Prognostičko značenje imunohistokemijske izraženosti proteina NEDD9 u bolesnika s planocelularnim karcinomima glave i vrata

Ledinsky Opačić, Iva

Doctoral thesis / Disertacija

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:349883

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-17**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Iva Ledinsky Opačić

Prognostičko značenje imunohistokemijske izraženosti proteina NEDD9 u bolesnika s planocelularnim karcinomima glave i vrata

DISERTACIJA

Zagreb, 2021.

VISOKA ŠKOLA ZA SIGURNOST
ZAGREB
S PRAVOM JAVNOSTI

UNIVERSITAS STUDIORUM ZAGRABIENSIS
MDCLXIX

GEODETSKI FAKULTET
PG-UPI

DIU LIBERTAS
međunarodno
sveučilište

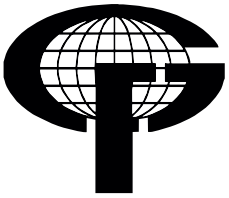
VELEUČILIŠTE U POŽEGI
MCMXCVIII

TVŽ

MUZIČKA AKADEMIJA
ZAGREB

University
of Ljubljana
Veterinary
faculty

SVEUČILIŠTE U ZADRU
1396
UNIVERSITAS STUDIORUM JADERTINA
2002



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Iva Ledinsky Opačić

Prognostičko značenje imunohistokemijske izraženosti proteina NEDD9 u bolesnika s planocelularnim karcinomima glave i vrata

DISERTACIJA

Zagreb, 2021.

Disertacija je izrađena na Odjelu za kirurgiju glave i vrata Zavoda za onkološku kirurgiju i Odjelu za onkološku patologiju i kliničku citologiju Klinike za tumore KBC-a Sestre milosrdnice.

Voditelji rada: prof. dr. sc. Božena Šarčević
dr. sc. Marija Pastorčić Grgić

Hvala mojoj mentorici prof. dr. sc. Boženi Šarčević i sumentorici dr. sc. Mariji Pastorčić Grgić na razumijevanju, trudu i pomoći oko cjelokupne izrade ove disertacije.
Hvala kolegici i prijateljici Sandi Šitić na idejama za oblikovanje ovog rada i odgovorima na sva moja pitanja.
Hvala mojim najboljim prijateljima (Ivi, Mariji, Maši, Matku, Miji, Nini i Vanji) na podršci već dugi niz godina.
Na kraju, najviše hvala mojim roditeljima koji strpljivo prate moje školovanje i napredak, Aletu i najdražoj Maši.

SADRŽAJ

1. Uvod i svrha rada..... 1
1.1. Planocelularni karcinomi glave i vrata..... 1
1.1.1. Orofarinks..... 3
1.1.2. Hipofarinks..... 5
1.1.3. Larinks..... 7
1.2. Epidemiologija..... 9
1.3. Etiologija..... 11
1.3.1. Pušenje i konzumiranje alkohola..... 11
1.3.2. Virusne infekcije..... 12
1.3.3. Hormoni..... 12
1.3.4. Prehrana..... 13
1.3.5. Zanimanje..... 14
1.3.6. Lijekovi..... 15
1.3.7. Sindromi..... 15
1.3.8. Društvenoekonomski status..... 15
1.4. Patohistologija..... 18
1.5. Dijagnostika..... 19
1.6. Određivanje stadija bolesti..... 22
1.6.1. Klasifikacija primarnog tumora – T stadij bolesti..... 23
1.6.2. Klasifikacija regionalnih metastaza – N stadij bolesti..... 28
1.6.3. Klasifikacija udaljenih metastaza – M stadij bolesti..... 31
1.6.4. Ukupan stadij bolesti prema TNM klasifikaciji..... 32
1.7. Planiranje liječenja i prognoza..... 33
1.8. Uloga i funkcija proteina NEDD9 u ljudskom tijelu..... 37
1.8.1. Uloga proteina NEDD9 u migraciji, adheziji i invaziji stanica..... 38
1.8.2. Uloga proteina NEDD9 u apoptozi stanica..... 38

1.8.3. Uloga proteina NEDD9 u staničnom ciklusu..... 39
1.8.4. Uloga proteina NEDD9 u drugim ljudskim patološkim stanjima..... 40
1.8.5 Uloga proteina NEDD9 u liječenju karcinoma..... 40
1.8.6. Uloga proteina NEDD9 u drugim karcinomima..... 41
1.8.6.1. Uloga proteina NEDD9 u gastrointestinalnim karcinomima..... 41
1.8.6.2.Uloga proteina NEDD9 u karcinomu bubrega..... 43
1.8.6.3.Uloga proteina NEDD9 u karcinomu pluća..... 43
1.8.6.4. Uloga proteina NEDD9 u karcinomu dojke..... 44
1.8.6.5. Uloga proteina NEDD9 u malignom melanomu..... 44
1.8.6.6. Uloga proteina NEDD9 u cervikalnom karcinomu..... 45
1.8.6.7. Uloga proteina NEDD9 u karcinomu prostate..... 45
1.8.6.8. Uloga proteina NEDD9 u gliomu, glioblastomu i neuroblastomu..... 45
1.8.6.9. Uloga proteina NEDD9 u leukemiji i limfomu..... 46
2. Hipoteza..... 47
3. Ciljevi rada 48
4. Materijali i metode..... 49
5. Rezultati..... 52
5.1. Analiza obilježja tumora odabranih za imunohistokemijsku obradu..... 52
5.2. Analiza međuodnosa obilježja odabranih tumora..... 54
5.3. Analiza preživljenja..... 58
5.4. Analiza izraženosti proteina NEDD9..... 64
6. Rasprava..... 73
7. Zaključak..... 80
8. