# ZNAČAJ PEPSINA U NASTAJANJU DOBROĆUDNIH I ZLOĆUDNIH PROMJENA GRKLJANA

**Zubčić, Željko**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2013**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:894826

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-05-14**

*Repository / Repozitorij:*

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Željko Zubčić

# ZNAČAJ PEPSINA U NASTAJANJU DOBROĆUDNIH I ZLOĆUDNIH PROMJENA GRKLJANA

Disertacija

Osijek, 2013.

Disertacija je izrađena na Klinici za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata Kliničkog bolničkog centra Osijek. Analiza uzoraka učinjena je u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i na Zavodu za patologiju i sudsku medicinu Kliničkog bolničkog centra Osijek.

Mentor: Prof. dr. sc. Andrijana Včeva, dr. med.

Rad sadrži 81 karticu teksta.

*Zahvaljujem onima bez čije pomoći ne bi bilo ove disertacije:*

*Mentorici, prof.dr.sc. Andrijani Včeva, dr.med., Katedra za otorinolaringologiju i maksilofacijalnu kirurgiju s audiologijom, fonijatrijom i stomatologijom Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku*

*prof.dr.sc. Ines Drenjančević, dr.med., prodekanici za znanost Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, predsjednici Katedre za fiziologiju i imunologiju.*

*Dr.sc. Martini Mihalj, dr.med., Katedra za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.*

*Jasmini Rajc, dr.med., Zavod za patologiju i sudsku medicinu Kliničkog bolničkog centra Osijek.*

*Maji Tolušić Levak, dr. med., Katedra za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku*

*Posebno zahvaljujem svim djelatnicima Klinike za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata Kliničkog bolničkog centra Osijek i svojim bolesnicima koji su sudjelovali u istraživanju i nesebično pomogali u ostvarenju ciljeva ovog istraživanja.*

# SADRŽAJ

**1. UVOD.....1**

1.1. Anatomija i fiziologija grkljana.....2

1.2. Dobroćudne promjene grkljana.....4

1.2.1. Mezenhimalni tumori.....5
1.2.2. Epitelni tumori.....5
1.2.3. Polipi glasnica.....6
1.2.4. Čvorići glasnica.....7
1.2.5. Reinkeovi edemi glasnica.....7
1.2.6. Ciste glasnica.....8
1.2.7. Granulomi glasnica.....8

1.3. Zloćudne promjene grkljana.....9

1.3.1. Premaligne promjene grkljana.....9
1.3.2. Karcinomi grkljana.....10
1.3.3. Ostali zloćudni tumori grkljana.....12

1.4. Dijagnostika tumora grkljana.....12

1.4.1. Klinička slika.....12
1.4.2. Kliničke pretrage.....13

1.5. Terapija tumora grkljana.....14

1.5.1. Kirurško liječenje.....14
1.5.2. Konzervativno liječenje.....14
1.5.3. Prognoza i praćenje.....15

1.6. Laringofaringealni refluks.....16

1.6.1. Epidemiologija LPR-a.....16
1.6.2. Patogeneza LPR-a.....17
1.6.3. Klinička slika.....18
1.6.4. Anamneza.....19
1.6.5. Klinički nalazi.....20
1.6.6. Test inhibitorima protonske pumpe.....21
1.6.7. 24 satna pH-metrija jednjaka i grkljana.....21
1.6.8. Multikanalna intraluminalna impedanca.....22
1.6.9. Određivanje pepsina iz sline.....22
1.6.10. Liječenje LPR-a.....22

**2. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA.....24**

**3. CILJ ISTRAŽIVANJA.....25**

**4. ISPITANICI I METODE.....26**

4.1. Ispitanici.....26

4.2. Metode.....27

4.2.1. ELISA.....27
4.2.2. Imunohistokemija.....28
4.2.3. Patohistologija.....29
4.2.4. Videolaringoskopija.....30
4.2.5. Upitnici RSI i RFS po Belafskom.....30

4.3. Statistička obrada podataka.....31

**5. REZULTATI.....33**

5.1. Ispitanici uključeni u istraživanje.....33

5.2. Usporedba triju skupina s obzirom na RSI simptome.....34

5.2.1. Analiza povezanosti dobi sa RSI simptomima.....34
5.2.2. Analiza RSI simptoma s obzirom na spol.....35
5.2.3. Usporedba triju skupina s obzirom na RSI simptome.....35

5.3. Usporedba triju skupina s obzirom na RFS kliničke znakove.....39

5.3.1. Analiza povezanosti dobi s RFS kliničkim znakovima.....39
5.3.2. Analiza RFS kliničkih znakova s obzirom na spol.....41
5.3.3. Usporedba triju skupina s obzirom na RFS kliničke znakove.....41

5.4. Analiza izmjerenih koncentracija pepsina u slini ELISA metodom.....44

5.4.1. Analiza povezanosti dobi s koncentracijom pepsina u slini.....44
5.4.2. Analiza koncentracija pepsina u slini s obzirom na spol.....45
5.4.3. Usporedba triju skupina s obzirom na koncentracije pepsina u slini.....45
5.4.4. Analiza koncentracija pepsina u slini prema pojedinim dijagnozama...46
5.4.5. Usporedba sudionika s različitim dijagnozama s obzirom na dob i koncentraciju pepsina u slini.....46
5.4.6. Usporedba sudionika s različitim dijagnozama s obzirom na spol i koncentraciju pepsina u slini.....48
5.4.7. Analiza koncentracija pepsina u slini kontrolne skupine i skupina s različitim benignim dijagnozama.....48
5.4.8. Analiza koncentracija pepsina u slini kontrolne skupine i skupina s različitim benignim dijagnozama s obzirom na dob.....49

5.4.9. Analiza koncentracija pepsina u slini kontrolne skupine i skupina s različitim benignim dijagnozama s obzirom na spol.....50
5.4.10. Analiza povezanosti RSI-a i izmjerenih koncentracija pepsina u slini kod benignih i malignih dijagnoza.....51
5.4.11. Analiza povezanosti RFS-a i izmjerenih koncentracija pepsina u slini kod benignih i malignih dijagnoza.....53
5.4.12. Analiza koncentracija pepsina u slini u skupinama s malignim i benignim promjenama s obzirom na prisutnost/odsustvo ventrikularne obliteracije.....54
5.4.13. Analiza koncentracija pepsina u slini u skupinama s malignim i benignim promjenama s obzirom na hiperemiju grkljana.....54
5.4.14. Analiza koncentracija pepsina u slini u skupini s malignim promjenama s obzirom na T stadij.....55

5.5. Analiza rezultata dobivenih imunohistokemijskom obradom uzoraka tkiva grkljana.....56

**6. RASPRAVA.....59**

**7. ZAKLJUČCI.....68**

**8. SAŽETAK.....70**

**9. SUMMARY.....72**

**10. LITERATURA.....73**

**11. ŽIVOTOPIS.....80**

# POPIS OZNAKA I KRATICA

**LPR – laringofaringealni refluks**

**GER – gastroezofagealni refluks**

**RSI – Reflux Symptom Indeks**

**RFS – Reflux Finding Score**

**PCC – planocelularni karcinom**

**PAP – laringealna papilomatoza**

**RE – Reinkeovi edemi**

**PG – polip glasnice**

**IPP – inhibitori protonske pumpe**

# 1. UVOD

Zahvaljujući različitom porijeklu, raznolikoj histogenezi tkiva i osobinama sluznice, u grkljanu se razvijaju raznovrsni tumori. Tumori grkljana mogu se podijeliti prema više parametara. U odnosu na biološko ponašanje dijele se na dobroćudne i zloćudne što ima veliki klinički značaj. Prema vrsti tkiva iz kojih potječu, svrstani su u epitelne i mezenhimalne tumore. Zloćudni tumori se po mjestu nastajanja dijele na primarne i sekundarne, odnosno metastatske. U zavisnosti od stupnja zrelosti zloćudnih stanica, dijele se na dobro, srednje i slabo diferencirane. U laringealne tumore svrstana je grupa, na izgled tumorskih promjena koje su po morfološkim osobinama netumorske prirode, a klinički se ponašaju slično tumorima i nazvani su pseudotumori grkljana (1).

Uzroci nastajanja tumora grkljana nisu utvrđeni kao uostalom ni za druge benigne i maligne tumore. Vjerojatno da na nastajanje utječu različiti čimbenici, jedni unutrašnji i drugi vanjski. Među vanjskim čimbenicima rizika na prvom mjestu je trajna izloženost sluznice i drugih tkiva grkljana različitim mehaničkim, kemijskim, fizičkim, upalnim i funkcionalnim nadražajima (1).

Najnovija hipoteza kojom se pokušava objasniti etiologija dobroćudnih i zloćudnih promjena grkljana, ali i mnogih drugih bolesti dišnog sustava, temelji se na laringofaringealnom refluksu (LPR) i djelovanju pepsina kao jednom od mogućih čimbenika u nastanku tih bolesti. Laringofaringealni refluks je noviji klinički entitet koji predstavlja povrat želučanoga sadržaja iz želuca kroz jednjak u laringofarinks (2-6). Svaki refluks u područje grkljana je patološki te uzrokuje ozbiljna oštećenja sluznice grkljana (7-10). Vjeruje se da u nastanku laringofaringealnog refluksa ključnu ulogu igra slabiji tonus gornjeg ezofagealnog sfinktera. Rezultati recentnih istraživanja pokazuju vezu tog entiteta s mnogim bolestima gornjih dišnih putova (11,12). Najčešće se laringofaringealni refluks manifestira u području grkljana (laringospazam, fiksacija aritenoida, laringealna stenoza i Reinkeov edem, čvorići na glasnicama, rekurentni respiratorni papilom, rekurentne leukoplakije i karcinom grkljana), ali se može manifestirati i u području ždrijela, pluća, sinusa i uha (13).

Točnu vezu između nastanka dobroćudnih i zloćudnih promjena grkljana i laringofaringealnoga refluksa treba još istražiti, ali dosadašnja (u prvom redu pH metrijska

istraživanja) pokazuju da su većinom bolesnici s tumorima grkljana pušači i da većinom imaju laringofaringealni refluks (13).

Promišljanje o pepsinu i LPR-u moglo bi promijeniti dosadašnje shvaćanje etiopatogeneze dobroćudnih i zloćudnih bolesti grkljana, promijeniti preventivne i terapijske pristupe i njihovu učinkovitost u dijagnostici i liječenju.

## 1.1. Anatomija i fiziologija grkljana

Grkljan je smješten u prednjem dijelu vrata, u središnjoj liniji, u visini trećeg i šestog vratnog kralješka. Kranijalno graniči sa strukturama orofarinksa ( baza jezika i valekule ), lateralno sa strukturama hipofarinksa, a kaudalno sa jednjakom i dušnikom.

Embriološki grkljan nastaje od dviju osnova. Supraglotis, zajedno s hipofarinksom, nastaje iz zajedničke branhiogene (bukofaringealne) osnove, a glotis i subglotis nastaju od traheobronhalne osnove, što objašnjava činjenicu kako dno piriformnog sinusa nikada ne dopire ispod nivoa glotisa. Jasna je granica među njima na nivou glotisa i dna Morgagnijevog ventrikulusa koja je ujedno i limfatičko-anatomska barijera širenju karcinoma vertikalnom smjeru. Sastoji se od hrskavičnog skeleta koji čine krikoidna hrskavica, tireoidna hrskavica, para aritenoidnih hrskavica i epiglotisa. Unutrašnju površinu larinksa oblaže mukoza. Fibrozno tkivo grkljana povezuje međusobno hrskavice grkljana i grkljan s okolnim strukturama (14).

Grkljan je jedinstven među organima time što je membranama i ligamentima odijeljen u anatomske prostore. Preepiglotski prostor nalazi se ispred epiglotisa, omeđen je straga epiglotisom, gore širokim hioepiglotičkim ligamentom, a sprijeda tireohioidnom membranom te podijeljen medijalnim tireohioidnim ligamentom na polovice. Morgagnijev ventrikulus je prostor koji se pruža između vokalnih i ventrikularnih nabora prema lateralno čiji je prednji kraj proširen u divertikulum (sacculus laryngis) u kojem se nalaze brojne mukozne žlijezde. Reinkeov prostor je subepitelni prostor (lamina propria) omeđen kolagenim nitima u prednjoj i stražnjoj komisuri, bazalnom membranom medijalno, vokalnim ligamentom lateralno te lineom arcuatom superior i inferior s gornje i donje strane. Krikoidni trokut omeđen je krikoidnom hrskavicom kaudalno, medijalno krikotireoidnom membranom a lateralno krikotireoidnim mišićem. Tireoaritenoidni prostor omeđen je medijalno s lateralnom plohom aritenoidne hrskavice, a lateralno sa štitnom hrskavicom.

Grkljan se sastoji od vanjskih i unutrašnjih mišića. Vanjski mišići (m. thyrohioideus, m. sternothyreoideus, m. omohyoideus, m. digastricus, m. stylohyoideus, m. mylohyoideus, m. geniohyoideus, m. hyoglossus) povezuju grkljan s okolnim strukturama i imaju funkciju u njegovoj fiksaciji, podizanju i spuštanju. Unutrašnji mišići grkljana povezuju pojedine hrskavice grkljana i neposredno utječu na širinu otvora glotisa kod fonacije i respiracije (14).

Prema načinu djelovanja i smjeru djelovanja unutrašnje mišiće grkljana dijelimo na:

- primicače ( pomiču strukture glotisa prema središnjoj liniji i glavni su fonacijski mišići): m.cricoarythenoideus lateralis, m. interarythenoideus, m. thyreoarythenoideus externus
- odmicače (pomiču strukture grkljana od središnje linije tj. prema lateralno): m. cricoarythenoideus posterior
- zatezače ( napinju strukture glotisa te sudjeluju u procesu fonacije): m cricothyreoideus, m. vocalis
- vibratore

Anatomski i klinički grkljan dijelimo u tri dijela:

- supraglotis (graniči sa strukturama orofarinksa kranijalno te završava petiolusom epiglotisa kaudalno, čine ga epiglotis, ariepiglotski nabori te vetrikularni nabori)
- glotis (središnji dio grkljana, čine ga glasnice, Morgagnijev sinus, aritenoidi, interaritenoidni prostor)
- subglotis (počinje oko 1 cm ispod donjeg ruba glasnica te završava sa gornjim rubom prvog trahealnog prstena, čini ga krikoidna hrskavica sa svojim mukoznim i fibroznim dijelovima)

Grkljan je integralni dio jedinstvenog dišnog puta i kao takav ima trostruku funkciju. Zaštitna funkcija je zaštita donjeg dišnog puta od aspiracije sastojaka bolusa pri degluticiji, što se postiže trostrukim sfinkternim mehanizmom. Prvi nivo sfinktera čini epiglotis s ariepiglotskim naborima koji se zatvara dijelom pasivno (pod težinom baze jezika), a dijelom aktivno akcijom ariepiglotičkog mišića. Drugi nivo sfinktera čine ventrikularni nabori, a treći su, najjači i najvažniji nivo sfinkternog mehanizma, glasnice. Drugi se i treći nivo sfinkternog mehanizma u

cijelosti aktivno zatvara djelovanjem pojedinih dijelova tireoaritenoidnog mišića (i ariepiglotički mišić je najvjerojatnije njegov dio).

Respiratorna funkcija je održavanje konstantnoga kalibra dišnog puta, što znači da on stalno mora biti otvoren osim kada je refleksno ili voljno zatvoren sfinkternim mehanizmom. Tu ulogu obavlja laringealni skelet, čiji je najvažniji segment krikoidna hrskavica.

Treća funkcija je fonacija. To je, ustvari, korištenje ekspiracijske struje zraka za formiranje osnovnog laringealnog tona titranjem glasnica koji se dalje modulira u rezonantnim šupljinama grkljana, ždrijela te nosne i usne šupljine. Premda je ona biološki najmanje važna, ima silnu sociomedicinsku važnost (14).

## 1.2. Dobroćudne promjene grkljana

Dobroćudni tumori u širem smislu značenja nastaju prilično često u grkljanu, a u užem smislu dosta su rijetki u odnosu na zloćudne tumore. Dobroćudni tumori se razvijaju sporo, ne infiltriraju okolinu i ne metastaziraju. Češći su u muškaraca, ali su neki, kao Reinkeovi edemi više zastupljeni u žena. Javljaju se u svakoj životnoj dobi, a pretežno u srednjim godinama života (1).

S kliničkog stajališta i iz didaktičkih razloga dijele se na prave dobroćudne tumore i pseudotumore. Pravi dobroćudni tumori u odnosu na vrstu tkiva iz kojih nastaju dijele se na epitelne i mezenhimalne. Prave benigne tumore neki razvrstavaju na tumore bez sklonosti k malignoj alteraciji i sa sklonošću k malignoj alteraciji. Ni jedna od podjela nije egzaktna, jer tumori ne moraju nastati samo iz jedne vrste tkiva, niti je sigurno, da s vremenom, benigni tumor u određenim uvjetima neće maligno transformirati. Pseudotumori grkljana su izrasline u grkljanu koje su po morfološkim osobinama netumorske prirode, a klinički se ponašaju slično tumorima, sreću se vrlo često. Oni nemaju osobine nekontroliranog tumorskog rasta. Etiologija im je vrlo različita počevši od upalne, traumatske, posljedica općih oboljenja itd. Najčešći pseudotumori grkljana su polipi glasnica, vokalni noduli, granulomi glasnica, ciste glasnica i Reinkeovi edemi (1).

### 1.2.1. Mezenhimalni tumori

Pravi benigni mezenhimalni tumori su rijetki ali su veoma polimorfni. Razvijaju se iz različitih tkiva grkljana. Klinička iskustva potvrđuju da s vremenom rijetko maligno alteriraju već zadržavaju karakteristike benignog rasta. Lokalizacijom i rastom u grkljanu mogu se ponašati vrlo opasno ugrožavajući postepeno grkljanske funkcije, a naročito respiratornu (1).

Simptomi benignih tumora su gotovo isti kao i u ostalih bolesti grkljana. Razvijaju se sporo, utoliko sporije što se tumor nalazi dalje od glasnica. Najčešće nastaje promuklost. Otežano disanje prati veće izrasline koji polaze s glasnica ili iz subglotisa. Uz ove simptome bolesnici se žale na osećaj prisutnosti stranog tijela u grlu koje pokušavaju odstraniti iskašljavanjem. Smetnje gutanja prate velike tumore supraglotidne regije.

**Fibrom** je jedan od češćih tumora iako je pravi fibrom rijedak tumor. Najčešće nastaje na glasnici muškarca između 30-50 godina. Ovalnog je oblika, pojedinačan i često na peteljci.

**Chondrom** je rijedak tumor, bjeličastog izgleda, a razvija se u području krikoidne ili tireoidne hrskavice.

**Myom** nastaje od glatkog ili poprečnoprugastog mišićnog tkiva i vrlo je rijedak.

**Lipom** je najređi tumor u grkljanu, koji nastaju na račun masnog tkiva.

**Angiomi** se dijele na hemangiome i limfangiome. Nastaju iz odgovarajućih žila i dostižu veće razmjere.

**Neurilemom** je obično solitaran tumor koji nastaje iz ovojnica živaca. Ako se adekvatno ukloni ne daje recidive.

**Myxom** je rijedak tumor koji obično nastaje na glasnici.

**Plasmacytoma** je relativno čest tumor grkljana kod muškaraca iznad 50 godina (1).

### 1.2.2. Epitelni tumori

Pravi benigni epitelni tumori nisu polimorfni kao mezenhimalni tumori ali su neuporedivo češći od njih. To su uglavnom papilomi i adenomi. Adenomi nastaju iz žljezdanog epitela. Medju svim pravim benignim tumorima grkljana najbrojniji su papilomi (1).

Manifestiraju se kao egzofitične promjene na glasnicama. Izgledaju kao bijele ili ružičaste verukozne izrasline. Obično su multicentrične, ali mogu biti i solitarne. Mogu se pojaviti bilo

gdje na grkljanu te se mogu širiti na dušnik. Vjeruje se da glavnu ulogu u nastanku papiloma na grkljanu imaju humani papiloma virusi. Javljaju se u dječjoj i odrasloj dobi. U dječjoj dobi imaju agresivnjiji i brži tijek. Mogu čak opstruirati dišni put i uzrokovati gušenje. Bitno je da imaju tendenciju recidiviranju bez obzira na primjenjenu terapiju (14).

Najvažniji način liječenja papiloma je kirurška ekscizija. Ekscizija se može učiniti klasično mikrokirurškim instrumentima ili CO2 laserom.

Koriste se brojne dodatne terapije papilomatoze grkljana kao dodatak kirurškoj terapiji To su prije svega terapija interferonom, iniciranje lokalnog citostatika ili virostatika u mjesta ekscizija i cijepljenje protiv humanog papiloma virusa. Kombinacijom laserske ekscizije i virostatika (Cidofovir) razdoblje između recidiva se produljilo te se smanjila fibrozacija tkiva sa stvaranjem priraslica na glotisu (14). Uz parcijalnu ili totalnu dekortikaciju priraslice dodatno pogošavaju fonaciju.

### 1.2.3. Polipi glasnica

Polipi su najčešće benigne promjene glasnica. Obično su jednostrani. Nešto su češći u muške populacije. Najčešće nastaju kao posljedica dugogodišnje konzumacije cigareta i kod osoba koje su skolne fonotraumi ( pjevači, učitelji, šalterski službenici, televizijski voditelji itd. ) , tj. koji prekomjerno i obično nepravilno koriste svoje glasnice. Također je veća vjerojatnost razvoja polipa kod svih tipova laringitisa, pogotovo kroničnog. Vjeruje se da kašalj i stalno ozljeđivanje glasnica dovodi do istezanja epitela i uraštanja krvnih žila. Taj proces u konačnici dovodi do stvaranja polipa na glasnicama. Polipi se najčešće nalaze na granici prednje i srednje trećine i to na slobodnom rubu glasnice. To dokazuje da je fonotrauma možda i najbitniji čimbenik kod nastanka polipa te lokalizacije. S obzirom da prilikom fonacije glasnice udaraju jedna od drugu takvi polipi slobodnog ruba najviše ometaju fonaciju i uzrokuju najjaču promuklost. Za razliku od Reinkeovih edema polipi glasnica nemaju karakterističan tip promuklosti. Dijagnoza se postavlja endoskopskim pregledom grkljana. Liječenje je isključivo fonomikrokirurško. Poslije kirurške terapije savjetuje se štednja glasa dok glasnice u potpunosti ne zacijele i prestanak pušenja. U terapiju se može uvesti antirefluksna terapija blokatorima protonske pumpe u dozi dva puta dnevno kroz 8 tjedana. Kod nekih pacijenata koji su profesionalno prekomjerno koriste glas može biti preporučena i glasovna terapija (14)

### 1.2.4. Čvorići glasnica

Vokalni noduli ili čvorići glasnica su zadebljanja sluznice glasnica na njenom slobodnom rubu. Obično su smještena na granici prednje i srednje trećine (tzv. Fraenkelove točke). Najčešće su obostrani. S obzirom na smještaj i oni su posljedica prekomjerne upotrebe glasa tj. fonotraume. Mogu nastati kod akutnog laringitisa i akutnog respiratornog infekta praćenog kašljem. S obzirom na smještaj i popratnu upalu na glasnicama uzrokuju jači stupanj promuklosti. Najčešće ih nalazimo kod žena i djece. To su obično žene koje profesionalno prekomjerno koriste glas i brbljiva djeca. Čvorići mogu biti mekani i fibrozirani. Stroboskopija nam može pomoću u razlikovanju ta dva tipa čvorića glasnica. Mekani noduli mogu se liječiti konzervativno štednjom glasa, govornim vježbama, inhalacijama i antirefluksnom terapijom. Fibrozirani noduli liječe se isključivo fonomikrokirurški. Nakon kirurškog tretmana potrebne su glasovne vježbe i antirefluksna terapija (14).

### 1.2.5. Reinkeovi edemi glasnica

Reinkeovi edemi označavaju difuzno zadebljanje glasnica. Glasnice su žuto prozirne i u težim slučajevima su toliko velike da flotiraju kod respiracije i fonacije. Veliki edemi su obično tvrdi i mesnati. Takvi edemi mogu izazavati osjećaj nedostatak zraka i u težim slučajevima akutno gušenje. Obično nastaju zbog naklupljanja tekućine u Reinkeovom prostoru glasnice uslijed kronične iritacije. Histološka građa takve glasnice pokazuje potpuno narušenu slojevitost građe mukoze. Obično su obostrani s tim da je edem na jednoj strani uvijek izraženiji. Mogu biti i jednostrani. Najčešće zauzimaju glasnicu u cijeloj duljini, ali mogu zauzimati samo dio glasnice. Najčešće ih nalazimo u starijih žena koje su dugogodišnji pušači cigareta. Njihov glas je karakterističan, nalik na muški glas. One govore dubokim i jednoličnim glasom. Reinkeove edeme dijagnosticiramo enoskopskim pregledom grkljana, a liječimo ih isključivo mikrokirurškim liječenjem (14). Obično je potrebna ekscizija cijele glasnice na strani gdje je edem veći, a na drugoj strani samo incizija duž glasnice radi oslobađanja tekućine iz Reinkeovog prostora. Ukoliko i nakon mjesec dana od incizije mukoze glasnice prezistira edem tada je indicirana mikrokirurška ekscizija u drugom aktu. Nikada nije indicirana obostrana ekscija glasnica zbog velike mogućnosti stvaranja priraslica glasnica. Takve priraslice najčešće nastaju u

području prednje trećine glasnica i uzrokuju perzistiranje promuklosti. Uz kiruršku terapiju bitno je naglasiti pacijentu koliko je bitan prestanak pušenja cigareta. Bilo zbog vraćanja edema na glasnicama bilo zbog mogućnosti nastanka zloćudnih promjena na glasnicama. S obzirom da velika većina pacijentica s Reinkeovim edemima imaju refluks želučane kiseline potrebno je kao dodatnu terapiju uvesti blokatore protonske pumpe. Takva terapija ubrzat će cijeljenje operiranih glasnica i usporiti ponovni nastanak edema.

### 1.2.6. Ciste glasnica

Cistčne promjene glasnica najčešće nalazimo na njenom slobodnom rubu. Obično ih nalazimo u srednoj trećini. Za razliku od polipa jako su rijetke. Često ih je teško razlikovati od polipa. Tek mikrokiruška ekscizija može utvrdtii da je riječ o cisti glasnice.
Dijagnosticiramo ih endoskopskim pregledom glasnica, a liječimo ih isključivo kirurški (14).

### 1.2.7. Granulomi glasnica

Granulomi glasnica su benigne promjene koje se nalaze u stražnjoj trećini glasnica ili na sluznici aritenoida. Obično su ružičaste ili plavičaste boje, nepravilnog ili okruglastog oblika. Nastaju kao posljedica kronične iritacije vokalnih procesusa aritenoida zbog prekomjernog korištenja glasa, pušenja cigareta, virusne infekcije sa kašljem, laringofaringealnog refluksa i endotrahealne intubacije. Taj dio grkljana je izuzetno osjetljiv na bilo kakvu traumu zato što su vokalni procesusi prekriveni samo s tankim slojem perihondrija i mukoze. Kod fonacije vokalni procesusi udaraju jedan od drugog stvarajući kontaknti ulkus ili u konačnici granulom. Akutni i kronični laringitisi doprinose ranjivosti i infekciji mukoze čineći je podložnom stvaranju granuloma. Najčešće se na suprotnoj strani od granuloma nalazi se tzv. kontaknti ulkus. Kod pregleda granulomi su pet puta češći od ulkusa zato što se ulkus sam zalječi ili pretvori u granulom. Kod intubiranih pacijenata granulomi nastaju zbog direktnog pritiska endotrahealnog tubusa na vokalne procesuse.

Granulome glasnica češće nalazimo kod muške populacije, a dijagnosticiramo ih endoskopskim pregledom grkljana. U prošlosti takvi granulomi liječeni su uglavnom štednjom glasa. U novije vrijeme vježbe glasa su dale puno bolje rezultate nego štednja glasa prije svega

zato što su smanjile učestalost traume vokalnih preocesusa. U kombinaciji sa antirefluksnom terapijom granulomi se razrješavaju unutar šest mjeseci. Kirurška terapija indicirana je kod granuloma koji zatvaraju dišni put, kod fibroznih tvrdih granuloma ili kod sumnje na karcinom. Koriste se klasični fonokirurški instrumenti ili CO2 laser (15).

### 1.3. Zloćudne promjene grkljana

Iskustva kliničara i izazivanje karcinoma u eksperimentima na životinjama utjecali su na stvaranje koncepcije o prekanceroznim stanjima i o prethodnicama neoplazmi iz kojih mogu nastati maligni tumori.

#### 1.3.1. Premaligne promjene grkljana

Premaligne promjene na grkljanu obično se pojavljuju na glasnicama. Glavni etiološki čimbenici u nastanku tih promjena su pušenje cigareta, fonotrauma, kronične infekcije glasnica te zagađen životni i radni okoliš. Klinički znakovi koji upućuju na njih su leukoplakija, eritroplakija, neravna površina mukoze, pojačana keratoza, povećanje volumena glasnice, ponovno javljanje nakon lokalne kirurške ekscizije i dugo trajanje. Laringealna keratoza je samo površna manifestacija procesa koji može sezati od obične hiperplazije do invazivnog karcinoma. Najznačajniji praktični indikator potencijala maligne transformacije je stupanj displazije epitela. Stupnjevi displazije su: laki, srednji i teški. S obzirom na stupanj displazije veći je i potencijal transformacije prema karcinomu. On seže od 1-40%. Displazije najčešće nalazimo na glasnicama i obično su obostrane. Pouzdani histološki indikatori malignog potencijala su: abnormalni mitotički indeks, mitotička aktivnost, stromalna inflamacija, stupanja maturacije, pleomorfizam jezgara (16).

Karcinom in situ je prijelazni oblik prema inavazivnom karcinomu. Njegov cjelokupni pločasti epitel zamjenjen je s malignim stanicama koje ne prelaze bazalnu membranu. On se također klinički može manifestirati kao leukoplakija, eritroplakija ili hiperkeratoza. Vrlo ga je teško histološki razlikovati od teških displazija. Najčešće se javlja u prednjoj polovici glasnica kod muškaraca starije dobi. Sve opisane kliničke pojave koje bi mogle upućivati na premaligne lezije grkljana treba pažljivo pratiti te na vrijeme ekscidirati i histološki verificirati. U novije

vrijeme je dokazana vrijednost stroboskopije u razlikovanju i praćenju takvih lezija grkljana. Glasnica koja je promijenjena i infiltrirana displastičnim ili malignim stanicama nepravilno vibrira ili uopće ne vibrira kod procesa fonacije. Promjene s takvim nalazom stroboskopije treba što prije histološki istražiti (14).

### 1.3.2. Karcinomi grkljana

Prema podatcima od National Cancer Data Base u SAD-u zloćudni tumori grkljana sačinjavaju preko 20 posto svih karcinoma glave i vrata (17). Preko 90 posto svih tumora grkljana sačinjavaju karcinomi pločastih stanica koji nastaju iz epitela mukoze grkljana (16).

Samo jedan mali dio oko 1-4% karcinoma čini njihov podtip tzv. verukozni karcinom. Taj tip je obično dijagnostički teško dokaziv. Dobro je diferenciran, a histološki pokazuje samo benigne značajke. Lokalno je invazivan i rijetko daje metastaze. Teško se klinički razlikuje od karcinoma pločastih stanica i laringealne papilomatoze. Liječenje je isključivo kirurško (16). Svjetska incidencija karcinoma pločastih stanica je između 2,5-17,2 na 100 000. Incidencija se razlikuje od zemlje do zemlje. Najniža je u Kini, a najviša u Španjolskoj pokrajini Baskiji (16).

Obično se javljaju od petog do sedmog desetljeća života. Žene su pogođene u nešto ranijoj dobi od muškaraca. Odnos prema spolu je 5:1 u korist muškog spola. U pacijenata mlađih od 35 godina odnos je 1:1. Supraglotični karcinomi su nešto češći u žena.

Etiologija karcinoma grkljana uključuje međusobno djelovanje mnogih čimbenika kroz dugi niz godina. Obično su to dugotrajna konzumacija cigareta i alkoholnih pića, prehrambeni faktori, genetska podložnost, infekcija humanim papiloma virusom i kronični laringofaringealni refluks. To su obično ljudi s lošim socioekonomskim statusom i nižom naobrazbom (16).

Pušenje cigareta je vjerojatno najvažniji čimbenik u nastanku karcinoma grkljana. Dim cigareta sadrži preko 30 različitih kancerogenih supastanci koji uzrokuju poremećaje u normalnoj genetskoj strukturi stanica grkljana i potiču razvoj karcinoma. U studijama je dokazano da pušenje 2 kutije cigareta dnevno povećava rizik od nastanka karcinoma grkljana. Takvi pacijenti umiru 13 puta češće od karcinoma grkljana nego nepušači. Također je dokazano da pacijenti koji nakon liječenja karcinoma grkljana nastave pušiti cigarete imaju 7 puta veću mogućnost razvoja drugog primarnog karcinoma (16).

Konzumacija alkohola je bitan kofaktor u nastanku karcinoma grkljana. On djeluje združeno sa pušenjem cigareta u razvoju karcinoma, ali može biti i samostalni rizični faktor. On djeluje lokalno na sluznicu grkljana, ali i sistemski u različitim fazama incijacije i promocije stanica. Malignoj transformaciji stanica svakako pridonosi loš nutricijski status kroničnih alkoholičara te nedostatak vitamina i minerala u njihovoj prehrani. Prema lokalizaciji supraglotis je izložen većem riziku od nastanka karcinoma nego glotis i subglotis jer je izložen direktnom djelovanju alkohola prilikom procesa gutanja. Laringofaringealni refluks je povezan sa povećanom incidencijom karcinoma prednje dvije trećine glasnica. Prema lokalizaciji unutar grkljana karcinom se najčešće pojavljuje na glotisu, zatim na supraglotisu, a rijetko u području subglotisa (16).

**Supraglotični tumori** obično se šire prema orofarinksu, a rjeđe prema glotisu. Rano daju obostrane metastaze u vratne limfne čvorove pogotovo oni koji se nalaze u suprahioidnom dijelu supraglotisa i oni koji zahvaćaju ariepiglotske nabore.

**Glotički tumori** su zaštićeni od širenja raznim anatomskim preprekama. To su vokalni ligament, prednja komisura, tireoglotički ligament i konus elastikus. Kacinomi slobodnog ruba glasnice su ograničeni Reinkeovim prostorom te se obično provo proširе cijelom duljinom glasnice. Konus elastikus služi kao barijera širenju kacinoma u prednjim dijelovima glotisa. Karcinomi srednje i stražnje trećine kad savladaju Reinkeov prostor šire se lateralno prema tiroaritenoidnom mišiću i u konačnici ga fiksiraju i onemogućuju pokretanje glasnice pri fonaciji i respiraciji. Bitna prepreka širenju karcinoma je unutarnji perihondrija tiroidne hrskavice bilo kod prednje komisure bilo u njenim lateralnim dijelovima. Karcinomi glotisa daju lokalne cervikalne metastaze tek kod lokalno jako proširenih tumora. Obično su to unilateralne metastaze. Puno su rjeđe udaljene metastaze nego kod supraglotičnih i sublotičnih tumora stoga je i njihova dugoročna prognoza puno bolja.

**Subglotički karcinomi** su najrjeđi i mogu se širiti u svim smjerovima. Širenjem prema gore zahvaća paraglotiski prostor i fiksira glasnice, širenjem prema straga zahvaća hipofarinks i jednjak, a širenjem prema naprijed zahvaća krikoidnu hrskavicu i štitnu žlijezdu. Širenje u cervikalne limfne čvorove je rjeđe nego u paratrahealne limfne čvorove (16).

### 1.3.3. Ostali zloćudni tumori grkljana

**Neuroendokrini tumori grkljana** su rijetki tumori koji se obično javljaju na supraglotisu. Rano daju metastaze u vratne limfne čvorove i naposljetku se šire u udaljene organe ( pluća, jetra, kosti ). Liječe se kirurški i onkološki.

**Mukozni melanomi** su jako rijetki tumori grkljana. Također se većina javlja na supraglotisu. Dokazuju se imunohistokemijski preko S-100 i HMB-45. Liječe se kirurški.

**Adenoid cistični karcinom** podjednako se javlja u oba spola. Obično ga nalazimo u subglotisu kao glatku submukoznu masu. Često lokalno recidiviraju i daju metastaze u pluća preskakajući vratne limfne čvorove.

**Sarkomi grkljana** su vrlo rijetki tumori. Obično ih nalazmo u obliku hondrosarkoma. Obično zahvaćaju krikoidnu i tiroidnu hrskavicu dok su aritenoidi i epiglotis rjeđe zahvaćeni. Sporo rastu i imaju veliki potencijal za lokalni recidiv. Rijetko daju cervikalne i udaljene metastaze. Liječenje je kirurško i onkološko.

**Limfomi grkljana** su jako rijetki i obično su to limfomi B stanica. Liječenje je isključivo onkološko (16).

## 1.4. Dijagnostika tumora grkljana

### 1.4.1. Klinička slika

Klinička slika tumora grkljana ovisi od lokalizacije i proširenosti tumora u grkljan i okolinu. Karcinomi nastaju u svakoj regiji i gotovo su podjednako zastupljeni u supraglotidnoj i glotidnoj, a veoma malo u subglotidnoj regiji. Najčešća je lokalizacija u glotidnoj regiji na glasnici (1).

Najčešći simptomi su promuklost, suhoća grla, otežano i bolno gutanje. Promuklost se rano javlja u glotičkih kacinoma, ali se može javiti kao simptom u proširenih supraglotičkih i subglotičkih karcinoma. Otežano gutanje i suhoća grla su najčešće povezani sa supraglotičkim karcinomima. Bolno gutanje upućuje na širenje tumora na bazu jezika i hipofarinks. Jedostrana otalgija upućuje na širenje tumora na homolateralnu stranu baze jezika. Hemoptiza se pojavljuje obično kod ulceriranih tumora koji involviraju krvne žile. Stridor i otežano disanje javljaju se

kod velikih egzofotičnih supraglotičnih tumora ili kod transglotičnih tumora. Čvor na vratu kao prvi simptom isključivo se javlja kod supraglotičkih karcinoma (17).

### 1.4.2. Kliničke pretrage

Najvažniji korak u postavljanju dijagnoze karcinoma grkljana je uzimanje anamneze i klinički pregled. Nakon uzimanja opširne anamneze o simptomima, životnim navikama, informacija o prethodnim tumorima, drugim kroničnim bolestima ili prethodnim operacijama pristupa se detaljnom kliničkom pregledu. Detaljno se palpira vrat u potrazi za metastazama ili znakovima lokalne ekstezije tumora van grkljana. Endoskopom bilo rigidnim bilo fleksibilnim pregleda se orofarinks, grkljan i hipofarinks te postavlja dijagnoza. Definitivna dijagnoza karcinoma grkljana postavlja se direktoskopskim uzimanjem uzoraka tkiva grkljana uz patohistološko postavljanje dijagnoze. Dodatne pretrage uključuju CT vrata koji može pomoći u procjeni lokalne proširenosti tumora te proširenosti na cervikalne limfne čvorove. Istu svrhu ima i MR samo je inferiorniji od CT pretrage u procjeni proširenosti na hrskavice grkljana. Ultrazvuk vrata je najbolja metoda za procjenu proširenosti tumora na cervikalne limfne čvorove. Kod submukoznih karcinoma ulogu u postavljanju ispravne dijagnoze može imati PET-CT pretraga. Njezina najveća vrijednost je u praćenju operiranih pacijenata koji su prošli postoperativnu onkološku terapiju.

Nakon dijagnostičke obrade svaki tumor grkljana klasificiramo tzv. TNM sistemom ( razvio American Joint Committee on Cancer ). T označuje veličinu i lokalnu proširenost tumora ( od T1-T4; različit je za svaku podjedicu grkljana). T1 i T2 su tzv. rani karcinomi, T3 i T4 tzv. kasni ili prošireni karcinomi. N označuje stupanj proširenosti na limfne čvorove vrata ( N0- nema cervikalnih metastaza, N1-N3 koje su veličine metastaze i koje etaže limfnih čvorova vrata zahvaćaju ). M označuje prisutnost udaljenih metastaza ( M0- nema metastaza, M1 prisutne udaljene metastaze ).

TNM sistem nam omogućuje odabir ispravnog modaliteta liječenja za svakog pacijenta i procjenu očekivanog petogodišnjeg preživljenja s obzirom na odabranu terapiju.

## 1.5. Terapija tumora grkljana

### 1.5.1. Kirurško liječenje

**Premaligne promjene** grkljana isključivo se liječe direktoskopskom mikrokirurškom ekscizijom. To može biti klasična ekscizija ili ekscizija uz pomoć lasera. Radioterapija je indicirana samo kod višestruko rekurirajućih karcinoma in situ koji zahvaćaju obje glasnice.

Kirurško liječenje je dugačije s obzirom na podjedinicu grkljana i na TNM status.

**Supraglotički** T1 i T2 karcinomi kirurški se liječe laserskom transoralnom ekscizijom ili transcervikalnom parcijalnom horizontalnom laringektomijom. Kasni karcinomi liječe se subtotalnom ili totalnom laringektomijom uz eventualnu parcijalnu glosektomiju baze jezika. Kod ranih karcinoma potrebna je elektivna selektivna disekcija jugularnog cervikalnog lanca limfnih čvorova. Kod metastaza na vratu potrebno je učiniti klasičnu radikalnu disekciju ili neku od njenih modifikacija.

**Glotički** T1 karcinomi liječe se transoralnom laserskom kordektomijom tip III-V ili transcervikalnom kordektomijom. T2 karcinomi transcervikalnom parcijalnom vertikalnom laringektomijom ili transoralnom laserskom koredektomijom tipa V.

T3 karcinomi liječe se totalnom laringektomijom eventualno i subtotalnom laringektomijom. T4 karcinomi liječe se totalnom laringektomijom uz lobektomiju ipsilateralnog lobusa štitne žlijezde. Ipsilateralna elektivna selektivna disekcija indicirana je samo kod T3 i T4 karcinoma. Kod metastaza na vratu potrebno je učiniti klasičnu radikalnu disekciju ili neku od njenih modifikacija.

**Subglotički** karcinomi se zbog lokalizacije i nemogućnosti dobre rekonstrukcije liječe prije svega totalnom laringektomijom ili primarnom radioterapijom. Ipsilateralna elektivna selektivna disekcija indicirana je samo kod T3 i T4 karcinoma. Kod metastaza na vratu potrebno je učiniti klasičnu radikalnu disekciju ili neku od njenih modifikacija (18).

### 1.5.2. Konzervativno liječenje

Konzervativno liječenje uključuje radioterapiju i kemoterapiju. Općenito histološki slabije diferencirani karcinomi bolje reagiraju na onkološku terapiju nego dobro diferencirani karcinomi.

U razvijenim zemljama radioterapija ima jednake rezultate kao i kirurška terapija je kod T1 i T2 karcinoma. Međutim u Hrvatskoj takvi rezulatati nisu dosegnuti prije svega zbog dugog čekanja na početak radioterapije i nemogućnost bifrakcioniranja terapije. Primarna radioterapija kod kasnih karcinoma je inferiornija prema kirurškom liječenju, a pogotovo ako je provedena i adjuvantna radioterapija.

Obično radioterapiju koristimo kao dodatnu terapiju nakon kirurškog liječenja. Takva terapija za kasne karcinome grkljana daje veće stope petogodišnjeg preživljenja.

Postoperativna radioterapija supraglotičkih karcinoma indicirana je kod T3 i T4 karcinoma i kod pozitivnih limfnih čvorova na vratu. Radioterapija kod ranih karcinoma indicirana je samo kod histološki dokazane inkompletne kirurške ekscizije.

Postoperativna radioterapija kod glotičkih i subglotičkih karcinoma indicirana je kod T4 tumora i kod pozitvnih limfnih čvorova na vratu. Radioterapija kod ranih karcinoma indicirana je samo kod histološki dokazane inkompletne kirurške ekscizije (18).

Postoperativna kemoterapija u najmanje 2 ciklusa ( obično Cisplatina ) indicirana je kod velikih tumora sa probojem tiroidne hrskavice, kod višestruko pozitivnih limfnih čvorova na vratu, kod ekstrakapsularnog širenja tumora te sumnje na metastaziranje u pluća.

### 1.5.3. Prognoza i praćenje

Pacijenti se prate prvu godinu svakih mjesec dana. Drugu i treću godinu svaka 2 mjeseca, a četrvrtu i petu svakih 4 do 6 mjeseci. Praćenje uključuje endoskopski pregled i palpacijski pregled vrata. Potrebno je nekoliko puta godišnje učiniti UZV vrata i RTG pluća, pogotovo u prve dvije godine praćenja. Dobro je učiniti CT vrata nakon 8 i nakon 16 mjeseci postoperativno radi praćenja učinka liječenja i otkrivanja eventualnog recidiva tumora.

Petogodišnje preživljenje kod ranih karcinoma glotisa je visoko. Faktori koji smanjuju preživljenje ranih karcinom glotisa su inkompletna kirurška ekscizija i pozitivni limfni čvorovi. Slabije preživljenje imaju rani karcinomi supraglotisa i subglotisa prije svega što rano daju lokalne cervikalne metastaze. Kasni karcinomi grkljana imaju puno bolje preživljenje nego supraglotički karcinomi pogotovo ako nemaju pozitivne limfne čvorove.

Čimbenici koji smanjuju preživljenje su: ekstrakapsularno širenje, intravaskularna invazija, višestruko pozitivni čvorovi na vratu, perineuralna invazija i lokalno širenje tumora izvan

grkljana. Općenito najbolje petogodišnje preživljenje imaju karcinomi glotisa, potom slijede karcinomi subglotisa, a najlošije petogodišnje preživljenje imaju karcinomi supraglotisa (16).

### 1.6. Laringofaringealni refluks

1996. J.A.Koufman i suradnici po prvi put u literaturi spominju pojam laringofaringealni refluks i opisuju njegove manifestacije u području laringofarinksa (11). 2002. godine Američka akademija za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata **uvodi u nomenklaturu naziva laringofaringealni refluks za povrat želučanog sadržaja u područje grkljana i hipofarinksa** (12). Za razliku od GER-a, povrat želučanog sadržaja u grlo nikada nije fiziološko i dovodi do teških i dugotrajnih posljedica na sluznici laringohipofarinksa (19).

#### 1.6.1. Epidemiologija LPR-a

LPR i GER su dvije različite, ali međusobno povezane bolesti. Razlikuju se po simptomatologiji i po načinu nastanka. Jednu dijagnosticira i liječi otorinolaringolog, a drugu gastroenterolog. LPR uzrokuje disfunkcija gornjeg ezofagealnog sfinktera, a GER disfunkcija donjeg ezofagealnog sfinktera. LPR je pretežito dnevni ( tihi refluks ) i uvijek je patološki. Dok je GER tzv. glasni ( noćni refluks ) i javlja se u ležećem položaju. Kod GER-a je poremećen motitlitet jednjaka dok je kod LPR-a motilitet jednjaka normalan (15).

Rezultati recentnih istraživanja pokazuju vezu LPR-a s mnogim bolestima gornjih dišnih putova. Najčešće se laringofaringealni refluks manifestira u području grkljana: laringospazam, fiksacija aritenoida, laringealna stenoza i Reinkeov edem, čvorići na glasnicama, rekurentni respiratorni papilom, rekurentne leukoplakije i karcinom grkljana (20-28) , ali se može manifestirati i u području ždrijela, pluća, sinusa i uha (29-32).

Najčešći simptomi laringofaringealnog refluksa su: promuklost ili disfonija, kronično čišćenje grla, globus faringeus, disfagija, žgaravice, kronični kašalj, osjećaj postnazalne sekrecije i epizode gušenja (33).

Točnu vezu između maligne alteracije i laringofaringealnoga refluksa treba još istražiti, ali dosadašnja istraživanja pokazuju da su većinom bolesnici s malignim tumorom grkljana pušači i da većinom imaju laringofaringealni refluks (27,28).

### 1.6.2. Patogeneza LPR-a

Mukoza grkljana je izrazito osjetljiva na djelovanje želučanog refluksata (7-9). Grkljan nema peristaltiku kao jednjak, a i nedostaje mu obrambena i puferska uloga sline. Do tri refluksa tjedno u laringofarinks može uzrokovati znatna oštećenja na mukozi grkljana (19). Lezije na grkljanu se potom mogu manifestirati kao simptomi laringitisa (33).

Postoje dvije teorije koje objašnjavaju patogenezu refluksnog laringitisa.

Prva je teorija direktne ozljede grkljana i okolnog tkiva kiselinom i pepsinom. Grkljan nema zaštitnih mehanizama čišćenja i prekrivenosti slinom koja neutralizira kiselinu te želučani refluks ostaje nerazrijeđen dulje vrijeme rezultirajući ozljedom tkiva (34).

Druga je teorija refleksa. Ova teorija objašnjava patogenezu ezofagealnim refluksom koji potiče vagalno posredovane reflekse rezultirajući kroničnim čišćenjem grla i kašljem što dovodi do ozljede (34). Najvjerojatnije je da laringitis nastaje kombinacijom ova dva mehanizma.

