciu o tę klasyfikację, również stwierdzili występowanie korelacji między niskim stopniem dojrzałości histologicznej guza, a obecnością zatorów z komórek nowotworowych w naczyniach i występowaniem klinicznie powiększonych węzłów chłonnych [15]. Do innych wykładników zebranych w system punktowy, mających związek z czasem przeżycia oraz obecnością przerzutów w węzłach chłonnych, należy sposób oceny złośliwości nowotworu przedstawiony przez Lunda [16].

Coraz częściej w literaturze podkreśla się znaczenie wartości prognostycznej morfologicznej oceny obwodowej części utkanka guza, jako bardziej miarodajnej w prognozowaniu u pacjentów z chorobą nowotworową [5, 8]. Guzy oceniane wg klasyfikacji TFG (*tumor front grading*), które otrzymały powyżej 14 punktów, miały gorsze rokowanie [5-7]. Welkoborsky i wsp. [8] zanotowali istotną statystycznie korelację sumy punktów TFG z czasem bezobjawowego przeżycia pacjentów, oraz obecnością wznów procesu nowotworowego. Podobne wyniki uzyskał Gabriel i wsp. [5] potwierdzając znaczenie rokownicze cechy TFG, dobrze określającej wg autorów dynamikę wzrostu nowotworu, stanowiąc jednocześnie czynnik dobrze określający prawdopodobieństwo czasu przeżycia chorych.

Dyskusyjny pozostaje nadal stopień zróżnicowania histologicznego raka krtani tzw. *grading*, jeden z najczęściej określanych wskaźników w ocenie nowotworu. Przeprowadzone badania własne nie potwierdziły znaczenia cechy G w ocenie ryzyka występowania mikroprzerzutów. Badania wielu autorów również nie ujawniły zależności między stopniem dojrzałości histologicznej nowotworu, a losami chorych na raka krtani [8, 15, 21, 22]. Nieliczni badacze wskazują jednak na znaczenie stopnia zróżnicowania jako czynnika rokowniczego, podkreślając, że dotyczy to szczególnie raków niskozróżnicowanych [18, 23].

Niejednoznacznie określona pozostaje również wartość indeksu mitotycznego jako czynnika prognostycznego u chorych z rakiem krtani [14, 18]. Wyniki badań własnych nie wykazały znaczenia liczby mitoz w komórkach nowotworowych w rokowaniu u tych chorych. Stefanowa-Urbaniak i wsp. [18] wykazali jednak związek liczby figur podziału na dalsze losy pacjentów. Trzeba podkreślić, że w pracach dotyczących raka krtani cecha ta często

pojawia się jako składnik wielu klasyfikacji i skal oceny morfologicznej guza i często nie wyodrębnia się liczby figur podziału jako osobnego wykładnika, nie podając również danych liczbowych [4, 10, 13, 15, 18]. Bardzo istotne w określaniu prawdopodobieństwa występowania mikroprzerzutów węzłowych oraz przewidywaniu dalszych losów pacjentów są cechy tj. głębokość i sposób naciekania ściany krtani przez nowotwór [18, 24, 25]. Nowotwory szerzące się w sposób rozproszony, drobnoogniskowo, częściej wiązały się z niepowodzeniem zastosowanego leczenia, nawrotami miejscowymi i węzłowymi.

Nasze badania wykazały znaczenie głębokości naciekania i typu inwazji jako istotnych dla określania ryzyka występowania utajonych ognisk komórek nowotworowych w węzłach chłonnych. W badaniach czynników prognostycznych w raku krtani histopatologzy oceniają również odczyny na granicy guza i otoczenia. Niestety brak jest znaczących doniesień o niezależnym rokowniczym znaczeniu wymienionych morfologicznych wykładników w raku krtani. Częściej pojawiają się one jako składowa licznych klasyfikacji i skal oceny nowotworu pierwotnego [4, 9-20].

## Wnioski

Wykonywanie rozszerzonych badań morfologicznych w oparciu o wykładniki zmodyfikowanej klasyfikacji Annerotha, Batsakisa i Luny u pacjentów z rakiem krtani może zwiększyć wykrywalność ognisk mikroprzerzutów w węzłach chłonnych.

Wysoka suma punktów klasyfikacji (>16 punktów) oraz nacieki nowotworowy pojedynczymi komórkami i głębokie naciekanie raka obejmujące chrząstki krtani są czynnikami wpływającymi na wzrost ryzyka występowania mikroprzerzutów w węzłach chłonnych w przebiegu raka krtani ma.