Želučani refluksat normalno sadrži kiselinu i pepsin. Pepsin je enzim proteinaza i nalazi se isključivo u želucu. Proizvode ga stanice želučane sluznice u obliku inaktivnog oblika, pepsinogena. Pepsinogen prelazi u pepsin u kiselom mediju (pH ispod 6,5). Maksimalna aktivnost pepsina je pri pH 2, a inaktivira se kada je pH iznad 6,5 (35). Pepsin ostaje stabilan, ali neaktivan pri pH vrijednosti do 8. Prilikom refluksa želučane kiseline u laringofarinks mijenja se pH na sluznici grkljana (normalna vrijednost pH je 6,8 ) na vrijednosti pH ispod 6,5. Tada pepsin uzrokuje depleciju carbonic anhydrase III(CAIII), enzima koji je odgovoran za stvaranje bikarbonatnih iona. Bikarbonatni ioni direktno neutraliziraju kiseli želučani sadržaj na sluznici grkljana. Deplecijom CA III gubi se protektivna uloga bikarbonatnih iona na sluznici grkljana (36,37).

Dokazano je da pepsin inhibira ekspresiju protektivnih proteina kao što su mucin 2, mucin3, mucin 5A, mucin 5B, Sep 53, Sep 70 i E-cadherina proteina koji igraju važnu ulogu u održavanju integriteta staničnog epitela. Manjak tih proteina dovodi do promjene staničnog odgovora na traumu i uzrok je nastanku oštećenja mukoze grkljana (38).

Mnoga istraživanja pojavnosti larigofaringalnog refluksa uz pomoć 24 satne pH metrije kod pacijenta sa kroničnim laringitisom nisu mogla dokazati povrat kiselog sadržaja iz želuca u laringofarinks u čak jedne petine pacijenata. Takvi pacijenti nisu reagirali na klasičnu terapiju usmjerenu na smanjenje količine želučane kiseline antihistaminicima i IPP-om. Uzrok oštećenja

grkljana kod takvih pacijenata je ostao nejasan. Tek kombinacijom 24 satne pH metrije ( mjeri Ph vrijednosti na više mjesta ) i intraluminalne multikanalne impedance ( mjeri ukupan broj refluksa ) utvrđeno je da oko 20 % refluksa u laringofarinks je neaciditetan te da glavnu ulogu u oštećenju sluznice grkljana vjerojatno ima pepsin. Nastavak tih istraživanja pokazao je da mukoza grkljana posjeduje receptore za pepsin te da uz pomoć tzv. endocitoze pohranjuje pepsin u obliku pepsinogena kada je pH nepovoljan. Tako pohranjeni pepsinogen ostaje unutar stanica sve dok ne dođe do promjene pH vrijednosti. Tada se pepsin ponovno aktivira i uzrokuje ošetećenje na mukozi grkljana. Zaključak je svih istraživanja da pepsin uzrokuje oštećenja kod oba tipa refluksa tj. aciditetnog i neaciditetnog ( 39,40).

LPR se smatra značajnim rizičnim faktorom za razvoj planocelularnog karcinoma, ali uzročna veza još nije dokazana. Poznato je da kronični refluks u jednjak može izazavati metaplaziju mukoze i posljedično tome povećan rizik za razvoj adenokarcinoma jednjaka. Slična poveznica još nije nađena za LPR i planocelularni karcinom laringofarinksa.

Istraživanja biopsija kultura stanica normalne sluznice grkljana i FaDu planocelularnih stanica hipofarinksa pomoću mikroRNA i Western blot analize pokazale su kako pepsin dodan kulturama stanica potiče proliferaciju stanica te značajano mijenja ekspresiju 27 gena povezanih sa karcinogenezom i mijenja ekspresiju 22 mikroRNA inače promijenjenih kod karcinoma glave i vrata. Pepsin je utvrđen Western blot analizom u 60% biopsija karcinoma grkljana, a nije pronađen kod normalnih kontrolnih uzoraka (41).

### 1.6.3. Klinička slika

Najčešći simptomi laringofaringealnog refluksa su (33):

- promuklost ili disfonija (92-100 %)
- kronično čišćenje grla (50 %)
- globus faringeus (47 %)
- disfagija (27 %)
- žgaravice (6-11 %),
- kronični kašalj
- osjećaj postnazalne sekrecije
- epizode gušenja

Najčešće se laringofaringealni refluks manifestira kao kronični laringitis. Uz navedene simptome LPR-a takvim se pacijentima tijekom otorinolaringološkog endoskopskog pregleda grkljana mogu ustanoviti neki od karakterističnih kliničkih znakova LPR-a. To su obično hiperemija mukoze grkljana, hipertrofija stražnje komisure, pseudosulkus vokalis, edem glasnica i drugih struktura glotisa, ventrikularna obliteracija, subglotični edem, granulom glasnica te prisutnost guste laringealne sluzi (15).

LPR može uzrokovati i ozbiljnije smetnje na grkljanu kao što su: laringospazam, fiksacija aritenoida, laringealna stenoza i Reinkeovi edemi, čvorići na glasnicama, rekurentni respiratorni papilomi, rekurentne leukoplakije i karcinomi grkljana (20-28).

LPR se također može manifestirati u području ždrijela, pluća, sinusa i uha kao kronični faringitis, astma ili serozni otitis (29-32).

### 1.6.4. Anamneza

Osnovni postupak za postavljanje sumnje na LPR je otorinolaringološki pregled. To uključuje uzimanje informacija o prehrambenim navikama, tegobama , vremenu javljanja tegoba, uzimanju lijekova i informacija o eventualnim prijašnjim tegobama od strane grla i želuca. Najčešći simptomi laringofaringealnog refluksa su: promuklost ili disfonija, kronično čišćenje grla, globus faringeus, disfagija, žgaravice, kronični kašalj, osjećaj postnazalne sekrecije i epizode gušenja (33).

U postavljanju sumnje na LPR pomaže nam upitnik po Belafskom u kojem je kvantificirano 9 karakterističnih simptoma LPR-a: RSI (reflux symptom index) (42-44).

**REFLUX SYMPTOM INDEKS ( RSI ):**

1. Promuklost (ocjene: 0- 5 )
2. Potreba za čišćenjem grla (ocjene: 0- 5 )
3. Pojačana salivacija ili postnazalni drip (ocjene: 0- 5 )
4. Otežano gutanje (ocjene: 0- 5)
5. Kašalj nakon jela ili ležanja (ocjene: 0- 5)
6. Otežano disanje ili napadaji gušenja (ocjene: 0- 5)
7. Stalno prisutan kašalj (ocjene: 0- 5)
8. Osjećaj stranog tijela u grlu (ocjene: 0- 5)
9. Žgaravica ili bol iza prsne kosti (ocjene: 0- 5)

Opis ocjena: 0= nema simptoma; 1= lakog stupnja; 2= umjerenog stupnja; 3= srednje teškog stupnja; 4= teškog stupnja; 5= najtežeg stupnja

Maksmalan broj bodova je 45. Ukupna vrijednost RSI iznad 13 bodova pobuđuju sumnju na postojanje laringofaringealnog refluksa.

### 1.6.5. Klinički nalazi

Nakon detaljnog uzimanja anamneze slijedi endovideolaringoskopija koja nam daje podatke o postojanju nekih od karakterističnih kliničkih znakova LPR-a. Najčešći klinički znakovi su: hiperemija mukoze grkljana, hipertrofija stražnje komisure, pseudosulkus vokalis, edem glasnica i drugih struktura glotisa, ventrikularna obliteracija, subglotični edem, granulom glasnica te prisutnost guste laringealne sluzi (15).

U postavljanju sumnje na LPR pomaže nam upitnik po Belafskom u kojem je kvantificirao 8 najčešćih kliničkih nalaza LPR-a: RFS (reflux finding score) (42-44).

**REFLUX FINDING SCORE ( RFS ):**

1. Subglotični edem / pseudosulkus vokalis (0= nema; 2= prisutan)
2. Ventrikularna obliteracija (0= nema; 2= parcijalna; 4= kompletna)
3. Eritem ili hiperemija (0= nema; 2= samo aritenoida; 4= difuzna)
4. Edem glasnica (0= nema; 1= blag; 2= umjeren; 3= ozbiljan; 4= polip)
5. Difuzni laringealni edem (0= nema; 1= blag; 2= umjeren ; 3= ozbiljan; 4= opstrukcija)
6. Hipertrofija stražnje komisure (0= nema; 1= blag; 2= umjeren; 3= ozbiljan; 4= opstrukcija)
7. Granulom ili granulacije (0= nema ; 2= prisutan)
8. Gusta endolaringealna sluz (0= nema ; 2= prisutan)

Maksmalan broj bodova je 26. Ukupna vrijednost RFS iznad 7 bodova pobuđuje sumnju na postojanje laringofaringealnog refluksa.

### 1.6.6. Test inhibitorima protonske pumpe

Pacijentima kojima je kliničkim pregledom izražena sumnja na postojanje LPR-a može se uvesti terapija blokatorima protonske pumpe u dozi dva puta dnevno kroz 2 mjeseca. Ukoliko dođe do smirivanja ili nestajanja simptoma možemo zaključiti da je terapija ispravno uvedena i da su navedene tegobe vjerojatno bile posljedica LPR-a. S obzirom na trenutne simptome pacijentu se produžuje terapija u manjoj dozi ili se savjetuje promjena prehrambenih navika.

### 1.6.7. 24 satna pH-metrija jednjaka i grkljana

Jedina dijagnostička metoda koja može objektivno pokazati promjene u pH vrijednostima i broj refluksnih epizoda je 24-satna pH-metrija. Nedostatak metode je kompliciranost izvođenja, invazivnost i nemogućnost otkrivanja epizoda tzv. neaciditetnih refluksa. Za otkrivanje tzv. aciditetnog i neaciditetnog refluksa najbolje je kombinirati 24-satnu pH-metriju i intraluminalanu impedancu. Jedna pokazuje ukupan broj aciditenih refluksa, a druga ukupan broj svih refluksa. Iz tih podataka se vrlo jednostavno može zaključiti koliko je refluksa bilo neaciditenog tipa.

### 1.6.8. Multikanalna intraluminalna impedanca

Ova dijagnostička metoda mjeri promjenu impedancije u lumenu jednjaka dok bolus prolazi kroz metalne prstenove na koje je postavljen kateter. Dok hrana ili tekućina prolaze kroz jednjak tj. metalni prsten povećava se vodljivost, a smanjuje impedancija. Takvo mjerenje otpornosti na više mjesta omogućuje određivanje smjera kretanja bolusa na temelju vremenske razlike u ulasku i izlasku bolusa. Ona nam omogućuje utvrđivanje ukupnog broja refluksa unutar mjerenog vremena.

### 1.6.9. Određivanje pepsina iz sline

Budući da pepsin ima primarnu ulogu u nastanku peptičke ozljede sluznice grkljana i hipofarinksa razvijena je metoda dokazivanja pepsina u slini jednostavnim ELISA testom. Prema nekim istraživanjima takva analiza pepsina iz sline pacijenta ima vrlo visoku specifičnost i senzitivnost te može služiti kao relativno jeftina i brza pretraga za dokazivanje LPR-a. Međutim do danas takva metoda još nije uvedena kao rutinski i svakodnevni postupak u dijagnostici LPR-a.

### 1.6.10. Liječenje LPR-a

Terapija LPR-a je kod blažih slučajeva isključivo nutritivna, a kod teškog i životno ugrožavajućeg LPR-a uz nutritivnu provodi se i medikamentozna terapija. Pacijentima se daju savjeti za promjenu svakodnevnih navika te promjenu načina ishrane. Predlaže se izbjegavanje obilnih i kasnih obroka. Izbjegavanje namirnica i pića koji potiču produkciju želučane kiseline. Prestanak pušenja i konzumiranja alkoholnih pića. Kod pretilih osoba savjetuje se smanjenje tjelesne mase te umjerena tjelesna aktivnost (15).

Ukoliko se radi o teškom ili životno ugrožavajućem LPR-u ili ukoliko pacijetni nisu dovoljno motivirani za promjene u načinu života uvodi se madikamentozna terapija. Stanardna terapija podrazumijeva terapiju blokatorima protonske pumpe u dozi dva puta na dan kroz minimalno 8 tjedana. U životno ugrožavajućeg LPR-a inhibitori se ordiniraju 3-4 puta dnevno. Takvom terapijom smanjuje se produkcija želučane kiseline, smanjuje se aktivnost pepsina, a ujedno i pojačava tonus gornjeg ezofagealnog sfinktera. Dakle, terapija blokatorima protonske

pumpe smanjuje kiselost refluksata i broj refluksa u laringofarinks, a time i negativno djelovanje želučane kiseline i pepsina na mukozu laringofarinksa.

Kirurška terapija refluksa obično se primjenjuje kada konzeravativni načini liječenja ne daju zadovoljavajuće rezultate kroz duže razdoblje liječenja i kada je dijagnostičkim pretragama dokazana slabost donjeg ezofagealnog sfinktera. Postoje načini kirurškog liječenja refluksa koji su usmjereni na korekciju funkcije donjeg ezofagealnog sfinktera. To su :

- totalna fundoplikacija po Nissenu
- transtorakalna parcijalna fundoplikacija po Belsey-u
- gastropeksija po Hill-u sa svim modifikacijama

# 2. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA

Hipoteza ovog istraživanja je da laringofaringealni refluks i pepsin sudjeluju u nastanku dobroćudnih i zloćudnih promjena sluznice grkljana stoga će razina pepsina u ispitanika s dobroćudnim i zloćudnim promjenama grkljana biti povišena i biti značajno viša u odnosu na kontrolne ispitanike koji nemaju laringofaringealnog refluksa.

# 3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja su:

1. Istražiti povezanost simptoma LPR-a s nastankom dobroćudnih i zloćudnih promjena grkljana
2. Istražiti poveznost intenziteta simptoma s rezultatima ELISA testom utvrđivane razine pepsina u slini
3. Istražiti poveznost intenziteta simptoma s rezultatima imunohistokemijskog utvrđivanja prisutnosti pepsina u biopsijama grkljana
4. Istražiti povezanost nastanka dobroćudnih i zloćudnih promjena grkljana s rezultatima ELISA testa
5. Istražiti poveznost nastanka dobroćudnih i zloćudnih promjena grkljana s rezultatima imunohistokemije
6. Usporediti dijagnostičku vrijednost rezultata ELISA testom utvrđivane razine pepsina u slini s rezultatima imunohistokemijskog utvrđivanja prisutnosti pepsina u biopsijama grkljana

# 4. ISPITANICI I METODE

## 4.1. Ispitanici

Ovo istraživanje je prospektivna studija u koju je uključen 81 ispitanik, 29 žena i 52 muškarca (raspona dobi od 20 do 77 godina, medijan 50,37 godina). Ispitanici su podijeljeni u tri skupine: (a) 28 ispitanika s dobroćudnim promjenama grkljana (od 24 do 67 godina, medijan 46,57 godina), (b) 28 ispitanika sa zloćudnim promjenama grkljana (od 41 do 77 godina, medijan 58,50) i (c) 25 kontrolnih ispitanika bez simptoma i znakova laringofaringealnog refluksa (od 20 do 73 godine, medijan 45,52 godina).

Ispitanici su probrani među pacijentima koji su primljeni i liječeni na Klinici za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata Kliničkog bolničkog centra Osijek zbog dobroćudnih ili zloćudnih promjena grkljana.

Kontrolne ispitanike činili su pacijenti koji su na Kliniku za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata zaprimljeni radi operativnog liječenja iskrivljene nosne pregrade, a koji nisu imali simptome i znakove laringofaringealnog refluksa. Prilikom probira kontrolnih ispitanika koristili smo upitnike po Belafskom (Reflux symptom indeks, Reflux finding score) na temelju kojih se postavlja sumnja na postojanje laringofaringealnog refluksa.

Kriteriji za uključenje u studiju:

- dob ispitanika starija od 18 godina
- ispitanici kojima je histološki potvrđena dijagnoza zloćudne bolesti grkljana
- ispitanici kojima je histološki potvrđena dijagnoza dobroćudne promjene grkljana
- ispitanici operirani zbog iskrivljene nosne pregrade bez simptoma i znakova LPR-a (RSI<13, RFS<7)

Kriteriji za isključenje iz studije:

- ispitanici mlađi od 18 godina
- ispitanici koji uzimaju inhibitore protonske pumpe i/ili antibiotike ili su ih uzimali u posljednjih mjesec dana
- kontrolni ispitanici sa RSI > 13 i RFS > 7

Svim ispitanicima uzeta je detaljna povijest bolesti i učinjen videolaringoskopski pregled. Prije operativnog zahvata svi ispitanici dali su slinu radi utvrđivanja prisutnosti pepsina u slini te im je učinjena biopsija grkljana u općoj endotrahealnoj anesteziji.

Svi ispitanici prije pristupanja postupku ispitivanja upoznati su sa svrhom i protokolom studije te su potpisali informirani pristanak. Ispitivanje se provodilo uz odobrenje Etičkog povjerenstva KBC Osijek i Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Osijeku, a u skladu s Nurnberškim kodeksom i najnovijom revizijom Helsinške deklaracije.

## 4.2. Metode

### 4.2.1. ELISA

Za određivanje koncentracije pepsina u uzorcima sline koristili smo ELISA metodu. ELISA (od engl. Enzyme-Linked ImmunosSorbent Assay) se bazira na primjeni protutijela i promjene boje za određivanje koncentracija određenih supstanci. Korišten je komercijalno dostupan kit za određivanje pepsina: USCN LIFE SCIENCE Inc. Wuhan, China. Radi se o tzv. Sandwich ELISA s detekcijskim rasponom od 3,12ng/ml-200ng/ml. Jažice mikrotitarske pločice su prekrivene monoklonskim protutijelom specifičnim na pepsin. U jažice se dodaje uzorak zajedno sa biotiniliranim poliklonskim protutijelom na pepsin. Nakon inkubacije i ispiranja u jažice dodaje se avisin konjugiran sa enzimom HRP te konačno nakon inkubacije i ponovnog ispiranja supstrat. Jažice koje sadrže pepsin, protutijela, avidin HRP te supstrat obojaju se ovisno koncentraciji pepsina, a razina obojenja odredi na ELISA čitaču.

Od svakog ispitanika uzeto je 5-10 ml sline te pohranjeno u zamrzivaču na -80°C. Na dan analize uzorci su otopljeni na sobnu temperaturu, centrifugirani radi otklanjanja krupnih čestica te testirani prema uputama proizvođača, kako slijedi:

1. 100 μL uzoraka standarda (pripremljenih prema uputama proizvođača), negativne kontrole i ispitivanih uzorka razrjeđenja 1:200 u PBS-u pipetirali smo u određene jažice i inkubirali 120 minuta na temperaturi od 37 $^{0}$ C. Nakon isteka vremena inkubacije odstranili smo tekućinu iz jažica.
2. U jažice smo potom pipetirali 100 μL reagensa A (sadrži biotinilirano poliklonsko protutijelo) za detekciju i inkubirali 60 min. na 37 $^{0}$C.

3. Jažice smo isprali 3x sa 400 μL pufera za ispiranje.
4. Dodali smo 100 μL detekcijskog regensa B (sadrži avidin HRP) u svaku jažicu i inkubirali 60 minuta na 37 $^{0}$C.
5. Ponovili smo postupak pranja, 3x sa 400 μL pufera.
6. Dodali smo 90 μL topine supstrata u svaku jažicu i inkubirali 15-30 minuta na 37 $^{0}$C, zaštićeno od svjetla.
7. Na kraju dodali smo 50 μL otopine za zaustavljanje reakcije.

Po završetku testiranja izmjerena je apsorbancija na 450 nm na uređaju 93200 PR3100 TSC Microplate Reader (BioRad, SAD). Pomoću uzoraka standarda iscrtali smo grafički prikaz, na kojemu je na os x prikazana vrijednost apsorbancije, dok je na osi y prikazana vrijednost koncentracije pepsina. Iz krivulje smo očitali konačnu vrijednost koncentracije pepsina u slini.

### 4.2.2. Imunohistokemija

Tkivo uzorkovano za imunohistokemijsku analizu:

- promijenjeno tkivo grkljana: polipi glasnica, granulomi glasnica, Reinkeovi edemi, vokalni noduli, laringealna papilomatoza, in situ karcinomi, invazivni karcinomi
- sluznica interaritenoidnog područja grkljana kod kontrolnih ispitanika

Ekspresija proteina u uzorcima tkiva praćena je imunohistokemijskom analizom uzoraka. Imunohistokemijska analiza učinjena je na trajnim preparatima fiksiranim 10% neutralnim formalinom, uklopljenim u parafin te rezanim mikrotomom na debljinu 3-5 mikrometara. Rezovi su deparafinizirati kroz niz, za to predviđenih, otopina (ksilol, 100% etanol, 96% etanol i 70% etanol). Na preparatima se nakon toga izvrši blokiranje endogene peroksidaze 0,3% vodikovim peroksidom te se nakon toga provede izlaganje epitopa (antigen retrieval) u citratnom puferu (pH=6,0), zagrijavanjem u mikrovalnoj pećnici tijekom približno 5 minuta. Primarno protutijelo nanosi se na preparate koji se inkubiraju na 4°C preko noći, dok se na negativne kontrole nanosi PBS (pH=7,4) bez primarnog protutijela te se također drže preko noći u istim uvjetima kao i preparati na koje je naneseno primarno protutijelo. Kao pozitivne kontrole koristilo se humano tkivo želuca. Pozitivne kontrole prolaze potpuno isti postupak kao ispitivani preparati. Nakon inkubacije s primarnim protutijelom, rezovi se ispiru u PBS-u u koji je dodan Tween (0,05%). Zatim se na preparate nanosi sekundarno protutijelo, koje stoji na sobnoj temperaturi 45 minuta.

Slijedi još 4 ispiranja u PBS-u s 0,05% Tween-a nakon čega se preparati inkubiraju sa Streptavidinom konjugiranim s peroksidazom iz hrena (Streptavidin-HRP) na sobnoj temperaturi tijekom slijedećih 45 minuta. Nakon još 4 ispiranja u PBS-u s Tween-om, nanosi se otopina 3,3'-diaminobenzidina (DAB, supstrat). Nakon 4 ispiranja u PBS-u s Tween-om, preparati se kontrastno oboje hematoksilinom (counterstaining) i dehidriraju u za to predviđenim otopinama (70% etanol, 96% etanol i 100% etanol te ksilol). Na kraju postupka na preparat se nanosi canada balzam i na njega stavlja pokrovno stakalce. Preparati su fotografirati digitalnim fotoaparatom spojenim na mikroskop. Koristio se QuickPHOTO Pro softver za slikanje i obradu slike.

### 4.2.3. Patohistologija

Odstranjeno tkivo grkljana (polipi glasnica, granulomi glasnica, Reinkeovi edemi, vokalni noduli, laringealna papilomatoza, in situ karcinomi, invazivni karcinomi te sluznica interaritenoidnog područja grkljana kod kontrolnih ispitanika) analizirano je histomorfometrijski. Materijal za analizu fiksiran je u 10% neutralnom puferiranom formalinu do 24 sata na sobnoj temperaturi. Nakon fiksacije tkivo je dehidrirano u nizu alkohola od niže koncentracije prema višoj (70%, 96%, 100%). Zatim smo iz tkiva istisnuli alkohol. U tu svrhu koristili smo ksilol. Na kraju smo tkivo stavili u medij za impregnaciju, parafin tališta 56-60° C. Taj dio pripreme tkiva obavili smo u aparatu Histtokinete – tkivnom procesoru i trajao je oko 18 sati. Iz tkivnog se procesora komadići tkiva uklapaju u tekući parafin. Formiraju se kalupi pogodni za rezanje blokova na kliznom mikrotomu. Debljina rezova je od 3 do 5 mikrona. Nakon toga ih se na vodenoj kupelji rasteže i montira na predmetno staklo. Tako narezani i montirani preparati sušili su se u termostatu preko noći na temperaturi 56-60°C i zatim su bili spremni za bojanje. Prije bojanja preparati su deparafinirani ksilolom, zatim tretirani silaznim nizom alkohola (100%, 96%,70%) i u konačnici ispirani u vodi.

Za bojanje preparata za patohistološku dijagnozu koristili smo hemalaun – boju za jezgre i eozin – boju za citoplazmu. Nakon bojanja preparate ispiremo u vodi i tretiramo uzlaznim nizom alkohola (70%, 96%, 100%) i na kraju u ksilolu izbistrimo. Na predmetna stakla stavljamo pokrovna stakalca.

Tako pripremljene preparate pregledava patolog i postavlja patohistološku dijagnozu. Sve uzorke analizirao je isti patolog uz pomoć svjetlosne mikroskopije.

### 4.2.4. Videolaringoskopija

Prije početka studije svim ispitanicima učinjena je endoskopija grkljana rigidnim videolaringoskopom ili fleksibilnim videofiberfaringolaringoskopom. Korišteni su endoskopi tvrtke Xion, Wolf i Olympus.

Metoda je korištena za probir pacijenatna u pojedine skupine i za točnije ispunjavanje RFS upitnika.

### 4.2.5. Upitnici RSI i RFS po Belafskom

Reflux symptom indeks (RSI) i Reflux finding score (RFS) po Belafskom su najrašireniji i najčešće korišteni upitnici za postavljanje sumnje na postojanje laringofaringealnog refluksa.

RSI sastoji se od devet najčešćih kliničkih simptoma laringofaringealnog refluksa koji su stupnjevani: promuklost, čišćenje grla, pojačana sekrecija u grlu, otežano gutanje, kašalj, smetnje disanja, osjećaj stranog tijela u grlu, žgaravica, bol u prsima. Intenzitet simptoma stupnjevan je od 0 do 5. Sve vrijednosti RSI iznad 13 pobuđuju sumnju na postojanje laringofaringealnog refluksa. Ispitanici s deformacijom nosne pregrade bez simptoma LPR-a i s RSI manjim od 13 uvršteni su u kontrolnu skupinu.

RFS sastoji se od 8 najčešćih kliničkih znakova laringofaringealnog refluksa koji su stupnjevani: pseudosulcus vocalis ili infraglotički edem, ventrikularna obliteracija, eritem/hiperemija grkljana, edem glasnica, difuzni laringealni edem, hipertrofija sluznice stražnje komisure, granulacije i granulomi grkljana te endolaringealni sekret. Lokalni laringoskopski nalaz stupnjevan je od 0 do 4. Sve vrijednosti RFS iznad 7 pobuđuju sumnju na postojanje laringofaringealnog refluksa. Ispitanici s deformacijom nosne pregrade bez simptoma LPR-a i s RFS manjim od 7 uvršteni su u kontrolnu skupinu.

Svim pacijentima sa dobroćudnim i zloćudnim promjenama na grkljanu napravljen je RSI i RFS radi usporedbe s rezultatima dobivenim ELISA metodom i imunohistokemijom. Testovi su također korišteni radi što boljeg probira ispitanika za kontrolnu skupinu.

## 4.3. Statistička obrada podataka

Prikupljeni podaci obrađeni su statističkim programom SPSS for Windows za osobna računala, verzija 19. Prije obrade podataka Kolmogorov-Smirnovljevim testom provjeren je normalitet distribucije promatranih numeričkih varijabli. Pri tome su mjere simetričnosti pokazale da distribucije većine numeričkih varijabli značajno odstupaju od normalne. Kako bi se poboljšala linearnost i smanjila asimetričnost distribucije provedene su odgovarajuće statističke transformacije, npr. logaritamska transformacija (log 10) ili drugi korijen (*engl. squareroot)* (vidjeti opširnije u Tabachnick i Fidell, 2007). S obzirom na provedenu transformaciju rezultata dopušteno je koristiti parametrijske statističke postupke. Statistički postupci provedeni su na transformiranim podacima, dok su u tablicama prikazane aritmetičke sredine i standardne devijacije netransformiranih rezultata (Howell, 2006). Brojčani podaci opisani su osnovnim mjerama sredine i raspršenja, dok su kategoričke varijable opisane apsolutnim i relativnim frekvencijama.

Za usporedbu dviju nezavisnih s obzirom na izmjerene numeričke (kontinuirane) varijable korišten je t-test za nezavisne uzorke s Bonferronijevom korekcijom. S obzirom da se iste skupine uspoređuju na nizu numeričkih varijabli povećava se vjerojatnost pogreške Tipa I, odnosno povećava se vjerojatnost odbacivanja istinite nul-hipoteze (dvije skupine se ne razlikuju statistički značajno). Kako bi se smanjila vjerojatnost ovog tipa pogreške korigirana je razina značajnosti ($\alpha$ razina) niza usporedbi tako da se $\alpha$ razina SVAKE usporedbe podijeli s brojem usporedbi (Bonferronijeva korekcija). Dakle, Bonferronijeva korekcija „postrožuje" razinu značajnosti za svaku usporedbu. U analizama je kao mjera veličine učinka korišten je Cohenov *d* (Cohen, 1988) prema kojem se veličina učinka (*d*) do 0,3 smatra malim učinkom, oko 0,5 srednjim/umjerenim učinkom, a iznad 0,8 velikim učinkom. Tako, na primjer, kod veličine učinka $d = 0{,}5$ postotak preklapanja dviju distribucija iznosi 80,26% što sugerira veliku sličnost među skupinama. Dakle, što je veći učinak manje je preklapanje među distribucijama rezultata u dvama skupinama, odnosno skupine se više razlikuju.

Za usporedbu triju nezavisnih skupina s obzirom na numeričke varijable korištene su jednostavna analiza varijance (ANOVA), jednostavna analiza kovarijance (ANCOVA) i multivarijatna analiza kovarijance (MANCOVA). Analiza kovarijance u odnosu na neke druge parametrijske testove, npr. jednosmjernu analizu varijance omogućava kontrolu nekih varijabli

koje bi eventualno mogle biti povezane s ispitivanim indikatorima, npr. dob, spol. Kako bi se ispitalo između kojih grupa točno postoji razlika u jednosmjernim analizama varijance kao post-hoc test odabran je Games-Howellov test koji se preporuča kada su poduzorci različite veličine te kada varijanca nije homogena. U analizama kovarijance kao mjera veličine učinka korištena je parcijalna kvadrirana eta ($\eta_p^2$) (Tabachnick i Fidell, 2007). Prema Cohenu (1988) granične vrijednosti za ovaj indikator su sljedeće: 0,01 = mali učinak, 0,06 = srednja veličina učinka, te 0,14 = veliki učinak. Za ocjenu značajnosti dobivenih rezultata odabrana je razina $\alpha$ = 0,05.

Za usporedbu kategorijalnih varijabli korišten je hi-kvadrat test. U slučajevima kada nisu zadovoljeni uvjeti za izračunavanje hi-kvadrat testa u kontingencijskim tablicama 2 X 2 korišten je Fisherov egzaktni test. Fisherov egzaktni test može se računati kada jedna ili više ćelija ima očekivanu frekvenciju manju od pet.

# 5. REZULTATI

## 5.1. Ispitanici uključeni u istraživanje

Podaci su prikupljeni za 81sudionika (52 muškarca i 29 žena), raspona dobi od 20 do 77 godine ($M$ = 50,37 godina; $SD$ = 13,61). Usporedbom dobi muškaraca i žena utvrđena je značajna razlika, $t(79) = 3{,}21$, $p = 0{,}002$, pri čemu su muškarci u prosjeku stariji ($M = 53{,}81$; $SD = 13{,}46$) od žena ($M = 44{,}21$; $SD = 11{,}76$).

Sudionici su podijeljeni u tri skupine, odnosno (1) skupinu s malignim promjenama ($n$ = 28), (2) skupinu s benignim promjenama ($n$ = 28), te (3) kontrolnu skupinu ($n$ = 25). Pri tome su u skupini s malignim promjene najčešće dijagnoze bile PCC (89,3%) i PAP (10,7%), dok su u skupini s benignim promjenama najčešće dijagnosticirane PG (50%) i RE (35,7%). Kod preostalih sudionika iz skupine s benignim promjenama dijagnosticirano je „Ostalo" (14,3%). U skupini sudionika s malignim promjenama osam pacijenata (28,6%) ima stadij T1, 11 stadij T2 (39,3%), šest stadij T3 (21,65), a troje pacijenata (10,7%) stadij T4.

Raspon dobi pacijenata iz skupine s malignim promjenama kreće se od 41 do 77 godina, a prosječna dob iznosi $M = 58{,}50$ godina ($SD = 9{,}24$). Raspon dobi pacijenata s dijagnosticiranim benignim promjenama kreće se između 24 i 67 godina, a prosječna dob iznosi $M = 46{,}57$ godina ($SD$ = 12,85). Naposljetku, raspon dobi sudionika iz kontrolne skupine kreće se od 20 do 73 godine s prosječnom dobi $M = 45{,}52$ godina ($SD = 15{,}73$).

Usporedbom dobi sudionika iz triju skupina jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) utvrđena je značajna razlika, $F(2,78) = 9{,}25$, $p = 0{,}001$, $\eta_p^2 = 0{,}19$. Post-hoc analizom (Games-Howell) utvrđeno je da su sudionici s malignim promjenama značajno stariji i od sudionika s benignim promjenama ($p = 0{,}001$) i od sudionika iz kontrolne skupine ($p = 0{,}001$). Sudionici s benignim promjenama i sudionici iz kontrolne skupine značajno se ne razlikuju s obzirom na dob. Također su skupine uspoređene s obzirom i na spolni sastav pri čemu je hi-kvadrat testom utvrđena značajna razlika, $\chi^2(2, N = 81) = 17{,}76$, $p = 0{,}001$.

Spolni sastav u trima skupinama prikazan je u Tablici 5.1.

Tablica 5.1. Spolni sastav po skupinama sudionika

| | | Skupina | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Maligne promjene | Benigne promjene | Kontrolna skupina | Ukupno |
| Spol | Muški | 26 (92,9%) | 11 (39,3%) | 15 (60%) | 52 (64,2%) |
| | Ženski | 2 (7,1%) | 17 (60,7%) | 10 (40%) | 29 (35,8%) |

Kao što se može vidjeti iz Tablice 5.1., najveći postotak muškaraca je u skupini s malignim promjenama, nakon čega slijedi kontrolna skupina, dok je najmanji postotak muškaraca u skupini s benignim promjenama.

## 5.2. Usporedba triju skupina s obzirom na RSI simptome

### 5.2.1. Analiza povezanosti dobi sa RSI simptomima

S obzirom da su utvrđene značajne razlike između muškaraca i žena, kao i između triju skupina s obzirom na dob provjerena je povezanost dobi s pojedinačnim simptomima. U Tablici 5.2. prikazana je povezanost dobi s indikatorima RSI score-a.

Tablica 5.2. Povezanost dobi s indikatorima RSI score-a

| | 2. | 3. | 4. | 5. | 6. | 7. | 8. | 9. | 10. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. Dob | 0,24* | -0,03 | 0,31** | 0,14 | 0,34** | 0,25* | 0,23* | 0,23* | 0,23* |
| 2. Promuklost | – | 0,37** | 0,26* | 0,16 | 0,14 | 0,17 | 0,14 | 0,36** | 0,47*** |
| 3. Čišćenje grla | | – | 0,23* | 0,14 | 0,17 | -0,04 | 0,21 | 0,35** | 0,20 |
| 4. Pojačana salivacija | | | – | -0,02 | 0,24* | 0,06 | 0,15 | 0,10 | 0,26* |
| 5. Otežano gutanje | | | | – | 0,36** | 0,26* | 0,25* | 0,46*** | 0,15 |
| 6. Kašalj nakon jela i ležanja | | | | | – | 0,17 | 0,42** | 0,39** | 0,36** |
| 7. Napadaji gušenja | | | | | | – | 0,33** | 0,25* | 0,17 |
| 8. Stalno prisutan kašalj | | | | | | | – | 0,41** | 0,37** |
| 9. Osjećaj stranog tijela u grlu | | | | | | | | – | 0,43*** |
| 10. Žgaravica | | | | | | | | | – |

*Bilješka. ***p < 0,001; **p < 0,01; *p < 0,05*

Kao što se može vidjeti iz Tablice 5.2., dob je povezana s gotovo svim simptomima RSI-a, pri čemu su pojedini simptomi češće izmjereni kod starijih osoba. Jedini izuzetak su čišćenje grla i otežano gutanje koji su podjednako izraženi kod starijih i mlađih sudionika. Osim toga, pozitivna i značajna, iako niska, korelacija utvrđena je između dobi i RSI-a ($r$ = 0,23, $p$ = 0,04). Dakle, RSI je u prosjeku viši kod starijih osoba. Korelacije između pojedinih simpotoma RSI-a kreću se u rasponu od niskih do umjerenih, pri čemu je najveća povezanost utvrđena je između promuklosti i žgaravice te otežanog gutanja i osjećaja stranog tijela u grlu. Pri tome je izraženija promuklost bila povezana i s izraženijom žgaravicom. Slično tome, kod pacijenata kojima je bilo izraženije otežano gutanje bio je prisutan i izraženiji osjećaj stranog tijela u grlu.

### 5.2.2. Analiza RSI simptoma s obzirom na spol

Također, s obzirom na razlike u spolnom sastavu pojedinih grupa provjerena je razlika između muškaraca i žena prema RSI simptomima. Spolne razlike utvrđene su samo za hiperemiju i granulom. Pri tome je hiperemija koja je češće dijagnosticirana kod muškaraca (77,7%; 25% samo aritenoidna, 57,7% difuzna) nego žena (57,6%; 31% samo aritenoidna, 27,6% difuzna), $\chi^2(2, N = 81) = 8{,}01 p = 0{,}018$. Slično tome, granulom je bio češće dijagnosticiran kod muškaraca (53,8%) nego žena (20,7%), $\chi^2(1, N = 81) = 8{,}40$, $p = 0{,}004$. Za ostale indikatore nisu utvrđene značajne spolne razlike što sugerira da je izraženost tih kliničkih znakova slična kod muškarca i žena.

### 5.2.3. Usporedba triju skupina s obzirom na RSI simptome

S obzirom da je dob povezana s nizom ispitivanih markera, u analizama koje slijede dob je uključen kao kovarijat. Dakle, kako bi se usporedile tri skupine sudionika koristit će se multivarijatna analiza kovarijance (MANCOVA), pri čemu je pripadnost pojedinoj skupini nezavisna varijabla, pojedini simptomi RSI-a zavisne varijable, a dob, kao što je već rečeno, kovarijat. Rezultati su prikazani u Tablici 5.3.

Tablica 5.3. Usporedba triju skupina s obzirom na RSI simptome

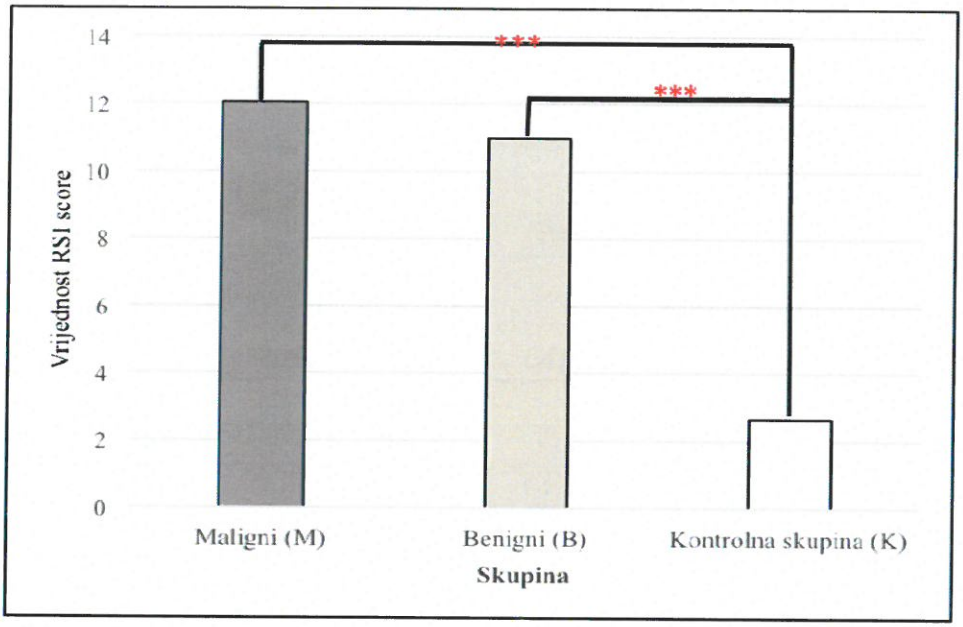
| | Skupina | N | M | SD | F-omjer | Usporedba triju skupina |
|---|---|---|---|---|---|---|
| RSI | Maligni (M) | 25 | 12,04 | 6,31 | 19,96*** | K < M |
| | Benigni (B) | 25 | 11,00 | 5,84 | | K < B |
| | Kontrolna skupina (K) | 22 | 2,64 | 2,85 | | |
| Promuklost | Maligni (M) | 25 | 3,36 | 0,700 | 76,29*** | K < M |
| | Benigni (B) | 25 | 3,00 | 1,080 | | K < B |
| | Kontrolna skupina (K) | 22 | 0,41 | 0,734 | | |
| Čišćenje grla | Maligni (M) | 25 | 1,96 | 1,541 | 7,68*** | K < M |
| | Benigni (B) | 25 | 2,28 | 1,621 | | K < B |
| | Kontrolna skupina (K) | 22 | 0,77 | 0,973 | | |
| Pojačana salivacija | Maligni (M) | 25 | 1,08 | 1,441 | 0.21 | |
| | Benigni (B) | 25 | 0,64 | 1,221 | | — |
| | Kontrolna skupina (K) | 22 | 0,59 | 1,008 | | |
| Otežano gutanje | Maligni (M) | 25 | 0,68 | 1,108 | 1,48 | |
| | Benigni (B) | 25 | 0,72 | 1,275 | | — |
| | Kontrolna skupina (K) | 22 | 0,23 | 0,429 | | |
| Kašalj nakon jela i ležanja | Maligni (M) | 25 | 0,72 | 1,208 | 1,72 | |
| | Benigni (B) | 25 | 0,60 | 1,080 | | — |
| | Kontrolna skupina (K) | 22 | 0,14 | 0,351 | | |
| Napadaji gušenja | Maligni (M) | 25 | 0,32 | 0,802 | 1,31 | |
| | Benigni (B) | 25 | 0,08 | 0,400 | | — |
| | Kontrolna skupina (K) | 22 | 0,00 | 0,000 | | |
| Stalno prisutan kašalj | Maligni (M) | 25 | 1,00 | 1,472 | 1,90 | |
| | Benigni (B) | 25 | 0,44 | 0,961 | | — |
| | Kontrolna skupina (K) | 22 | 0,18 | 0,501 | | |
| Osjećaj stranog tijela u grlu | Maligni (M) | 25 | 2,08 | 1,605 | 13,30 | |
| | Benigni (B) | 25 | 2,16 | 1,748 | | — |
| | Kontrolna skupina (K) | 22 | 0,18 | 0,395 | | |
| Žgaravica | Maligni (M) | 25 | 1,60 | 1,555 | 5,40** | K < M |
| | Benigni (B) | 25 | 1,60 | 1,528 | | K < B |
| | Kontrolna skupina (K) | 22 | 0,36 | 0,953 | | |

*Bilješka.* ***$p < 0,001$; **$p < 0,01$; *$p < 0,05$

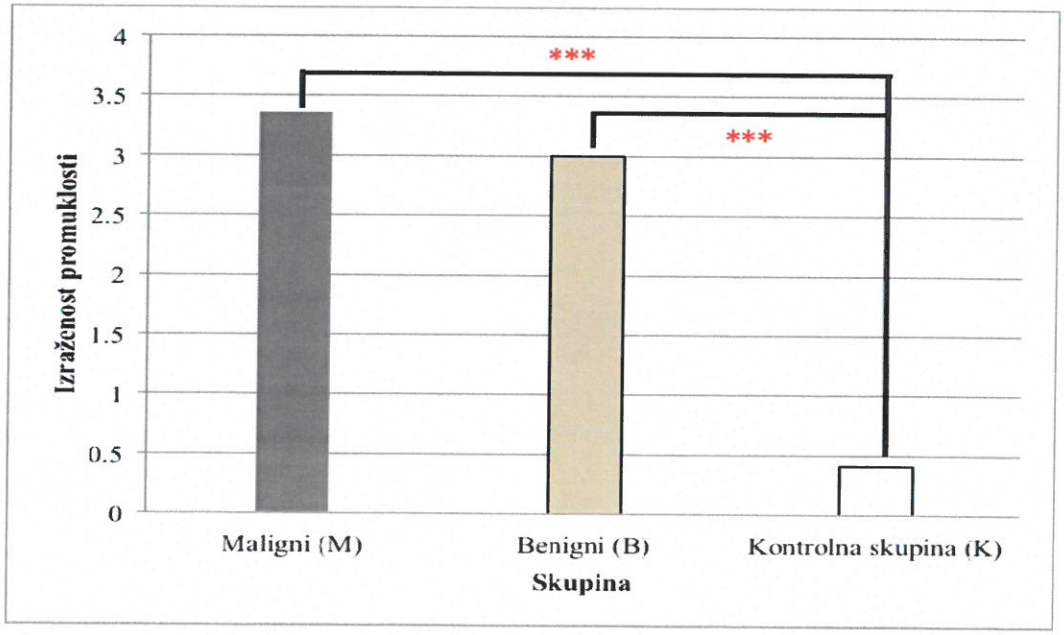
Kao što je vidljivo iz Tablice 5.3., nakon kontrole dobi sudionika, značajna razlika među trima skupinama utvrđena je za RSI ukupno, te promuklost, čišćenje grla i žgaravicu. U svim navedenim slučajevima, sudionici iz kontrolne skupine su manje izvještavali o navedenim

indikatorima, odnosno imali su niži RSI ($p < 0{,}001$). Sudionici s malignim i benignim promjenama nisu se značajno razlikovali s obzirom niti na jedan od navedenih indikatora. U nastavku slijedi grafički prikaz utvrđenih značajnih razlika.

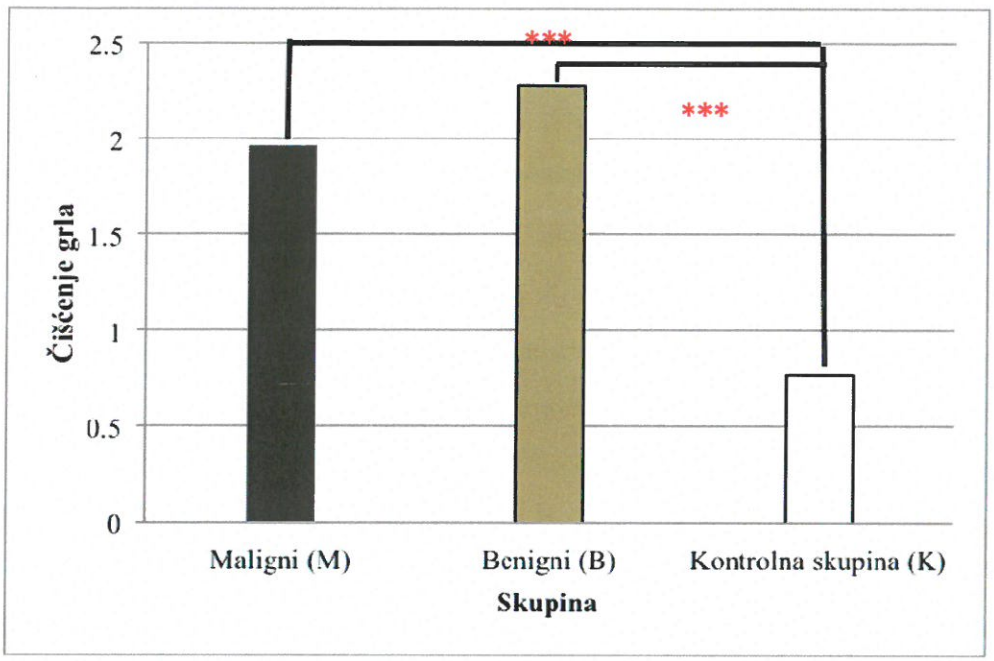
Slika 5.1. Usporedba skupina s obzirom na RSI



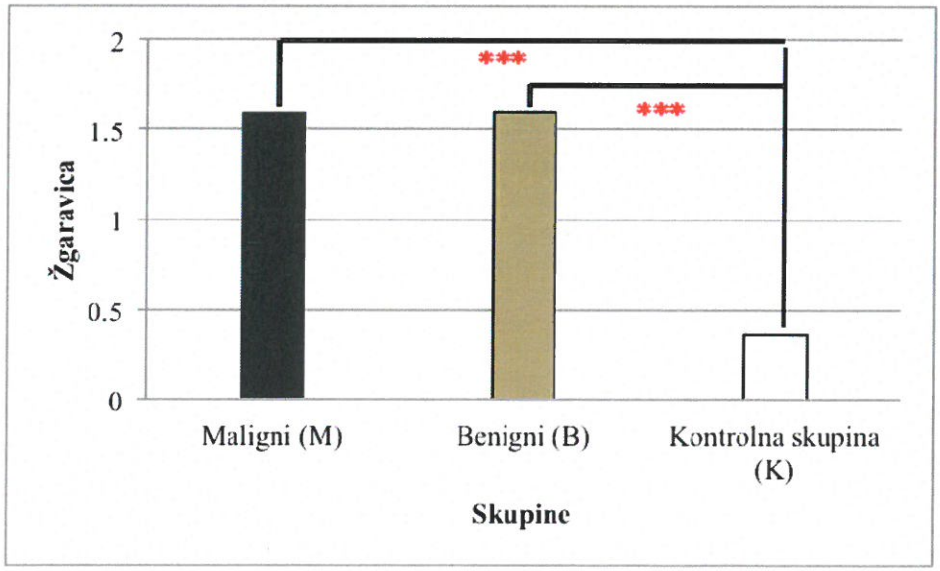

Slika 5.2. Usporedba skupina s obzirom na promuklost



Slika 5.3. Usporedba skupina s obzirom na čišćenje grla




Slika 5.4. Usporedba skupina s obzirom na žgaravicu



Nadalje, provjeren je odnos RSI s pojedinačnim simptomima u trima skupinama.