**Dr med. Katarzyna Starska**  
Klinika Laryngologii i Onkologii Laryngologicznej  
Uniwersytet Medyczny  
ul. Kopcińskiego 22, 90-153 Łódź

## Piśmiennictwo

1. Anneroth G, Hansen LS, Silverman S. Malignancy grading in oral squamous cell carcinoma. I. Squamous cell carcinoma of the tongue and floor of mouth: histologic grading in the clinical evaluation. *J Oral Pathol Med* 1986; 15: 162-5.
2. Bryne M, Koppang HS, Lilleng R i wsp. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broder's grading in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 1989; 18: 432-5.
3. Bryne M. Prognostic value of various molecular and cellular features in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 1991; 20: 413-8.
4. Crissman JD, Zarbo RJ. Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: histologic parameters with prognostic value. In: Fee W.E. Jr, Goepfert H., Johans M.E. i wsp. (red.). *Head and Neck Cancer*, Vol. 2, Decker, Toronto, 1990.
5. Gabriel A, Namysłowski G, Ziółkowski A i wsp. Porównanie przydatności stopnia różnicowania histologicznego G i zaawansowania nowotworu

- w frontie guza w przewidywaniu czasu przeżycia i wznowy u chorych z rakiem krtani. *Otolaryngol Pol* 1997; 28: 188-91.
6. Starska K, Kulig A, Lukomski M. Wartość prognostyczna cech morfologicznych guza pierwotnego i węzłów chłonnych w raku płaskonabłonkowym krtani. *Otolaryngol Przeg Klin* 2002; 1: 1-4.
7. Starska K, Kulig A, Lukomski M. Znaczenie prognostyczne histocytozy zatokowej oraz rozplemu komórek szeregu limfoidalnego w węzłach chłonnych u chorych na raka krtani. *Otolaryngol Pol* 2003; 57: 1-3.
8. Welkoborsky HJ, Dienes HP, Hinni M 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: 503-8.
9. Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinoma. *Scand J Dent Res* 1987; 95: 229-34.
10. Crissman JD, Gluckman J, Whiteley J i wsp. Squamous cell carcinoma of the floor of the mouth. *Head Neck Surg* 1980; 3: 2-5.
11. Galio G, Mevio E, Benazzo M i wsp. Prognostic parameter in metastatic spread of laryngeal cancer: Clinicohistopathological correlations. *Clin Otolaryngol* 1987; 12: 303-8.
12. Glanz HK. Carcinoma of the larynx. Growth p-classification and grading of squamous cell carcinoma of the vocal cords. *Adv Otorhinolaryngol* 1984; 32: -4.
13. Jakobsson P, Eneroth CM, Killander D i wsp. Histologic classification and grading of malignancy in carcinoma of the larynx. *Acta Radiol Ther Phys Biol* 1973; 12: 1-3.
14. Janot F, Kljanienco J, Russo A i wsp. Prognostic value of clinicopathological parameters in head and neck squamous cell carcinoma: a prospective analysis. *Br J Cancer* 1996; 73: 531-5.
15. Kljanienco J, El-Naggar AK, de Braud F i wsp. Tumor vascularisation, mitotic index, histopathologic grade and DNA ploidy in the assessment of 114 head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer* 1995; 75: 1649-52.
16. Lund C, Sogaard H, Elbrond O i wsp. Histological grading of epidermoid carcinomas in the head and neck. *Dan Med Bull* 1977; 24: 162-6.
17. McGavran MH, Hauer WC, Ogura JH. The incidence of cervical lymph node metastases from epidermoid carcinoma of the larynx and their relationship to certain characteristics of the primary tumor. *Cancer* 1961; 14: 55-9.
18. Stefanowa-Urbaniak A, Niezabitowski A. Histokliniczne czynniki rokownicze u chorych na raka płaskonabłonkowego górnych dróg oddechowych. *Otolaryngol Pol* 1991; 65: 25-8.
19. 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 the larynx. *Cancer* 1992; 70: 56-9.
20. Zatterstrom U, Wenneberg J, Ewers S i wsp. Prognostic factors in head and neck cancer: histologic grading, DNA ploidy and nodal status. *Head Neck* 1991; 13: 477-80.
21. Manni JJ, Terhaar ChHJ, de Boer MF i wsp. Prognostic factors for survival in patients with T3 laryngeal carcinoma. *Am J Surg* 1992; 164: 682-5.
22. Patt BS, Close LG, Wuitch F. Prognostic significance of sinus histiocytosis. *Laryngoscope* 1993; 103: 498-501.
23. Geelen CPL, Hordijk GJ, Ravasz LA i wsp. Degree of tumour differentiation as a prognostic factor in advanced laryngeal cancer. *Acta Oto-rhino-laryngol Belg* 1995; 49: 1-4.
24. Semczuk B, Sekuła J, Szmaja Z i wsp. Ocena przyczyn powstawania przerzutów do węzłów chłonnych po leczeniu operacyjnym chorych na raka krtani *Otolaryngol Pol* 1990; 44: 365-9.
25. Welkoborsky HJ, Gluckman JL, Mann WJ i wsp. Comparison of quantitative DNA measurements and cytology in squamous cell carcinomas of the upper aerodigestive tract with and without lymph node metastases. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1993; 102: 52-5.

Otrzymano: 28 listopada 2005 r.  
Przyjęto do druku: 12 stycznia 2006 r.