Tablica 5.4. Povezanost RSI-a s pojedinim indikatorima u trima skupinama

| Skupina | | 1. | 2. | 3. | 4. | 5. | 6. | 7. | 8. | 9. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Maligne promjene | RSI | 0,33 | 0,61** | 0,28 | -0,33 | -0,09 | -0,31 | -0,13 | -0,46* | -0,19 |
| Benigne promjene | | 0,52** | 0,62*** | 0,66*** | 0,23 | 0,38* | 0,29 | 0,60** | 0,57** | 0,11*** |
| Kontrolna skupina | | 0,48* | 0,37 | 0,88** | 0,34 | 0,24 | - | 0,16 | 0,42* | 0,50* |

*Bilješka. ***p < 0,001; **p < 0,01; *p < 0,05; 1 = Promuklost, 2 = Čišćenje grla; 3 = Pojačana salivacija; 4 = Otežano gutanje; 5 =Kašalj nakon jela i ležanja; 6 = Napadaji gušenja; 7 = Stalno prisutan kašalj; 8 = Osjećaj stranog tijela u grlu; 9 = Žgaravica*

Kao što se može vidjeti iz tablice 5.4., RSI je najmanje povezan s pojedinačnim simptomima u skupini s malignim promjenama, dok su korelacije između RSI i pojedinačnih simptoma najveće u skupini s benignim promjenama. Treba naglasiti da su korelacije između RSI-a i otežanog gutanja, kašlja nakon jela i ležanja, napadaja gušenja i stalno prisutnog kašlja u skupini s malignim promjenama negativne, dok su u preostalim skupinama navedene korelacije pozitivne. Dakle, kod osoba s malignim promjenama veći RSI je povezan s manjom izraženošću osjećaja otežanog gutanja, kašlja nakon jela i ležanja, napadaja gušenja i stalno prisutnog kašlja, dok je u preostale dvije skupine RSI povezan s izraženijim osjećajem otežanog gutanja, kašlja nakon jela i ležanja, napadaja gušenja i stalno prisutnog kašlja.

## 5.3. Usporedba triju skupina s obzirom na RFS kliničke znakove

### 5.3.1. Analiza povezanosti dobi s RFS kliničkim znakovima

Postupak je ponovljen i za RFS kliničke znakove, a rezultati su prikazani u Tablici 5.5.

Tablica 5.5. Povezanost dobi s RFS simptomima

| | 2. | 3. | 4. | 5. | 6. | 7. | 8. | 9. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. Dob | 0,08 | 0,40*** | 0,35** | 0,01 | 0,34** | 0,34** | 0,44*** | 0,19 |
| 2. Subglotični edem | – | -0,11 | -0,03 | 0,01 | -0,07 | -0,18 | 0,13 | 0,17 |
| 3. Ventrikularna obliteracija | | – | 0,72*** | 0,49*** | 0,67*** | 0,72*** | 0,65*** | 0,37** |
| 4. Hiperemija | | | – | 0,49*** | 0,58*** | 0,73*** | 0,60*** | 0,36** |
| 5. Edem glasnica | | | | – | 0,35** | 0,57*** | 0,13 | 0,31** |
| 6. Difuzni laringealni edem | | | | | – | 0,59*** | 0,50*** | 0,23* |
| 7. Hipertrofija stražnje komisure | | | | | | – | 0,49*** | 0,29** |
| 8. Granulom | | | | | | | – | 0,21 |
| 9. Gusta laringealna sluz | | | | | | | | – |

*Bilješka.* ***$p < 0,001$; **$p < 0,01$; *$p < 0,05$

Kao što je vidljivo iz Tablice 5.5., dob je povezana gotovo sa svim RFS kliničkim znakovima, pri čemu su ispitivani klinički znakovi bili izraženiji kod starijih sudionika. Dob nije značajno povezana sa subglotičnim edemom, edemom glasnica i gustom laringealnom sluzi što sugerira da je izraženost tih simptoma slična kod mlađih i starijih sudionika.

Povezanost pojedinih RFS kliničkih znakova kreće se u rasponu niskih (povezanost subglotičnog edema s ostalim simptomima) do vrlo visokih. Najveća povezanost utvrđena je između hiperemije i difuznog laringealnog edema te hiperemije i ventrikularne obliteracije. U oba slučaja, pacijentima kojima je dijagnosticirana hiperemija su češće dijagnosticirani i difuzni laringealni edem kao i ventrikularna obliteracija.

Usporedbom dobi pacijenata kojima je dijagnosticirana samo aritenoidna hiperemija ($n$ = 22) s dobi pacijenata kojima je dijagnosticirana difuzna hiperemija ($n$ = 38) utvrđena je značajna razlika, $t(58) = 14,91$, $p = 0,001$, a veličina učinka za utvrđenu razliku iznosi Cohen $d = 3,92$. Dakle, razlika nije samo statistički značajna već bi mogla imati i klinički utjecaj na ispitivane rezultate. Pri tome su sudionici kojima je dijagnosticirana difuzna hiperemija u prosjeku bili stariji ($M = 56,34$; $SD = 11,74$) od pacijenata samo s aritenoidnom hiperemijom ($M = 44,09$; $SD = 12,02$). Suprotno tome, usporedbom dobi sudionika s parcijalnom ($n = 39$) i kompletnom ventrikularnom obliteracijom ($n = 4$) nije utvrđena značajna razlika, $t(41) = 0,76$, $p = 0,39$. Dakle, pacijenti s parcijalnom i kompletnom ventrikularnom obliteracijom su podjednake dobi.

### 5.3.2. Analiza RFS kliničkih znakova s obzirom na spol

Također, s obzirom na razlike u spolnom sastavu pojedinih grupa provjerena je razlika između muškaraca i žena prema RFS kliničkim znakovima. Spolne razlike utvrđene su samo za hiperemiju i granulom. Pri tome je hiperemija koja je češće dijagnosticirana kod muškaraca (77,7%; 25% samo aritenoidna, 57,7% difuzna) nego žena (57,6%; 31% samo aritenoidna, 27,6% difuzna), $\chi^2(2, N = 81) = 8{,}01 p = 0{,}018$. Slično tome, granulom je bio češće dijagnosticiran kod muškaraca (53,8%) nego žena (20,7%), $\chi^2(1, N = 81) = 8{,}40, p = 0{,}004$. Za ostale indikatore nisu utvrđene značajne spolne razlike što sugerira da je izraženost tih kliničkih znakova slična kod muškarca i žena.

### 5.3.3. Usporedba triju skupina s obzirom na RFS kliničke znakove

Univarijatnom analizom kovarijance (ANCOVA) uz kontrolu dobi utvrđena je značajna razlika triju skupina s obzirom na navedeni score, $F(2, 77) = 97{,}78, p = 0{,}001$; $n_p^2 = 0{,}72$. Ako se u obzir uzmu Cohenovi (1988) naputci o veličini učinka utvrđena razlika ne samo da je statistički značajna već i klinički. Post-hoc analizom utvrđeno je da sudionici iz kontrolne skupine imaju značajno niži RFS rezultat ($M = 1{,}36$ ; $SD = 1{,}33$) i od sudionika s benignim promjenama ($M = 11{,}57$ ; $SD = 3{,}66$) i od sudionika s malignim promjenama ($M = 13{,}89$ ; $SD = 3{,}81$). No, sudionici s benignim i malignim promjenama nisu se značajno razlikovali s obzirom na RFS.

Nadalje, sudionici iz dviju skupina, odnosno sudionici s malignim i benignim promjenama uspoređeni su s obzirom na ostale RFS kliničke znakove. Naime, sudionicima iz kontrolne skupine nisu dijagnosticirani dolje navedeni klinički znakovi. Usporedba sudionika s obzirom na pojedinačne kliničke znakove prikazana je u Tablici 5.6. Treba naglasiti da frekvencija navedena u tablici 5.6. predstavlja broj pacijenata kod kojih je utvrđen određeni simptom.

Tablica 5.6. Usporedba sudionika iz triju skupina s obzirom na RFS kliničke znakove

| | Skupine | | Usporedba |
|---|---|---|---|
| | Maligne promjene ($n$ = 28) | Benigne promjene ($n$ = 28) | $\chi^2$ |
| Subglotični edem | 1 (3,6%) | 0 (0%) | 1,18 |
| Ventrikularna obliteracija | 26 (92,8%) | 17 (60,7%) | 8,49* |
| Hiperemija | 28 (100%) | 25 (89,3%) | 10,27*** |
| Granulom | 28 (100%) | 6 (21,4%) | 36,26*** |
| Gusta laringealna sluz | 11 (39,3%) | 13 (46,4%) | 0,29 |

*Bilješka.* ***$p < 0,001$; **$p < 0,01$; *$p < 0,05$

Kod sudionika kojima je dijagnosticirana ventrikularna obliteracija, kod njih 48 dijagnosticirana je parcijalna (23 iz skupine s malignim promjenama i 16 iz skupine s benignim promjenama), a kod njih četvero je dijagnosticirana kompletna (troje iz skupine s malignim promjenama i jedan pacijent iz skupine s benignim promjenama).

Pacijentima kojima je dijagnosticirana hiperemija, kod njih 22 je dijagnosticirana samo aritenoidna (četvero iz skupine s malignim promjenama, 12 iz skupine s benignim promjenama te šestero iz kontrolne skupine), a kod njih 28 difuzna (24 iz skupine s malignim promjenama, 13 iz skupine s benignim promjenama te jedna osoba iz kontrolne skupine).

Kao što je vidljivo iz Tablice 5.6., utvrđena je značajna razlika između dvije skupine u ventrikularnoj obliteraciji, hiperemiji i granulomu. Pri tome su svi navedeni simptomi bili značajno češće prisutni u skupini s malignim promjenama nego u skupini s benignim promjenama.

Multivarijatnom analizom kovarijance (MANCOVA) provjereno je razlikuju li se tri skupine s obzirom na edem glasnica, difuzni laringealni edem te hipetrofiju stražnje komisure. Rezultati su prikazani u Tablici 5.7.

Tablica 5.7. Usporedba triju skupina s obzirom na RFS kliničke znakove uz kontrolu dobi

| | Skupina | N | M | SD | F-omjer | Usporedba triju skupina |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Edem glasnica | Maligni (M) | 28 | 1,89 | 0,62 | 123,71*** | K < M; K < B |
| | Benigni (B) | 28 | 3,25 | 1,04 | | M < B |
| | Kontrolna skupina (K) | 25 | 0,08 | 0,27 | | |
| Difuzni laringealni edem | Maligni (M) | 28 | 1,00 | 0,90 | 7,38*** | K < B |
| | Benigni (B) | 28 | 0,54 | 0,92 | | K < M |
| | Kontrolna skupina (K) | 25 | 0,00 | 0,00 | | |
| Hipertrofija stražnje komisure | Maligni (M) | 28 | 2,07 | 0,71 | 33,04*** | K < B |
| | Benigni (B) | 28 | 1,79 | 0,68 | | K < M |
| | Kontrolna skupina (K) | 25 | 0,52 | 0,58 | | |

*Bilješka.* ***$p < 0,001$; **$p < 0,01$; *$p < 0,05$

Kao što se može vidjeti iz Tablice 5.7., tri skupine značajno se razlikuju s obzirom na edem glasnica, difuzni laringealni edem te hipertrofiju stražnje komisure. Pri tome je izraženost edema glasnica bila najveća u skupini s benignim promjenama, a zatim u skupini s malignim promjenama. Pri tome je i u kontrolnoj skupini i skupini s malignim promjenama izraženost bila značajno niža nego u skupini s benignim promjenama ($p < 0,01$). Također, sudionici iz kontrolne skupine imali su manje izražen edem glasnica od sudionika s malignim promjenama.

Za difuzni laringealni edem te hipertrofiju stražnje komisure utvrđena je značajna razlika između kontrolne skupine i skupine s benignim promjenama ($p < 0,01$) i kontrolne skupine i skupine s malignim promjenama ($p < 0,01$). No, nije utvrđena značajna razlika između skupine s benignim i malignim promjenama. Slični rezultati utvrđeni su i za hipertrofiju stražnje komisure. Naime, sudionici s malignim i benignim promjenama nisu se značajno razlikovali, dok je kod sudionika iz kontrolne skupine taj simptom bio značajno niže izražen nego kod preostale dvije skupine.

Također je ispitana povezanost RFS-a s pojedinačnim kliničkim znakovima, a rezultati su prikazani u Tablici 5.8.

Tablica 5.8. Povezanost RFS-a s pojedinim kliničkim znakovima u trima skupinama

| Skupina | | 1. | 2. | 3. | 4. | 5. | 6. | 7. | 8. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Maligne promjene | RFS | -0,20 | 0,57** | 0,38* | 0,60*** | 0,74*** | 0,36 | -- | -0,45* |
| Benigne promjene | | -- | 0,76*** | 0,68*** | 0,02 | 0,68*** | 0,69*** | 0,23 | 0,27 |
| Kontrolna skupina | | -- | -- | 0,78*** | 0,32 | -- | 0,66*** | -- | -- |

*Bilješka. ***p < 0,001; **p < 0,01; *p < 0,05; 1 = Subglotični edem; 2 =Ventrikularna obliteracija; 3 = Hiperemija; 4 = Edem glasnica; 5 =Difuzni laringealni edem; 6 = Hipertrofija stražnje komisure; 7 = Granulom; 8 = Gusta laringealna sluz*

Kao što se može vidjeti iz Tablice 5.8., najveća povezanost RFS-a s pojedinačnim simptomima utvrđena je u skupini s benignim promjenama, nakon čega slijede korelacije u skupini s malignim promjenama. Sve korelacije su pozitivne, dakle, osobama koje su imale veći RFS češće je dijagnosticiran subglotični edem, ventrikularna obliteracija, hiperemija, izraženiji edem glasnica, izraženiji difuzni laringealni edem, izraženija hipetrofija stražnje komisure te granulom i gusta laringealna sluz.

## 5.4. Analiza izmjerenih koncentracija pepsina u slini ELISA metodom

### 5.4.1. Analiza povezanosti dobi s koncentracijom pepsina u slini

Iako je, očekivano, utvrđena pozitivna povezanost između dobi i koncentracije pepsina ($r$ = 0,18) što sugerira da je kod starijih sudionika izmjerena viša koncentracija pepsina, ta povezanost nije statistički značajna ($p$ = 0,15). Kako bi se dobio bolji uvid u odnos koncentracije pepsina u slini i dobi, provjerena je povezanost i unutar skupina. Zanimljivo je da je odnos između koncentracije pepsina u slini i dobi pozitivan u kontrolnoj skupini ($r$ = 0,11; $p$ = 0,60) i skupini s malignim promjenama ($r$ = 0,26; $p$ = 0,25), a negativan, iako ne i statistički značajan, u skupini s benignim promjenama ($r$ = -0,05; $p$ = 0,82). Dakle, koncentracija pepsina u slini je u kontrolnoj skupini i skupini s malignim promjenama je nešto viša kod starijih sudionika, a u skupini s benignim promjenama nešto viša kod mlađih pacijenata.

Kao što je ranije navedeno, dob je povezana koncentracijom pepsina u slini u očekivanom smjeru, odnosno kod starijih sudionika izmjerena je i viša koncentracija pepsina. No, ta povezanost nije statistički značajna.

### 5.4.2. Analiza koncentracija pepsina u slini s obzirom na spol

Također, nakon kontrole dobi, nije utvrđena značajna razlika između muškaraca i žena u koncentraciji pepsina u slini, $F(1, 65) = 1{,}42$, $p = 0{,}27$. No, treba naglasiti da je koncentracija pepsina u slini kod muškaraca u prosjeku bila veća ($M = 192{,}22$, $SD = 79{,}01$) nego koncentracija pepsina u slini kod žena ($M = 172{,}35$, $SD = 69{,}56$).

### 5.4.3. Usporedba triju skupina s obzirom na koncentracije pepsina u slini

S obzirom na navedeno, jednosmjernom analizom kovarijance (ANCOVA), uz kontrolu dobi, tri skupine sudionika uspoređene su s obzirom na koncentraciju pepsina u slini. Usporedba triju skupina s obzirom na koncentraciju pepsina u slini prikazana je u Tablici 5.9.

Tablica 5.9. Izmjerene koncentracije pepsina u slini po pojedinim skupinama

| Skupina | N | M | SD | *F*-omjer |
|---|---|---|---|---|
| Maligne promjene | 22 | 209.86 | 106.09 | 1,91 |
| Benigne promjene | 24 | 188.08 | 57.51 | |
| Kontrola | 22 | 158.32 | 46.40 | |

*Bilješka.* ***$p < 0{,}001$; **$p < 0{,}01$; *$p < 0{,}05$

Kao što je vidljivo iz Tablice 5.9., u skupini s malignim promjenama izmjerena je najviša koncentracija pepsina u slini, nakon čega slijedi skupina s benignim promjenama, dok je najniža koncentracija izmjerena u kontrolnoj skupini. No, razlike nisu statistički značajne, odnosno nema značajne razlike u koncentraciji pepsina u slini između pojedinih skupina. Zanimljivo je i to da je raspršenje vrijednosti koncentracija pepsina u slini u skupini s malignim promjenama gotovo dva puta veće od raspršenja koncentracija u drugim dvjema skupinama.

### 5.4.4. Analiza koncentracija pepsina u slini prema pojedinim dijagnozama

Koncentracija pepsina uspoređena je i s obzirom na postavljenu dijagnozu, a rezultati su prikazani u Tablici 5.10.

Tablica 5.10. Usporedba sudionika s različitim dijagnozama s obzirom na koncentraciju pepsina u slini

| Dijagnoze | N | M | SD | F-omjer | Usporedba |
|---|---|---|---|---|---|
| PCC | 22 | 179,18 | 106,09 | 0,90 | Nema značajne |
| PAP | 3 | 272,33 | 153,15 | | razlike među |
| PG | 14 | 182,79 | 56,90 | | skupinama |
| RE | 7 | 202,86 | 75,98 | | |
| Ostalo | 4 | 152,50 | 41,33 | | |

*Bilješka.* ***$p < 0,001$; **$p < 0,01$; *$p < 0,05$

Usporedbom sudionika s različitim dijagnozama s obzirom na koncentraciju pepsina u slini nije utvrđena značajna razlika među niti jednom skupinom. Najviša koncentracija pepsina izmjerena je u skupini s PAP dijagnozom, nakon čega slijedi skupina s RE dijagnozom. Najniža koncentracija pepsina izmjerena je kod sudionika kojima je dijagnosticirano „Ostalo“, nakon čega slijedi dijagnoza PCC.

### 5.4.5. Usporedba sudionika s različitim dijagnozama s obzirom na dob i koncentraciju pepsina u slini

Napravljene su usporedbe pacijenata s različitim dijagnozama unutar pojedinih skupina u odnosu na dob sudionika. Rezultati su prikazani u Tablici 5.11.

Tablica 5.11. Usporedba sudionika s različitim dijagnozama s obzirom na koncentraciju pepsina u slini u mlađoj i starijoj dobnoj skupini

| | Dijagnoze | N | M | SD | F-omjer |
|---|---|---|---|---|---|
| Mlađi | PCC | 3 | 112,67 | 26,10 | 4,91* |
| pacijenti | PG | 10 | 184,90 | 65,34 | |
| < 50 godina$^{+}$ | RE | 4 | 256,25 | 32,50 | |
| | Ostalo | 2 | 122,50 | 38,89 | |
| Stariji | PCC | 16 | 216,38 | 99,123 | 0,31 |
| pacijenti | PAP | 2 | 218,50 | 171,827 | |
| ≥ 50 godina | PG | 4 | 177,50 | 34,278 | |
| | RE | 2 | 160,00 | 7,071 | |
| | Ostalo | 2 | 182,50 | 3,536 | |

*Bilješka. ***p < 0,001; **p < 0,01; *p < 0,05; kod mlađih pacijenata sudionik s PAP dijagnozom (n = 1) je isključen iz obrade*

Kod mlađih sudionika, sudionici s različitom dijanozom značajno se razlikuju s obzirom na koncentraciju pepsina u slini. Pri tome je veličina efekta za utvrđenu razliku velika ($\eta_p^2$ = 0,49). Post-hoc analizom provjereno je između kojih skupina postoji značajna razlika te je utvrđeno da je kod sudionika s RE dijagnozom utvrđena značajno viša koncentracija pepsina nego kod sudionika s PCC dijagnozom ($p$ < 0,01). Razlike između pacijenata s PG i PCC dijagnozom te PG i RE su značajne na razini rizika od 8%. Pri tome je kod pacijenata s PG dijagnozom izmjerena viša koncentracija nego kod pacijenata s PCC dijagnozom, ali niža koncentracija nego kod pacijenata s RE dijagnozom. Općenito, najviša koncentracija pepsina izmjerena je kod mlađih sudionika s RE dijagnozom, a najniža kod onih s PCC dijagnozom.

Suprotno tome, kod starijih sudionika nije utvrđena značajna razlika u koncentraciji pepsina u slini među pacijetima s različitom dijagnozom. Najviše koncentracije pepsina izmjerene su u skupinama s PCC i PAP dijagnozama, a najniže u skupini s RE dijagnozom. Ovaj obrazac je suprotan onome utvrđenom u mlađoj skupini u kojoj je kod pacijenata s RE dijagnozom izmjerena najviša koncentracija, a kod pacijenata s PCC dijagnozom najniža.

### 5.4.6. Usporedba sudionika s različitim dijagnozama s obzirom na spol i koncentraciju pepsina u slini

Postupak je ponovljen i za spol, a rezultati su prikazani u Tablici 5.12.

Tablica 5.12. Usporedba sudionika s različitim dijagnozama s obzirom na koncentraciju pepsina u slini kod muškaraca i žena

| | Dijagnoze | N | M | SD | F-omjer |
|---|---|---|---|---|---|
| Muškarci$^{+}$ | PCC | 17 | 200,00 | 99,911 | 0,38 |
| | PG | 9 | 177,78 | 54,607 | |
| Žene$^{+}$ | PCC | 2 | 200,00 | 127,279 | 0,99 |
| | PG | 5 | 191,80 | 66,360 | |
| | RE | 6 | 224,17 | 55,805 | |
| | Ostalo | 3 | 143,33 | 45,369 | |

*Bilješka. ***$p < 0,001$; **$p < 0,01$; *$p < 0,05$; $^{+}$s obzirom na broj prikazana je usporedba samo za one skupine kod kojih je $n > 1$*

Kod muškaraca, viša koncentracija pepsina u slini izmjerena je kod pacijenata s PCC dijagnozom, međutim, razlika nije statistički značajna.

Kod žena, najviša koncentracija pepsina u slini izmjerena je kod pacijentica s RE dijagnozom, nakon čega slijede oni s PCC dijagnozom. Najniža koncentracija izmjerena je kod pacijentica s dijagnozom "Ostalo". No, razlike nisu statistički značajne.

### 5.4.7. Analiza koncentracija pepsina u slini kontrolne skupine i skupina s različitim benignim dijagnozama

Nadalje, kako bi se dobio bolji uvid u koncentraciju pepsina u slini u pojedinim skupinama jednostavnom analizom varijance uspoređeni su sudionici iz kontrolne skupine i sudionici s benignim promjenama s RE i PG dijagnozama. U ovoj analizi dob nije korištena kao kovarijat jer se sudionici iz kontrolne skupine i skupine s benignim promjenama ne razlikuju s obzirom na dob. Rezultati analize prikazani su u Tablici 5.13.

Tablica 5.13. Usporedba kontrolne skupine i skupine s benignim promjenama s obzirom na koncentraciju pepsina u slini

| | Skupina | N | M | SD | *F*-omjer |
|---|---|---|---|---|---|
| Koncentracija pepsina u slini | Benigni RE | 6 | 224,16 | 55,81 | 4,06* |
| | Benigni PG | 14 | 182,79 | 56,91 | |
| | Kontrolna skupina (K) | 22 | 158,32 | 46,40 | |

*Bilješka.* ***$p < 0,001$; **$p < 0,01$; *$p < 0,05$

Dakle, kao što se može vidjeti iz Tablice 5.13., tri skupine sudionika značajno se razlikuju s obzirom na koncentraciju pepsina u slini. Pri tome je veličina efekta za utvrđenu razliku veliku ($\eta_p^2 = 0,17$). Post-hoc analizom provjereno je između kojih skupina postoji značajna razlika te je utvrđeno da je kod sudionika s RE dijagnozom utvrđena značajno viša koncentracija pepsina nego kod sudionika iz kontrolne skupine ($p < 0,05$). Iako je kod pacijenata s RE dijagnozom izmjerena viša koncentracija pepsina u slini nego kod pacijenata s PG dijagnozom ta razlika nije statistički značajna.

### 5.4.8. Analiza koncentracija pepsina u slini kontrolne skupine i skupina s različitim benignim dijagnozama s obzirom na dob

Nadalje, kako bi se usporedili stariji, odnosno mlađi sudionici iz kontrolne skupine i skupine s benignim promjenama sudionici su najprije podijeljeni u dvije skupine s obzirom na dob, i to: (1) sudionici mlađi od 50 godina (12 sudionika iz kontrolne skupine; 10 sudionika s PG dijagnozom te četiri s RE dijagnozom) i (2) sudionici ≥ 50 godina (10 sudionika iz kontrolne skupine; četiri sudionika s PG dijagnozom te dva s RE dijagnozom). Nakon toga, jednostavnom analizom varijance ispitane su razlike u koncentraciji pepsina u slini između sudionika iz kontrolne skupine, pacijenata s RE dijagnozom i pacijenata s PG dijagnozom kod mlađih i starijih sudionika. Rezultati analize prikazani su u Tablici 5.14.

Tablica 5.14. Usporedba kontrolne skupine i skupine s benignim promjenama s obzirom na koncentraciju pepsina u slini kod mlađih i starijih pacijenata

| | Skupina | N | M | SD | *F*-omjer |
|---|---|---|---|---|---|
| Mlađi pacijenti | Benigni RE | 6 | 256,25 | 65,34 | 5,60** |
| < 50 godina | Benigni PG | 14 | 184,90 | 65,33 | |
| | Kontrolna skupina (K) | 22 | 154,42 | 46,62 | |
| Stariji pacijenti | Benigni RE | 2 | 160,00 | 7,07 | 0,18 |
| ≥ 50 godina | Benigni PG | 4 | 177,50 | 34,28 | |
| | Kontrolna skupina (K) | 10 | 163,00 | 48,19 | |

*Bilješka.* ***$p < 0,001$; **$p < 0,01$; *$p < 0,05$

Kod mlađih sudionika, tri skupine se značajno razlikuju s obzirom na koncentraciju pepsina u slini. Pri tome je veličina efekta za utvrđenu razliku veliku ($\eta_p^2 = 0,33$). Post-hoc analizom provjereno je između kojih skupina postoji značajna razlika te je utvrđeno da je kod sudionika s RE dijagnozom utvrđena značajno viša koncentracija pepsina nego kod sudionika iz kontrolne skupine ($p < 0,001$). Iako je kod pacijenata s RE dijagnozom izmjerena viša koncentracija pepsina nego kod pacijenata s PG dijagnozom ta razlika nije statistički značajna.

Za razliku od skupine mlađih pacijenata, u skupini starijih pacijenata (≥ 50 godina) nije utvrđena značajna razlika između kontrolne skupine i dviju podskupina s benignim promjenama. Kod starijih sudionika, najviša koncentracija pepsina u slini utvrđena je kod pacijenata s PG dijagnozom, dok su koncentracije pepsina u ostale dvije skupine gotovo identične.

### 5.4.9. Analiza koncentracija pepsina u slini kontrolne skupine i skupina s različitim benignim dijagnozama s obzirom na spol

Postupak je ponovljen i s obzirom na spol. Dakle, usporedba sudionika iz kontrolne skupine i skupine s benignim promjenama napravljene su unutar pojedinog spola. Rezultati jednosmjerne analize varijance prikazani su u Tablici 5.15.

Tablica 5.15. Usporedba kontrolne skupine i skupine s benignim promjenama s obzirom na koncentraciju pepsina u slini kod muškaraca i žena

| | Skupina | N | M | SD | *F*-omjer |
|---|---|---|---|---|---|
| Muškarci | Benigni RE | 0 | — | — | 0,18 |
| | Benigni PG | 9 | 177,78 | 54,61 | |
| | Kontrolna skupina (K) | 15 | 176,87 | 36,21 | |
| Žene | Benigni RE | 6 | 224,17 | 55,81 | 6,53*** |
| | Benigni PG | 5 | 191,80 | 66,36 | |
| | Kontrolna skupina (K) | 7 | 118,57 | 42,10 | |

*Bilješka.* ***$p < 0,001$; **$p < 0,01$; *$p < 0,05$

Kod muškaraca, između sudionika iz kontrolne skupine te pacijenata s RE, odnosno PG dijagnozom nije utvrđena značajna razlika u koncentraciji pepsina u slini. Pri tome su izmjerene koncentracije između skupine s PG dijagnozom i kontrolne skupine gotovo identične.

Suprotno tome, u skupini žena utvrđena je značajna razlika u koncentraciji pepsina između tri skupine. Pri tome je veličina efekta utvrđene razlike izuzetno velika ($\eta_p^2 = 0,33$). Post-hoc analizom provjereno je između kojih skupina postoji značajna razlika te je utvrđeno da je kod sudionica RE dijagnozom utvrđena značajno viša koncentracija pepsina nego kod sudionica iz kontrolne skupine ($p < 0,001$). Iako je kod pacijentica s RE dijagnozom izmjerena viša koncentracija pepsina nego kod pacijentica s PG dijagnozom ta razlika nije statistički značajna.

### 5.4.10. Analiza povezanosti RSI-a i izmjerenih koncentracija pepsina u slini kod benignih i malignih dijagnoza

Također, ispitana je povezanost koncentracije pepsina u slini sa RSI simptomima, a rezultati su prikazani u Tablici 5.16. Pri tome je povezanost ispitana zasebno za skupinu s malignim i zasebno za skupinu s benignim promjenama.

Tablica 5.16. Povezanost koncentracije pepsina u slini i RSI simptoma

| Skupina | | 1. | 2. | 3. | 4. | 5. | 6. | 7. | 8. | 9. | 10. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Maligne | Koncentracija | - | **0,03** | 0,11 | **0,18** | - | - | - | - | - | - |
| promjene | pepsina | 0,02 | | | | 0,33 | 0,01 | 0,10 | **0,29** | 0,01 | 0,05 |
| Benigne | | - | - | 0,21 | - | - | - | - | **0,13** | - | - |
| promjene | | 0,16 | **0.08** | | **0,23** | 0,15 | 0,34 | 0,10 | | 0,13 | 0,15 |

*Bilješka. ***p < 0,001; **p < 0,01; *p < 0,05; 1 = RSI; 2 = Promuklost, 3 = Čišćenje grla; 4 = Pojačana salivacija; 5 = Otežano gutanje; 6 =Kašalj nakon jela i ležanja; 7 = Napadaji gušenja; 8 = Stalno prisutan kašalj; 9 = Osjećaj stranog tijela u grlu; 10 = Žgaravica*

Općenito, povezanost koncentracije pepsina u slini s RSI simptomima u obje skupine većinom su negativne i kreću se od gotovo nepostojećih (npr. korelacija koncentracije pepsina i promuklosti) do niskih (korelacija koncentracije pepsina i kašlja nakon jela i ležanja). Niti jedna korelacija nije statistički značajna što se, barem dijelom, može pripisati malom uzorku.

Ako se usporede dvije skupine pacijenata, vidljivo je da je koncentracija pepsina jače povezana s RSI simptomima u skupini s benignim promjenama. Nadalje, smjer povezanosti (predznak korelacije) gotovo je identičan u dvije skupine uz postojanje nekoliko iznimki (označeno masnim slovima). Na primjer, u skupini s malignim promjenama utvrđena je pozitivna, iako vrlo niska, povezanost koncentracije pepsina i promuklosti, dok je u skupini s benignim promjenama utvrđena negativna povezanost. Dakle, u skupini s malignim promjenama višu koncentraciju pepsina u prosjeku prati izraženija promuklost, dok je u skupini s benignim promjenama viša koncentracija pepsina povezana s manje izraženom promuklošću. Slično tome, povišena koncentracija pepsina u skupini s malignim promjenama povezana je s pojačanom salivacijom, dok je u skupini s benignim promjenama povezana sa smanjenom salivacijom. Suprotno tome, povišena koncentracija pepsina je u skupini s malignim promjenama povezana s manje izraženim stalno prisutnim kašljem, dok je u skupini s benignim promjenama povišena koncentracija povezana s izraženijim stalno prisutnim kašljem. Od ostalih simptoma, povišena koncentracija pepsina u slini u obje skupine povezana je s nižim RSI-om, izraženijim čišćenjem grla, otežanim gutanjem, kašljanjem nakon jela i ležanja, napadajima gušenja, izraženijim osjećajem stranog tijela u grlu i izraženijom žgaravicom.

### 5.4.11. Analiza povezanosti RFS-a i izmjerenih koncentracija pepsina u slini kod benignih i malignih dijagnoza

Postupak je ponovljen za RFS kliničke znakove, a rezultati su prikazani u Tablici 5.17.

Tablica 5.17. Povezanost koncentracije pepsina u slini i RFS kliničkih znakova

| Skupina | | 1. | 2. | 3. | 4. | 5. | 6. | 7. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Maligne promjene | Koncentracija pepsina | 0,12 | -0,26 | 0,14 | 0,01 | 0,29 | -- | **-0,09** |
| Benigne promjene | | 0,09 | -- | 0,08 | 0,22 | 0,18 | -0,25 | **0,18** |

*Bilješka. ***p < 0,001; **p < 0,01; *p < 0,05; 1 = RFS; 2 = Subglotični edem; 3 = Edem glasnica; 4 =Difuzni laringealni edem; 5 = Hipertrofija stražnje komisure; 6 = Granulom; 7 = Gusta laringealna sluz*

Kao što se može vidjeti iz Tablice 5.17., povezanost koncentracije pepsina u slini u obje skupine većinom su pozitivne i se kreću u rasponu od vrlo niskih do umjerenih. Niti jedna korelacija nije statistički značajna što se, barem dijelom, može pripisati malom uzorku. Veća povezanost utvrđena je u skupini s benignim promjenama, dok je najveća korelacija (negativna) utvrđena između koncentracije pepsina i subglotičnog edema u skupini s malignim bolestima. Usporedbom smjera povezanosti (predznaka korelacije) u dvije skupine utvrđeni su gotovo identični obrasci. Tako je u obje skupine povišena koncentracija pepsina povezana s višim RFS-om, prisutnim edemom glasnica, prisutnim difuznim laringealnim edemom i hipertrofijom stražnje komisure. Suprotna povezanost utvrđena je za prisutnost guste laringealne sluzi. Naime, u skupini s malignim promjenama povišena koncentracija pepsina povezana je s rjeđe prisutnom gustom laringealnom sluzi, dok je u skupini s benignim promjenama povišenu koncentraciju pepsina pratila i prisutnost guste laringelane sluzi. U skupini s malignim promjenama utvrđena je negativna povezanost koncentracije pepsina i subglotičnog edema. Dakle, sudionicima s povišenom koncentracijom pepsina rjeđe je dijagnosticiran ovaj simptom. Sličan odnos utvrđen je za granulom u skupini s benignim promjenama. Dakle, sudionicima s povišenom koncentracijom pepsina rjeđe je dijagnosticiran granulom.

### 5.4.12. Analiza koncentracija pepsina u slini u skupinama s malignim i benignim promjenama s obzirom na prisutnost/odsustvo ventrikularne obliteracije

Nadalje, jednostavnom analizom kovarijance (ANCOVA) uz kontrolu dobi ispitana je koncentracija pepsina u slini u skupinama s malignim i benignim promjenama s obzirom na prisutnost/odsustvo ventrikularne obliteracije. Rezultati su prikazani u Tablici 5.18.

Tablica 5.18. Koncentracija pepsina u slini s obzirom na prisutnost ventrikularne obliteracije kod sudionika s malignim i benignim promjenama

| Skupina | Ventrikularna obliteracija | N | M | SD | F-omjer |
|---|---|---|---|---|---|
| Maligne promjene | Nema | 2 | 96,00 | 62,22 | 0,84 |
| | Parcijalna | 20 | 202,95 | 119,05 | |
| | Kompletna | 3 | 169,33 | 73,22 | |
| Benigne promjene | Nema | 10 | 169,00 | 54,35 | 0,96 |
| | Parcijalna | 15 | 193,27 | 64,45 | |
| | Kompletna | -- | 183,56 | 60,67 | |

*Bilješka.* $^{***}p < 0,001$; $^{**}p < 0,01$; $^{*}p < 0,05$

Dakle, kao što se može vidjeti iz Tablice 5.18., nije utvrđena značajna razlika u koncentraciji pepsina u slini među sudionicima kojim nemaju, imaju parcijalnu te imaju kompletnu ventrikularnu obliteraciju niti u skupini s malignim niti u skupini s benignim promjenama. U obje skupine, sudionici s parcijalnom ventrikularnom obliteracijom imali su najvišu koncentraciju pepsina u slini, dok je najniža izmjerena među onima kod kojih nije dijagnosticiran ovaj simptom. Treba naglasiti da je raspršenje rezultata veće u skupini s malignim promjenama.

### 5.4.13. Analiza koncentracija pepsina u slini u skupinama s malignim i benignim promjenama s obzirom na hiperemiju grkljana

Postupak je ponovljen za hiperemiju, a rezultati su prikazani u Tablici 5.19.

Tablica 5.19. Koncentracija pepsina u slini s obzirom na prisutnost hiperemije kod sudionika s malignim i benignim promjenama

| Skupina | Hiperemija | N | M | SD | F-omjer |
|---|---|---|---|---|---|
| Maligne promjene | Nema | 0 | -- | -- | 0,59 |
| | Samo aritenoida | 4 | 230,50 | 177,28 | |
| | Difuzna | 21 | 182,71 | 101,06 | |
| Benigne promjene | Nema | 2 | 177,50 | 10,61 | 0,30 |
| | Samo aritenoida | 12 | 174,50 | 63,51 | |
| | Difuzna | 11 | 194,55 | 64,40 | |

*Bilješka.* ***$p < 0,001$; **$p < 0,01$; *$p < 0,05$

Slično rezultatima za ventrikularnu obliteraciju, nije utvrđena značajna razlika među sudionicima koji nemaju, imaju samo aritenoidu i imaju difuznu hiperemiju u dvije skupine. U skupini s malignim promjenama sudionici kojima je dijagnosticirana samo aritenoida izmjerena je i viša koncentracija pepsina u slini. Za razliku od toga, u skupini s benignim promjenama najviša koncentracija pepsina u slini izmjerena je u skupini s difuznom hiperemijom, dok su preostale dvije skupine imale gotovo identične koncentracije pepsina. Treba naglasiti da je raspršenje rezultata veće u skupini s malignim promjenama.

### 5.4.14. Analiza koncentracija pepsina u slini u skupini s malignim promjenama s obzirom na T stadij

U skupini s malignim promjenama, uz kontrolu dobi, uspoređeni su sudionici različitog T stadija (T1-T4) s obzirom na koncentraciju pepsina u slini.
Rezultati su prikazani u Tablici 5.20.

Tablica 5.20. Usporedba sudionika različitog T stadija s obzirom na koncentraciju pepsina u slini

| T stadij (T1-T4) | N | M | SD | F-omjer | Usporedba |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 7 | 214,29 | 110,78 | 3,50* | T2 < T3 |
| 2 | 8 | 137,12 | 67,86 | | |
| 3 | 5 | 280,00 | 69,28 | | |
| 4 | 2 | 310,00 | 155,56 | | |

*Bilješka.* ***$p < 0,001$; **$p < 0,01$; *$p < 0,05$;

Dakle, nakon kontrole dobi utvrđena je značajna razlika u koncentraciji pepsina u slini između sudionika s T stadijima T2 i T3 ($p < 0,05$), pri čemu je viša koncentracija pepsina izmjerena kod sudionika s T stadijem T3. Razlike među ostalim skupinama nisu statistički značajne. Općenito, najniža koncentracija izmjerena je kod sudionika s T stadijem T2, a najviša kod sudionika s T4 stadijem. Dobivene rezultate treba interpretirati s oprezom s obzirom na veliko raspršenje u skupinama sa stadijima T1 i T4.

## 5.6. Analiza rezultata dobivenih imunohistokemijskom obradom uzoraka tkiva grkljana

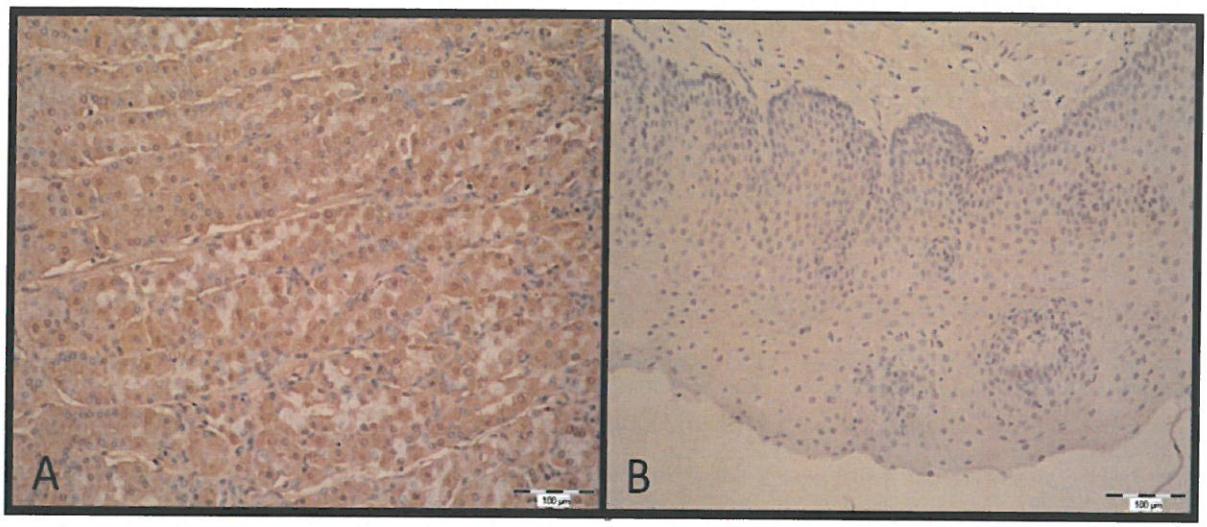
Analizirani su uzorci tkiva interaritenoidnog područja kod kontrolnih ispitanika te uzorci tkiva benignih i malignih promjena na grkljanu.

Imunohistokemijskom analizom dobiven je pozitivan signal u svim analiziranim uzorcima. IHK signal vidi se u obliku smeđih citoplazmatskih zrnca različitog intenziteta, unutar citoplazme epitelnih stanica. Intenzitet IHK signala bilježen je u četiri kategorije, kao negativan (-), slabo pozitivan (+), umjereno pozitivan (++) i jako pozitivan (+++). Za pozitivnu kontrolu korišteno je zdravo tkivo želuca.

Uzorci tkiva malignih promjena grkljana pokazali su jaku pozitivnosti, uzorci tkiva benignih promjena grkljana umjerenu pozitivnost, a uzorci tkiva kontrolnih ispitanika slabu pozitivnost.

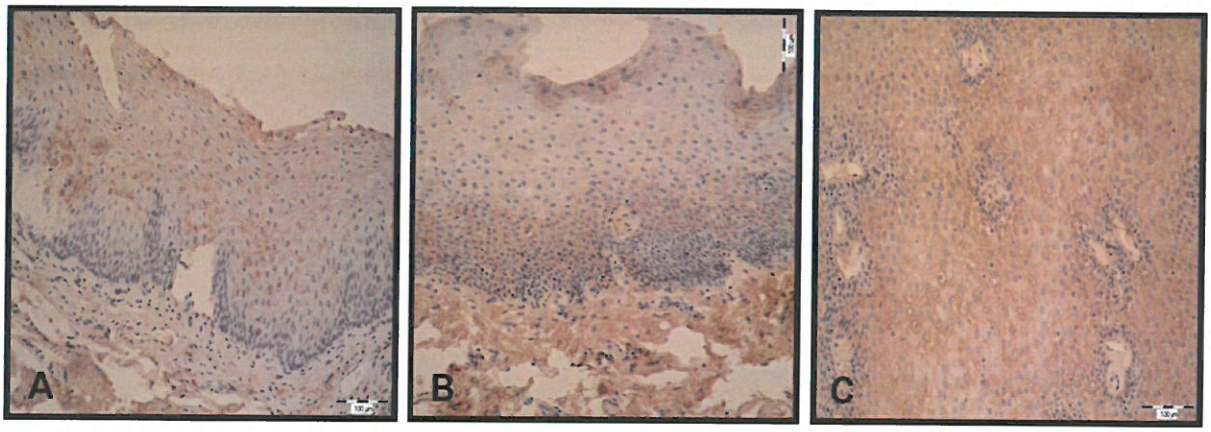
To je dobro vidljivo na slikama 5.5.-5.7.

**Slika 5.5.**



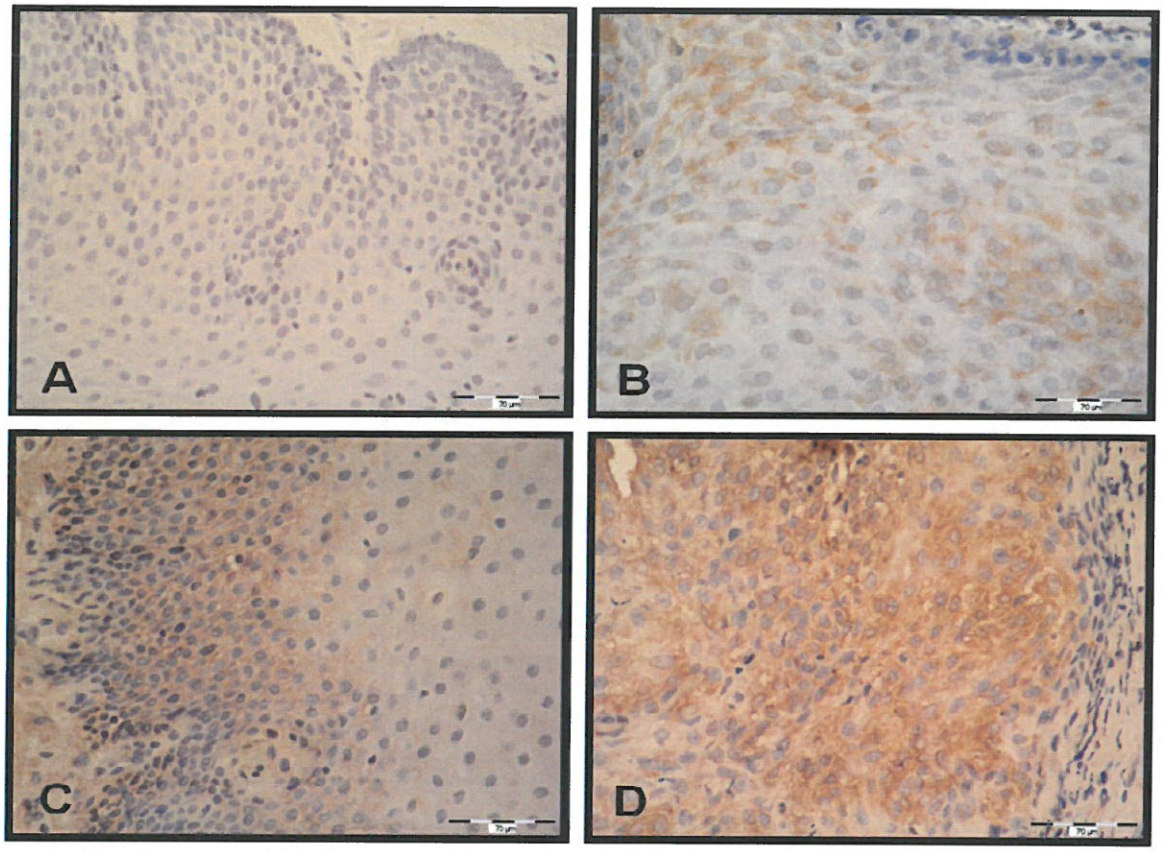

**Slika 5.5.**: Rezultati imunohistokemijske analize. Povećanje 200x. **A** Pozitivna kontrola, tkivo želuca, IHK signal se prikazuje u žljezdanim stanicama želučane sluznice, jako pozitivnog intenziteta (+++). **B** Negativna kontrola, tkivo grkljana, nema IHK signala (-).

**Slika 5.6.**




**Slika 5.6.** Imunohistokemijska detekcija pepsina. Povećanje 200x. **(A)** Kontrolna skupina, zdravo tkivo grkljana, IHK signal prisutan u citoplazmi epitelnih stanica, slabo pozitivan (+) **(B)** Benigna promjena grkljana, IHK signal prisutan u citoplazmi epitelnih stanica, umjereno pozitivan (++). **(C)** Maligna promjena grkljana, IHK signal prisutan u citoplazmi tumorskih stanica, jako pozitivan (+++).

Slika 5.7.




**Slika 5.7.** Imunohistokemijska detekcija pepsina. Povećanje 400x. **(A)** Negativna kontrola, nema IHK signala (-). **(B)** Kontrolna skupina, zdravo tkivo grkljana, IHK signal prisutan u citoplazmi epitelnih stanica, slabo pozitivan (+) **(C)** Benigna promjena grkljana, IHK signal prisutan u citoplazmi epitelnih stanica, umjereno pozitivan (++). **(D)** Maligna promjena grkljana, IHK signal prisutan u citoplazmi tumorskih stanica, jako pozitivan (+++).

# 6. RASPRAVA

Da bi se moglo govoriti o uzročnom djelovanju kiseline i pepsina na nastajanje dobroćudnih i zloćudnih promjena grkljana treba se još jednom osvrnuti na mehanizam djelovanja klorovodinične kiseline i pepsina na ljudski grkljan. Kao što je poznato osim direktnog korozivnog djelovanja želučane kiseline na sluznicu grkljana mnoga istraživanja dokazala su bitan doprinos pepsina iz refluksata želuca u oštećenju i transformaciji epitela grkljana.

Erickson i sur. (8) su glasnice svinje izložili djelovanju kiseline i pepsina, samo kiseline i samo pepsina, a kontrolnu grupu samo djelovanju pH neutralne supstancije. U roku od 30 minuta glasnice izložene djelovanju kiseline i pepsina i samo kiseline pokazale su značajno smanjenje transepitelijalnog otpora i to ireverzibilnog karaktera. Oni su zaključili da refluks kompromitira epitelne barijere bez većih strukturnih promjena. Kod zdravih glasnica smanjenje transepitelijalnog otpora može ukazati na poremećaje epitela u vezi sa refluksom.

Bulmer i sur. (9) su izložili svinjske larinkse djelovanju kiseline i pepsina i to na sljedećim mjestima: supraglotis, subglotis, stražnja komisura, glasnice i Morgagnijevi ventrikuli. Kod izloženosti na pH4 sva tkiva su bila otporna osim sluznice subglotisa i te su promjene dokazane histološki. Kod pH2 uz djelovanje kiseline i pepsina, svi ispitivani dijelovi su bili oštećeni osim stražnje komisure. Ovi autori su zaključili da je sluznica subglotisa najviše podložna oštećenju, a stražnja komisura najmanje. U osnovi tkiva grkljana su otporna na oštećenja kiselinom kod pH4, ali su oštećena ukoliko je prisutan i pepsin. Ovo ukazuje da je kod laringofaringealnog refluksa, štetno djelovanje klorovodinične kiseline ako je pH4 ili niži i to uz prisutnost pepsina.

Djelovanje pepsina na nastajanje dobroćudnih i zloćudnih promjena grkljana je ključno kod tzv. neaciditetnog refluksa kada su pH vrijednosti sluznice laringofarinksa iznad 7.

Johnston i sur. (45,46) istraživali su utjecaj pepsina na kulturama stanica laringofarinksa. Dokazali su receptor posredovanu endocitozu pepsina i njegov utjecaj na oštećenje mitohondrija i promjenu ekspresije više gena povezanih sa stresom i toksičnošću. Zaključili su da se pepsin kod pH 7 tijekom tzv. neaciditetnog refluksa može reaktivirati unutar stanice i uzrokovati znatna oštećenja. U daljnjim istraživanjima Johnston i sur. (41) pokazali su da kulture stanica hipofarinksa izložene djelovanju pepsina pokazuju značajnu promjenu ekspresije 27 gena povezanih sa karcinogenezom tumora glave i vrata.

Udruženo djelovanje kiseline i pepsina tijekom laringofaringealnog refluksa dovodi ne samo do poremećaja epitela glasnice ili naušavanja neuralnih mehanizma, nego i do promjena morfologije glasnica.

Arruda Henry i sur. (47) su kod pacijenata s gastroezofagealnim refluksom i poremećajem glasa, na glasnicama našli: kongestiju, atrofiju, asimetriju glasnica, čvoriće, ciste i polipe.

Chung i sur. (25) na temelju 24-satne pH-metrije nalaze na 200 ispitanika s dobroćudnim promjenama glasnica značajan utjecaj refluksa na njihov razvoj. Prevalencija laringofaringealnog refluksa je postojala u 66 % ispitanika s čvorićima glasnica, 75% ispitanika s polipom glasnice i u 90% ispitanika s Reinkeovim edemima. Oni su zaključili da je laringofaringealni refluks povezan s porastom rizika za nastanak Reinkeovih edema odnosno da LPR može igrati ulogu kao etiološki faktor u nastanku Reinkeovih edema, polipa i čvorića glasnica.

U ispitivanju koje su proveli Kravos i sur. (48) laringofaringealni refluks kao rizični čimbenik, značajno je zastupljeniji u skupini pacijenata s Reinkeovim edemima nego u kontrolnoj skupini.

Kuhn i sur. (49) zaključili su da je prevalencija LPR-a značajno viša u ispitanika s čvorićima glasnica u usporedbi s normalnom populacijom. Preko 60 % ispitanika s čvorićima glasnica je pH-metrijskim ispitivanjem imalo LPR.

Beltsis i sur. (24) su pomoću 24-satne pH-metrije dokazali LPR u 75% ispitanika s polipima glasnica, u 60% ispitanika s čvorićima glasnica, u 66 % ispitanika s Reinkeovim edemima i u 100% ispitanika s granulomima i leukoplakijama glasnica. Od svih ispitanika s dobroćudnim promjenama grkljana kojima je pH-metrijski dokazan LPR njih 55 % su bili pušači cigareta, a 89% nepušači.

Kantas i sur. (7) pokazali su da LPR utječe na epitelizaciju glasnica tj. na brzinu oporavka sluznice glasnica nakon parcijalne ili totalne dekortikacije kod polipa glasnica i Reinkeovih edema. LPR također povećava mogućnost ponovne pojave polipa glasnica i Reinkeovih edema. Rezultati kirurškog liječenja polipa glasnica i Reinkeovih edema bili su puno bolji kada su pacijenti s LPR-om dobivali antirefluksnu terapiju inhibitorima protonske pumpe prije i poslije operativnog zahvata.

Iako se zna da su glavni etiološki čimbenici u nastanku zloćudnih i premalignih promjena grkljana dugogodišnja konzumacija cigareta i alkoholnih pića u novije vrijeme mnogi radovi upućuju da je LPR značajan kofaktor u nastajanju premalignih i malignih promjena grkljana (27-

28,50-54). S obzirom na multifaktorijalne uzroke nastanka karcinoma grkljana i dalje nije moguće sa sigurnošću utvrditi točnu posljedičnu vezu između karcinoma grkljana i LPR-a.

Pregledom svjetske literature prevalencija LPR-a u ispitanika s karcinomom grkljana kreće se od 68 do 87%. Neke studije pokazale su veću pojavnost LPR-a u ispitanika s karcinomom grkljana koji su nepušači prema pušačima što ističe važnost utjecaja LPR-a na razvoj karcinoma grkljana kod nepušača (27).

Brojna su istraživanja, temeljena na 24-satnoj pH-metriju kao glavnoj dijagnostičkoj metodi, povezivala LPR i tumore grkljana.

Galli i sur. (55-58) su u nekoliko istraživanja pokazali da je LPR prisutan u 81% ispitanika s karcinomom grkljana. Od toga 63,7% pacijenata nisu imali tipične simptome LPR-a. Također su pokazali da je prethodna gastrektomija kod 8% ispitanika bila dodatni rizični čimbenik za razvoj karcinoma grkljana i premalignih promjena.

Dağli i sur. (59) su 24-satnom pH-metrijom ustanovili LPR u 63% ispitanika s karcinomom grkljana, a Copper i sur. (60) u 19/24 ispitanika s karcinomom grkljana.

Lewin i sur. (61) utvrdili su 24-satnom pH-metrijom visoku incidenciju LPR-a u 85% ispitanika s premalignim i ranim karcinomom grkljana ( T1 i T2 karcinoma). S obzirom na položaj u 91% ispitanika LPR-a je zabilježen u uspravnom položaju, a u samo 9% ispitanika u ležećem položaju.

Činjenica da pepsin ima primarnu ulogu u oštećenju stanica grkljana tijekom LPR-a usmjerila je mnoga istraživanja na njegovo otkrivanje u tjelesnim tekućinama (slini i sputumu) i u tkivima. Ta su istraživanja pokazala da imunološki izmjerena koncentracija pepsina u tjelesnim tekućinama može biti odličan pokazatelj LPR-a.

Trenutačni dijagnostički pristupi za utvrđivanje LPR-a temelje se na modalitetima koji su nespecifični i niske osjetljivosti, prema nekim autorima 50-80 % (62,63). U dijagnostici LPR-a i dalje se kao zlatni standard koristi 24-satna višekanalna pH-metrija. Navedena je pretraga skupa, teško dostupna, invazivna (oko 20% ispitanika ne tolerira pH-metriju) te svrsishodna isključivo u ispitanika s aciditetnim refluksom (8). Empirijska terapija inhibitorima protonske pumpe, koja je ujedno i dijagnostička metoda, je dugotrajna, skupa i nosi sa sobom niz nuspojava uslijed djelovanja dugotrajne konzumacije lijekova (64,65). Korištenjem upitnika po Belafskom (RSI, RFS) pomaže kliničaru objektivizirati bolesnikove smetnje, ali su kao dijagnostičke metode odveć subjektivne te ovisne o iskustvu i procjeni ispitivača (66).

Samuels i sur. (67) i Johnston i sur. (68) utvrdili su da je imunološko određivanje pepsina iz sline i sputuma ELISA metodom 100% osjetljivosti i 89% specifičnosti u otkrivanju LPR-a uspoređujući ga s 24-satnom pH metrijom kao zlatnim standardom.

Wang i sur. (69) pokazali su da nema razlike u koncentracijama pepsina s obzirom na na mjesto skupljanja (usna šupljina ili hipofarinks) i vremena skupljanja sline (prije spavanja ili u jutarnjim satima). Izmjerili su više koncentracije pepsina kod ispitanika s kroničnim laringitisom nego kod asimptomatskih zdravih kontrola.

Druga istraživanja pokazala su veliku vrijednost imunološkog određivanja pepsina iz sline i sputuma u dijagnostici kroničnog laringitisa i u praćenju uspješnosti antirefluksne terapije (70,71).

U svim navedenim, dosadašnjim istraživanjima nitko nije određivao vrijednosti pepsina iz sline i uzoraka tkiva u ispitanika s dobroćudnim i zloćudnim promjenama grkljana.

Stoga, u ovom istraživanju smo određivali vrijednosti pepsina iz sline i uzoraka tkiva u ispitanika s dobroćudnim i zloćudnim promjenama grkljana i u kontrolnih ispitanika bez simptoma i kliničkih znakova LPR-a.

ELISA metodom u svih ispitanika i kontrola pronađen je pepsin u slini, ali u različitim koncentracijama.

Nije utvrđena značajna razlika u koncentraciji pepsina između muškaraca i žena. S tim da je koncentracija pepsina u muškaraca u prosjeku bila viša nego u žena.

Koncentracija pepsina u kontrolnoj skupini i skupini sa zloćudnim promjenama je nešto viša u starijih ispitanika (iznad 50 godina života), a u skupini s dobroćudnim promjenama nešto viša u mlađih ispitanika (mlađi od 50 godina). To može ukazivati da su ispitanici s dobroćudnim promjenama puno ranije izloženi LPR-u te da pojavnost asimptomatskog LPR-a raste sa starijom dobi.

S obzirom da je karcinom grkljana uglavnom bolest muške populacije, a dobroćudne promjene grkljana su izraženije u ženske populacije izmjerene koncentracije pepsina za muškarce i žene također su dale očekivane rezultate. U muškaraca, viša koncentracija pepsina izmjerena je u ispitanika s karcinomom grkljana, međutim, prema drugim dijagnozama razlika nije statistički značajna. U žena, najviša koncentracija pepsina izmjerena je u ispitanica s Reinkeovim edemima, nakon čega slijede ispitanice s karcinomom grkljana i polipima glasnica.

Uspoređujući sve tri skupine ispitanika prema izmjerenoj koncentraciji pepsina u slini dobiveni su očekivani rezultati.

U skupini ispitanika sa zloćudnim promjenama grkljana izmjerena je najviša koncentracija pepsina, potom u skupini ispitanika s dobroćudnim promjenama grkljana dok je najniža koncentracija izmjerena u kontrolnoj skupini ispitanika. No, razlike nisu statistički značajne. Rezultati ukazuju na višu koncentraciju pepsina u slini ispitanika s dobroćudnim i zloćudnim promjena grkljana nego u zdravih osoba što može biti posljedica veće učestalosti LPR-a u dvije ispitivane grupe. Ti rezultati odgovaraju ranije navedenim istraživanjima koja su pH metrijskim mjerenjima utvrdili LPR u 60-100 % pacijenata s dobroćudnim promjenama i 68%-87% pacijenata sa zloćudnim promjenama (24,25,27).

S obzirom na histološku dijagnozu i izmjerene koncentracije pepsina u slini dobiveni su također očekivani rezultati. Rezultati pH metrijskih mjerenja iz prethodnih istraživanja ukazivali su na veću pojavnost LPR-a kod Reinkeovih edema, potom su slijedili polipi glasnica, a najmanja pojavnost je bila kod drugih benignih dijagnoza (24,25). Ovim istraživanjem potvrđeni su rezultati pH-metrijskih istraživanja.

U ispitanika s Reinkeovim edemima utvrđena je značajno viša koncentracija pepsina nego u ispitanika bez simptoma LPR-a ($p < 0,05$). U mlađih ispitanika s Reinkeovim edemima utvrđena je značajno viša koncentracija pepsina nego u ispitanika bez simptoma LPR-a ($p < 0,001$). U žena s Reinkeovim edemima utvrđena je značajno viša koncentracija pepsina nego u ispitanica bez simptoma LPR-a ($p < 0,001$). Dakle, mlađe žene s Reinkeovim edemima imaju značajno više koncentracije pepsina u slini od kontrolne grupe ispitanika bez simptoma LPR-a. Znatno više koncentracije pepsina u slini utvrđene su i u žena s polipima glasnica uspoređujući ih s kontrolnom skupinom ispitanica, ali vrijednosti nisu statistički značajne.

Izmjerene koncentracije pepsina u ispitanika s polipima glasnica i kontrolne skupine ispitanika gotovo su identične. To može ukazivati da su fonotrauma i pušenje u muških ispitanika glavni etiološki faktori u nasatanku polipa glasnica.

Usporedbom svih skupina ispitanika s obzirom na koncentraciju pepsina nije utvrđena statistički značajna razlika. Najviša koncentracija pepsina izmjerena je u skupini ispitanika s laringealnom papilomatozom, nakon čega slijedi skupina ispitanika s Reinkeovim edemima, a zatim skupina ispitanika s polipima glasnica te karcinomom grkljana.

Analizirajući pojedine dijagnoze s obzirom na dob pacijenta također su dobiveni rezultati u skladu s dosadašnjom raspravom. U mlađih ispitanika (mlađi od 50 godina) s RE utvrđena je značajno viša koncentracija pepsina nego u mlađih ispitanika s PCC ($p < 0,01$). Razlike između ispitanika s PG i PC te PG i RE su značajne na razini rizika od 8%. Pri tome je u ispitanika s PG izmjerena viša koncentracija nego kod pacijenata s PCC dijagnozom, ali niža koncentracija nego u ispitanika s RE. Niže koncentracije pepsina u mlađih ispitanika sa zloćudnim promjenama grkljana posljedica su malog broja mlađih ispitanika s karcinomom grkljana. Suprotno tome, u starijih ispitanika (stariji od 50 godina) nije utvrđena statistički značajna razlika u koncentraciji pepsina u slini među skupinama ispitanika s različitim dijagnozama. Najviše koncentracije pepsina izmjerene su u skupinama ispitanika s karcinomom grkljana i s laringealnom papilomatozom, a najniže u skupini ispitanika s RE. Razlika u koncentracijama može se objasniti time što su karcinom glasnica i laringealna papilomatoza bolesti koje se javljaju većinom u starijoj životnoj dobi te je očekivano da koncentracije pepsina budu više nego kod ispitanika s dobroćudnim promjenama grkljana.

Uspoređujući ispitanike sa zloćudnim promjena grkljanu s obzirom na veličinu tumora prema T klasifikaciji i koncentraciju pepsina uznapredovali karcinomi ili tzv. kasni karcinomi (T3 i T4) imaju značajno više koncentracije pepsina u slini nasuprot tzv. ranim karcinomima (T1 i T2). To se može objasniti činjenicom da ispitanici s velikim tumorima grkljana (T3, T4) imaju poremećen akt gutanja i samim tim veću vjerojatnost za učestaliji LPR nego ispitanici s manjim karcinomima grkljana koji su ograničeni samo na glotis.

U recentnoj literaturi nema mnogo istraživanja koja su koristila imunohistokemijsku analizu uzoraka tkiva grkljana na prisutnost pepsina. Kako je pokazano pepsin se može receptor posredovanom endocitozom pohraniti unutar stanice kod nepovoljne pH vrijednosti kakva je na sluznici laringofarinksa (72,73). Stoga je za očekivati da će se unutar stanica mukoze grkljana imunohistokemijskom metodom dokazati pepsin.

Jedno od takvih istraživanja proveli su Jiang i sur. (74) koji su imunohistokemijski analizirali bioptate iz interaritenoidnog prostora na prisutnost pepsina unutar stanica mukoze grkljana u ispitanika bez simptoma LPR-a i u ispitanika s kroničnim laringitisom. Ispitanici s LPR-om probrani su kombinacijom 24-satne pH-metrije i mulitikanalne intraluminalne impedance. Kod većine ispitivanih uzoraka nađen je pepsin unutar stanica mukoze grkljana. U ispitanika bez simptoma LPR-a u preko 50% uzoraka pronađena je slaba pozitivnost uzoraka na

pepsin, a u 47% slučajeva nije pronađen pepsin u stanicama mukoze grkljana. Ispitanici s kroničnim laringitisom su u preko 80% uzoraka imali rezultate od umjereno do jako pozitivnih na pepsin. Gledajući pacijente s LPR-om s obzirom na tip refluksa nije nađena razlika između skupine pacijenata s aciditetnim i neaciditenim refluksom. Koristeći slabu pozitivnost na pepsin kao polaznu točku utvrdili su da je imunohistokemijski dokazan unutarstanični pepsin 100% osjetljiv i 47% specifičan u otkrivanju LPR-a. Svojim istraživanjem pokazali su da je pepsin u značajnoj mjeri prisutan u stanicama sluznice grkljana u ispitanika s kroničnim laringitisom.

Do sada niti jedno istraživanje nije provelo imunohistokemijsku analizu uzoraka tkiva doborćudnih i zloćudnih promjena grkljana na pepsin. Upravo ovo istraživanje daje rezultate imunohistokemijske analize na pepsin za te dvije skupine.

Analizirajući uzorke tkiva grkljana u svim uzorcima je pronađen pepsin unutar stanica sluznice. Uzorci u ispitanika koji nisu imali LPR uglavnom su bili slabo pozitivni. Samo u dva uzorka kontrolne skupine utvrđena je jaka pozitivnost na pepsin. Također, u njih je utvrđena i visoka koncentracija pepsina u slini što upućuje da su ti ispitanici imali asimptomatski LPR koji probirom uz pomoću RSI i RFS sustava bodovanja nije uočen. Dakle kao i u istraživanju koje su proveli Jiang i sur. (74) nađena je slaba pozitivnost bioptata grkljana u preko 50% ispitanika bez LPR-a. U skoro polovice uzoraka nije nađen pepsin što nije bio slučaj sa ovim istraživanjem koje je potvrdilo prisutnost pepsina u svim uzorcima kontrolne skupine.

Uzorci tkiva grkljana u ispitanika s dobroćudnim promjenama grkljana bili su umjereno pozitivni na pepsin, a u ispitanika sa zloćudnim promjenama grkljana uzorci tkiva grkljana bili su jako pozitivni na pepsin. S obzirom da su Jiang i sur. (74) imunohistokemijski dokazali jaku i umjerenu pozitivnost u preko 80% uzoraka tkiva pacijenata sa LPR-om može se pretpostaviti da pacijenti sa dobroćudnim i zloćudnim promjenama imaju u velikom postotku prisutan laringofaringealni refluks.

Rezultati imunuhistokemijskog istraživanja upućuju na veću prisutnost pepsina unutar stanica sluznice grkljana u dobroćudnih i zloćudnih dijagnoza stoga je i veća mogućnost oštećenja samih stanica direktnim djelovanjem pepsina unutar citoplazme stanica. Ovi rezultati mogu upućivati da je LPR bitan kofaktor u nastanku dobroćudnih i zloćudnih promjena sluznice grkljana.

Mnoga istraživanja usmjerila su se na vrijednosti RSI i RFS sustava bodovanja u probiru pacijenata s LPR-om.

Powell i sur. (66) su utvrdili da upitnik po Belafskom – RFS - ima osjetljivost 87.8% i specifičnost 37.5% za probir ispitanika s LPR-om. Imajući na umu ove podatke svi zdravi ispitanici su bodovani upitnicima po Belafskom (RSI,RFS) radi što boljeg i točnijeg probira ispitanika za kontrolnu skupinu. Svi ispitanici s dobroćudnim i zloćudnim promjenama grkljana također su bodovani upitnicima po Belafskom (RSI, RFS) te su dobiveni očekivani rezultati.

Najviši prosječni RSI po Belafskom imala je skupina ispitanika s dobroćudnim promjenama grkljana (12,04), zatim slijedi grupa ispitanika s dobroćudnim promjenama grkljana (11,00), a najmanji RSI pokazala je kontrolna skupina ispitanika (2,64). Skupine ispitanika sa zloćudnim i dobroćudnim promjenama grkljana imale su statistički značajno viši RSI nego kontrolni ispitanici.

Najviši prosječni RFS po Belafskom imala je skupina ispitanika sa zloćudnim promjenama grkljana (13,89), zatim slijedi skupina ispitanika s dobroćudnim promjenama grkljana (11,57), a najmanji RSI pokazala je kontrolna skupina ispitanika (1,36). Skupine ispitanika sa zloćudnim i dobroćudnim promjenama grkljana imale su statistički značajno viši RFS nego kontrolni ispitanici.

Razlike u rezultatima su očekivane s obzirom da su RSI i RFS sustavi bodovanja bili metoda za probir ispitanika u kontrolnu skupinu. RSI iznad 13 i RFS iznad 7 snažni su indikatori za postavljanje sumnje na LPR. Prema tome, rezultati upitnika RSI i RFS u skupini ispitanika sa zloćudnim promjenama grkljana ukazuju na postojanje LPR-a u toj skupini ispitanika. U skupini ispitanika s dobroćudnim promjenama grkljana RSI je niži od 13 (11,00) dok je RFS iznad 7 (11,57) te ukazuje na prisutnost LPR-a u toj skupini ispitanika.

Analiza rezultata upitnika po Belafskom (RSI i RFS) s obzirom na pojedinačne simptome i kliničke znakove LPR-a pokazala je da je RSI najmanje povezan s pojedinačnim simptomima u skupini sa zloćudnim promjenama grkljana, dok su korelacije između RSI i pojedinačnih simptoma najveće u skupini s dobroćudnim promjenama grkljana. Najveća povezanost RFS-a s pojedinačnim simptomima utvrđena je u skupini s dobroćudnim promjenama grkljana, nakon čega slijede korelacije u skupini sa zloćudnim promjenama grkljana. Ispitanici koji su imali veći RFS češće je dijagnosticiran subglotični edem, ventrikularna obliteracija, hiperemija, izraženiji edem glasnica, izraženiji difuzni laringealni edem, izraženija hipetrofija stražnje komisure te granulom i gusta laringealna sluz.

Uspoređujući skupine ispitanika s dobroćudnim i zloćudnim promjenama grkljana s obzirom na izmjerene koncentracije pepsina u slini i RSI i RFS vidljivo je da je koncentracija pepsina jače povezana s RSI simptomima u skupini ispitanika s dobroćudnim promjenama. Povišena koncentracija pepsina u obje skupine ispitanika povezana je s nižim RSI zbrojem, izraženijim čišćenjem grla, otežanim gutanjem, kašljanjem nakon jela i ležanja, napadajima gušenja, izraženijim osjećajem stranog tijela u grlu i izraženijom žgaravicom.

U obje skupine ispitanika povišena koncentracija pepsina povezana je s višim RFS-om, prisutnim edemom glasnica, prisutnim difuznim laringealnim edemom i hipertrofijom stražnje komisure.

U skupini ispitanika sa zloćudnim promjenama grkljana višu koncentraciju pepsina u prosjeku prati izraženija promuklost, dok je u skupini s dobroćudnim promjenama grkljana viša koncentracija pepsina povezana s manje izraženom promuklošću. U obje skupine ispitanika oni s parcijalnom ventrikularnom obliteracijom imaju najvišu koncentraciju pepsina, dok je najniža koncentracija pepsina izmjerena među onim ispitanicima u kojih nije dijagnosticiran ovaj simptom.U skupini ispitanika sa zloćudnim promjenama grkljana oni kojima je dijagnosticirana samo hiperemija aritenoida izmjerena je i viša koncentracija pepsina. Za razliku od toga, u skupini ispitanika s dobroćudnim promjenama grkljana najviša je koncentracija pepsina izmjerena u skupini ispitanika s difuznom hiperemijom.

Povišene koncentracije pepsina u slini uz prisutnost karakterističnih znakova i simptoma LPR-a mogu ukazivati na veliku pojavnost LPR-a kod pacijenata sa dobroćudnim i zloćudnim promjenama grkljana.

Ovim istraživanjem doprinijeli smo promijeni dosadašnjeg shvaćanja etiopatogeneze dobroćudnih i zloćudnih bolesti grkljana, a pravilna i pravovremena dijagnostika LPR-a mogla bi promijeniti preventivni i terapijski pristup dobroćudnim i zloćudnim bolestima grkljana.

# 7. ZAKLJUČCI

1. Upitnici po Belafskom korisni su u postavljanju sumnje na postojanje laringofaringealnog refluksa u ispitanika s dobroćudnim i zloćudnim promjenama grkljana.

2. Koncentracije pepsina u slini razlikuju se u ispitanika s dobroćudnim i zloćudnim promjenama grkljana te u kontrolnih ispitanika.

3. Najviše koncentracije pepsina u slini nalazimo u ispitanika sa zloćudnim promjenama grkljana, a najniže u kontrolnih ispitanika.

4. Koncentracije pepsina u slini više su u ispitanika s višim zbrojem u upitnicima po Belafskom (RSI,RFS).

5. Ekspresija pepsina u citoplazmama sluznice razlikuje se u ispitanika s dobroćudnim i zloćudnim promjenama grkljana te u kontrolnih ispitanika.

6. Najvišu ekspresiju pepsina u citoplazmama sluznice imaju ispitanici sa zloćudnim promjenama grkljana, a najnižu kontrolni ispitanici.

7. Ekspresija pepsina u citoplazmama sluznice veća je u ispitanika s višim zbrojem u upitnicima po Belafskom (RSI,RFS).

8. Koncentracije pepsina u slini i ekspresija pepsina u citoplazmama sluznice najveća su u ispitanika sa zloćudnim promjenama grkljana.

9. Povišene razine pepsina u ispitanika s dobroćudnim i zloćudnim promjenama grkljana ukazuju na laringofaringealni refluks i pepsin kao etiološke faktore u nastanku dobroćudnih i zloćudnih promjena grkljana.

10. Pravovremenom dijagnostikom laringofaringealnog refluksa možemo promijeniti dosadašnje preventivne i terapijske pristupe dobroćudnim i zloćudnim bolestima grkljana.

# 8. SAŽETAK

**Ključne riječi: dobroćudne i zloćudne promjene grkljana; laringofaringealni refluks; pepsin**

**Cilj istraživanja:** Cilj ovog kliničkog ispitivanja je dati odgovor na pitanje postoji li povezanost između pepsina/laringofaringealnog refluksa i dobroćudnih/zloćudnih promjena na grkljanu.

**Nacrt studije:** Radi se o prospektivnoj studiji koja uključuje tri skupine ispitanika: (1) pacijente s dobroćudnim promjenama grkljana, (2) pacijente sa zloćudnim promjenama grkljana i (3) ispitanike bez simptoma i znakova laringofaringealnog refluksa.

**Ispitanici i metode:** U istraživanje je uključeno 81 dobrovoljnih ispitanika starijih od 18 godina. Ispitanici su odabrani među pacijentima operiranim zbog dobroćudnih i zloćudnih promjena na grkljanu te kontrole među pacijentima operiranim zbog devijacije nosnog septuma, a koji nemaju simptome laringofaringealnog refluksa.

**Materijali i metode:** Svim ispitanicima uzeta je slina prije operativnog zahvata. Direktoskopijom grkljana u općoj anesteziji uzete su biopsije dobroćudnih i zloćudnih promjena grkljana, a kod kontrolnih ispitanika biopsije interaritenoidnog područja grkljana. Svi uzorci su analizirani na pepsin primjenom ELISA i Imunohistokemijske metode.

**Rezultati:** Svim pacijentima u slini i u biopsijama grkljana utvrđen je pepsin u različitim vrijednostima. ELISA metodom izmjerene su najveće koncentracije pepsina u slini kod grupe pacijenata s malignim promjenama grkljana potom kod grupe pacijenata s benignim promjenama grkljana, a najmanje vrijednosti kod kontrolne grupe ispitanika. Te razlike u koncentracijama pepsina u konačnici nisu bile tolike da bi bile statistički značajne. Imunohistokemijskom metodom u biopsijama tkiva grkljana utvrđena je jaka pozitivnost na pepsin kod grupe s malignim promjenama, umjerena pozitivnost kod grupe s benignim promjenama i slaba pozitivnost kod grupe kontrolnih ispitanika.

**Zaključak:** Rezultati dobiveni ELISA i Imunohistokemijskom metodom pokazuju usporedive razlike u smislu povišene koncentracije pepsina u slini i većoj ekspresiji pepsina u mukozi grkljana kod ispitanika s benignim i malignim promjenama uspoređujući ih sa zdravim

pojedincima što može ukazivati na povezanost pepsina / laringofaringealnog refluksa i nastanka benignih i malignih promjena grkljana. Potrebna su daljnja istraživanja s većim brojem ispitanika radi točnijeg utvrđivanja uloge pepsina u multifaktorijalnoj etiologiji dobroćudnih i zloćudnih promjena grkljana.

# 9. SUMMARY

**Role of the pepsin in development of laryngeal benign and malignant neoplasms**

**Objectives:** The aim of this study was to investigate hypothetical link beetween pepsin found in laryngopharyngeal reflux and benign and malignant laryngeal neoplasms.

**Study design:** This was a prospective study which included 3 groups of participants: (1) patients with benign laryngeal neoplasms, (2) patients with malignant laryngeal neoplasms and (3) control subjects without symptoms and signs of laryngopharyngeal reflux.

**Participants and methods:** 81 voluntary participants were included into study. They were recruited from group of patients with histologicaly proven benign and malignant laryngeal neoplasms and in case of control subjects among patients with nasal septum deformation without symptoms of laryngopharyngeal reflux.

**Materials and Methods:** Morning saliva samples were collected preoperatevely. Tumor biopsies were collected by directoscopy of larynx during general anesthesia and the control samples from interarythenoid unit of larynx. All samples were analysed by ELISA and Immunohistochemistry (IHC).

**Results:** Pepsin was found in all samples of saliva and tissue biopsies. The highest concentration of pepsin was found in group of patients with malignant laryngeal neoplasms. Patients with benign laryngeal neoplasms had somewhat lower concentrations and the control subjects presented with the lowest concentration of pepsin measured from their saliva. However, the differencies were not statistically significant. IHC analysis of tissue biopsies showed high pepsin positivity in malignant tissue samples, moderate pepsin positivity in benign tissue samples and only low pepsin positivity in healthy laryngeal tissue samples.

**Conclusion:** ELISA and Immunohistochemisty gave comparable results in terms of higher pepsin concentration and tissue expression in malignant and benign group compared to healthy control subjects. These results suggest that pepsin and laryngopharyngeal reflux can contribute to the development of benign and malignant laryngeal neoplasms. However, further prospective studies, with far more patients are necessary to prove the role of pepsin in multifactorial ethiology of benign and malignant laryngeal neoplasms.

**Key words: laryngeal neoplasms; laryngopharyngeal reflux; pepsin**

# 10. LITERATURA


1. Stefanović P. Otorinolaringologija sa maksilofacijalnom patologijom. 4. izd. Beograd; 1994. str. 268-274.
2. Khan AM, Hashmi SR, Elahi F, Tariq M, Ingrams DR. Laryngopharyngeal reflux: A literature review. Surgeon. 2006 Aug;4(4):221-5.
3. Sereg-Bahar M, Jansa R, Hocevar-Boltezar I. Voice disorders and gastroesophageal reflux. Logopedics foniatrics vocology. 2005; 30:120-124.
4. Sataloff RT, Hawkshaw MJ, Gupta R. Laryngopharyngeal reflux and voice disorders: an overview on disease mechanisms, treatments, and research advances. Discov Med. 2010 Sep;10(52):213-24.
5. Celik M, Ercan I. Diagnosis and management of laryngopharyngeal reflux disease. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg. 2006 Jun;14(3):150-5.
6. Wood JM, Hussey DJ, Woods CM, Watson DI, Carney AS. Biomarkers and laryngopharyngeal reflux. J Laryngol Otol. 2011 Sep 14:1-7.
7. Kantas I, Balatsouras DG, Kamargianis N, Katotomichelakis M, Riga M, Danielidis V. The influence of laryngopharyngeal reflux in the healing of laryngeal trauma. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2009 Feb;266(2):253-9
8. Erickson E, Sivasankar M. Simulated reflux decreases vocal fold epithelial barrier resistance. Laryngoscope. 2010 Aug;120(8):1569-75.
9. Bulmer DM, Ali MS, Brownlee IA, Dettmar PW, Pearson JP. Laryngeal mucosa: its susceptibility to damage by acid and pepsin. Laryngoscope. 2010 Apr;120(4):777-82
10. Remacle M, Lawson G. Diagnosis and management of laryngopharyngeal reflux disease. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg. 2006 Jun;14(3):143-9.
11. Koufman JA, Sataloff RT, Toohill R. Laryngopharyngeal reflux: consensus conference report. J Voice. 1996 Sep; 10(3):215-6.
12. Koufmann J, Aviv JE, Casiano RR, Shaw GY. Laryngopharyngeal reflux: Position stastement of the Committtee on Speech, Voice , and Swallowing disorders of the American Academy of Otolaryngology-Head and neck Surgery. Otolaryngol Head Neck Surg. 2002;127(1):32-5.

13. Koufman JA, Amin MR, Panetti M. The prevalence of the reflux in 113 consecutive patients with laryngeal and voice disorders. Otolaryngol Head Neck Surg. 2000;123:385-388.
14. Bumber Ž, Katić V, Nikšić-Ivančić M, Pegan B, Petric V, Šprem N. Otorinolaringologija. Zagreb; 2004. str. 251-254, 267-272.
15. Snow JB, Ballenger JJ. Ballengers Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery. 16th ed. BC Decker; 2003. p. 1214.
16. Evans Rhys PH, Montgomery PQ, Gullane PJ. Principles and Practice of Head and Neck Oncology. Martin Dunitz; 2003. p. 282-292.
17. Shah JP, Patel SG. Cancer of the Head and Neck. BC Decker; 2001. p. 156.
18. Prgomet D i sur. Postupnik za liječenje tumora glave i vrata. Klinika za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata KBC Zagreb 2007.
19. Roh JL, Yoon YH. Effect of acid and pepsin on glottis wound healing: a simulated reflux model. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2006 Sep;132(9):995-1000
20. Loughlin CJ, Koufman JA. Paroxysmal laryngospasm secondary to gastroesophageal reflux. Laryngoscope. 1996;106:1502-5.
21. Loughlin CJ, Koufman JA, Averill DB, et al. Acid induced laryngospasm in a canine Model. Laryngoscope. 1996;1506-9.
22. Maronian NC, Azadeh H, Waugh P, Hillel A. Association of laryngopharyngeal reflux disease and subglottic stenosis. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2001 Jul;110(7Pt1);6060-12.
23. Little FB, Koufman JA, Kohut RI, Marshall RB. Effect of gastric acid on the pathogenesis of subglottic stenosis. Ann Otol Rhinol Larygol. 1985 ; 9485 Pt1):516-9.
24. Beltsis A, Katsinelos P, Kountouras J, Kamarianis N, Zavos C, Pournaras A, et al. Double probe pH-monitoring findings in patients with benign lesions of the true vocal folds: comparison with typical GERD and the effect of smoking. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2011 Aug;268(8):1169-74
25. Chung JH, Tae K, Lee YS, Jeong JH, Cho SH, Kim KR, et al. The significance of laryngopharyngeal reflux in benign vocal mucosal lesions. Otolaryngol Head Neck Surg. 2009 Sep;141(3):369-73.
26. Farrokhi F, Vaezi MF. Laryngeal disorders in patients with gastroesophageal reflux disease. Minerva Gastroenterol Dietol. 2007 Jun; 53(2):181-7.

27. Galli J, Cammarota G, Volante M, De Corso E, Almadori G, Paludetti G. Laryngeal carcinoma and laryngo-pharyngeal refux disease. Acta Otorhinolaryngol Ital. 2006; 26(5):260-3.

28. Koufman JA, Burke AJ. The etiology and pathogenesis of laryngeal carcinoma. Otolaryngol Clin North Am. 1997;30:1-19.

29. Bothwell MR, Parsons DS, Talbot A, et al. Outcome of reflux therapy on pediatric chronic sinusitis. Otolaryngol Head Neck Surg. 1999;121:255-62.

30. Bowrey DJ, Peters JH, DeMeester TR. Gastroesophageal reflux disease in asthma: effects of medical and surgical antireflux therapy on asthma control. Ann Surg. 2000; 231:161-72.

31. Harding SM, Richter JE, Guzzo MR, et al. Asthma and gastroesophageal reflux: acid suppressive therapy improves asthma outcome. Am J Med. 1996;100:395-405.

32. Tasker A, Dettmar PW, Panetti M, Koufman JA, Birchall JP, Pearson JP. Reflux of gastric juice and glue ear in children. Lancet. 2002 ( 9);359(9305):493.

33. Vaezi MF. Laryngeal manifestations of gastroesophageal reflux disease. Curr Gastroenterol Rep. 2008 Jun;10(3):271-7.

34. Koufman JA. The otolaryngologic manifestations of gastroesophageal reflux disease (GERD): a clinical investigation of 225 patients using ambulatory 24- hour Ph monitoring and an experimental investigation of the role of acid and pepsin in the development of laryngeal injury. Laryngoscope. 1991 Apr 101(4 Pt 2 Suppl 53):1-78.

35. Johnston N, Dettmar PW, Bishworkarma B, Lively MO, Koufman JA. Activity/stability of human pepsin:Implications for reflux attributed laryngeal disease. Laryngoscope. 2007 June; 117:1036-1039

36. Johnston N, Knight J, Dettmar PW, Lively MO, Koufman J. Pepsin and carbonic anhydrase isoenzyme III as diagnostic markers for laryngopharyngeal reflux disease. Laryngoscope. 2004 Dec;114(12):2129-34.

37. Gill GA, Johnston N, Buda A, Pignatelli M, Pearson J, Dettmar PW, et al. Laryngeal epithelial defenses against laryngopharyngeal reflux: investigations of E-cadherin, carbonic anhydrase isoenzyme III, and pepsin. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2005 Dec;114(12):913-21.

38. Johnston N, Dettmar PW, Lively MO, Koufman J, Postma GN, Belafsky PC, et al. Effect of pepsin on laryngeal stress protein (Sep 70,Sep 53 and Hsp70) response:role in laryngopharyngeal reflux disease. Ann Otol Rhinol laryngol. 2006 jan;115(1):47-58.

39. Johnston N, Wells CW, Blumin JH, Toohill RJ, Merati AL. Receptor-mediated uptake of pepsin by laryngeal epithelial cells. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2007 Dec;116(12):934-8.

40. Samuels TL, Johnston N. Pepsin as clinical agent of inflammation during nonacidic reflux. Otolaryngol Head Neck Surg. 2009 ; 141: 559-563.

41. Johnston N, Yan JC, Hoekzema CR, Samuels TL, Stoner GD, Blumin JH, et al. Pepsin promotes proliferation of laryngeal and pharyngeal epithelial cells. Laryngoscope. 2012 Mar 22. doi: 10.1002/lary.23307

42. Belafsky PC, Rees CJ. Laryngopharyngeal reflux: the value of otolaryngology examination. Curr Gastroenterol Rep. 2008 Jun;10(3):278-82.

43. Belafsky PC, Postma GN, Koufman JA. The validity and reliability of the reflux finding score (RFS). Laryngoscope. 2001 Aug;111(8):1313-7.

44. Belafsky PC, Postma GN, Koufman JA. Validity and reliability of the reflux symptom index (RSI). J Voice. 2002 Jun;16(2):274-7.

45. Johnston N, Wells CW, Samuels TL, Blumin JH. Rationale for targeting pepsin in the treatment of reflux disease. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2010 Aug;119(8):547-58.

46. Johnston N, Wells CW, Samuels TL, Blumin JH. Pepsin in nonacidic refluxate can damage hypopharyngeal epithelial cells. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2009 Sep;118(9):677-85.

47. Arruda Henry MA, Martins RH, Lerco MM, Carvalho LR, Lamonica-Garcia VC. Gastroesophageal reflux disease and vocal disturbances. Arq Gastroenterol. 2011;48(2):98-103.

48. Kravos A, Zupevc A, Cizmarevic B, Hocevar-Boltezar I. The role of allergy in the etiology of Reinke's edema on vocal folds. Wien Klin Wochenschr. 2010;122 Suppl 2:44-8.

49. Kuhn J, Toohill RJ, Ulualp SO, Kulpa J, Hofmann C, Arndorfer R, et al. Pharyngeal acid reflux events in patients with vocal cord nodules. Laryngoscope.

1998;108(8 Pt 1):1146-9.

50. Wight R, Paleri V, Arullendran P. Current theories for the development of nonsmoking and nondrinking laryngeal carcinoma. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg. 2003 Apr;11(2):73-7.

51. Qadeer MA, Colabianchi N, Vaezi MF. Is GERD a risk factor for laryngeal cancer? Laryngoscope. 2005;115:486-91.

52. Harrill WC, Stasney CR, Donovan DT. Laryngopharyngeal reflux: a possible risk factor in laryngeal and hypopharyngeal carcinoma. Otolaryngol Head Neck Surg. 1999 Apr;120(4):598- 601.

53. Coca-Pelaz A, Rodrigo JP, Takes RP, Silver CE, Paccagnella D, Rinaldo A, et al. Relationship between reflux and laryngeal cancer. Head Neck. 2013 Jun 22. doi: 10.1002/hed.23208.

54. Doustmohammadian N, Naderpour M, Khoshbaten M, Doustmohammadian A. Is There association between esophagogastric endoscopic findings and laryngeal cancer?. Am J Otolaryngol. 2011 Nov-Dec;32(6):490-3.

55. Galli J, Cammarota G, Calo L, Agostino S, D'Ugo D, Cianci R, et al. The role of acid and alkaline reflux in laryngeal squamous cell carcinoma. Laryngoscope. 2002; 112:1861-5.

56. Galli J, Frenguelli A, Calò L, Agostino S, Cianci R, Cammarota G. Role of gastroesophageal reflux in precancerous conditions and in squamous cell carcinoma of the larynx: our experience. Acta Otorhinolaryngol Ital. 2001 Dec;21(6):350-5.

57. Cammarota G, Galli J, Cianci R, De Corso E, Pasceri V, Palli D, et al. Association of laryngeal cancer with previous gastric resection. Ann Surg. 2004;240:817-24.

58. Cianci R, Galli J, Agostino S, Bartolozzi F, Gasbarrini A, Almadori G, et al. Gastric surgery as a long-term risk factor for malignant lesions of the larynx. Arch Surg. 2003;138:751-4.

59. Dagli S, Dagli U, Kurtaran H, Alkim C, Sahin B. Laryngopharyngeal reflux in laryngeal cancer. Turk J Gastroenterol. 2004 Jun;15(2):77-81.

60. Copper MP, Smit CF, Stanojcic LD, Devriese PP, Schouwenburg PF, Mathus-Vliegen LM. High incidence of laryngopharyngeal reflux in patients with head

and neck cancer. Laryngoscope. 2000;110:1007-11.

61. Lewin JS, Gillenwater AM, Garrett JD, Bishop-Leone JK, Nguyen DD, Callender DL, et al. Characterization of laryngopharyngeal reflux in patients with premalignant or early carcinomas of the larynx. Cancer. 2003 Feb 15; 97(4):1010-4.

62. Vaezi MF, Schroeder PL, Richter JE. Reproducibility of proximal probe pH parameters in 24- hour ambulantory esophageal pH monitoring. Am Gastrol. 1997;92:825-9.

63. J.A.Koufman. Laryngopharyngeal reflux 2002:a new paradigm of airway disease –Introduction. Troat J. 2002 Sep;81(9):2-6.

64. Kenneth W, Altman MD, Radosevich JA. Unexpected consequences of proton pump inhibitor use. Otolaryngol Head Neck Surg. 2009;564-566.

65. Reimer C, Bytzer P. Menagment of laryngopharyngeal reflux with proton pump inhibitors. Ther.clin. Risk. Mamag. 2008;4(1):225-233.

66. Ahmed TF,Khandwala F,Abelson TI, i sur. Chronic laryngitis associated with gastroesophageal reflux: prospective assessment of differences in practice patterns between gastroenterologists and ENT physicans. Am J Gastroenterol. 2006;101:470-478.

67. Samuels TL, Johnston N. Pepsin as a marker of extraesophageal reflux. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2010 Mar;119(3):203-8.

68. Knight J, Lively MO, Johnston N, Dettmar PW, Koufman JA. Sensitive pepsin immunoassay for detection of laryngopharyngeal reflux. Laryngoscope. 2005 Aug;115:1473-1478.

69. Wang L, Liu X, Liu YL, Zeng FF, Wu T, Yang CL, et al. Correlation of pepsin measured laryngopharyngeal reflux disease with symptoms and signs. Otolaryngol Head Neck Surg. 2010 Dec;143(6):765-71.

70. Yu S, Chen Y, Qiu J, Zong X, Cheng X, Pan F, et al. A study of the pepsinin the sputum for diagnosis and treatment evaluation of laryngopharyngeal reflux. Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi. 2011 Jul;25(13):604-7.

71. Birtic D, Vceva A, Kotromanovic Z, Zubcic Z, Mihalj H, Jovanovic S. Significance of the pepsin from the saliva in the diagnosis and treatment of laryngopharyngeal

reflux disease. Coll Antropol. 2012 Nov;36 Suppl 2:83-6.

72. Johnston N, Wells CW, Samuels TL, Blumin JH. Rationale for targeting pepsin in the treatment of reflux disease. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2010 Aug;119(8):547-58.

73. Johnston N, Wells CW, Samuels TL, Blumin JH. Pepsin in nonacidic refluxate can damage hypopharyngeal epithelial cells. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2009 Sep;118(9):677-85.

74. Jiang A, Liang M, Su Z, Chai L, Lei W, Wang Z, et al. Immunohistochemical detection of pepsin in laryngeal mucosa for diagnosing laryngopharyngeal reflux. Laryngoscope. 2011 Jul;121(7):1426-30.

# 11. ŽIVOTOPIS

**Željko Zubčić, dr.med.,**

Specijalist otorinolaringologije, subspecijalist plastične kirurgije glave i vrata

Klinika za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata, KBC Osijek

J. Huttlera 4

31000 Osijek

Tel. 091-5210454

e-mail: zeljko.zubcic@os.t-com.hr

Mjesto i datum rođenja: Donji Miholjac, 21. prosinca 1975.godine

**OBRAZOVANJE:**

- 1990.-1994. Prirodoslovno-matematička gimnazija u Valpovu
- 1994.-2002. Studij medicine u Osijeku – Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
- 2003.- danas Poslijediplomski znanstveni studij – Biomedicina i zdravstvo MF u Osijeku
- 2006.-2007. Poslijediplomski stručni studij iz otorinolaringologije MF u Zagrebu

**SPECIJALIZACIJA:**

- 2004.- 2009. Otorinolaringologija, Klinika za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata, KBC Osijek
- 2010.- 2013. subspecijalizacija iz plastično rekonstruktivne kirurgije glave i vrata

**ZAPOSLENJA:**

- 2004. godina liječnik na Hitnoj pomoći Doma zdravlja Valpovo
- 2004.-2009. liječnik specijalizant na Odjelu za otorinolarigologiju i cervikofacijalnu kirurgiju, KB Osijek

- 2009.- danas, liječnik specijalist na Klinici za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata, KBC Osijek
- 2010.- danas, asistent na Katedri za otorinolaringologiju i maksilofacijalnu kirurgiju

**NASTAVNA AKTIVNOST:**

- 2010.- danas, asistent na Katedri za otorinolaringologiju i maksilofacijalnu kirurgiju, voditelj vježbi i seminara

**USAVRŠAVANJE:**

- 2005. Slavonski Brod - Međunarodni tečaj rehabilitacije glasa kod laringektomiranih pacijenata
- 2006. Zagreb - tečaj iz transplantata i lokalnih režnjeva
- 2007. Zagreb - Međunarodni mikrokirurški tečaj
- 2009. Glasgow, UK - Međunarodni mikrokirurški tečaj
- 2010. Dallas, SAD - Međunarodni sompozij i anatomski labaratorij iz rinoplastike i estetske kirurgije lica i tijela
- 2010. Chicago, SAD - Međunarodni simpozij iz plastične i estetske kirurgije
- 2010. Rim, Italija - Međunarodni tečaj rehabilitacije glasa kod laringektomiranih pacijenata
- 2011. San Francisco, SAD - Međunarodni simpozij iz plastično rekonstruktivne kirurgije
- 2012. Prag, Češka - Međunarodni tečaj iz transplantacije autolognog masnog tkiva
- 2012. Regensburg, Njemačka - Međunarodni simpozij iz plastično rekonstruktivne kirurgije glave i vrata
- 2013. Chicago, SAD - Međunarodni simpozij iz rinoseptoplastike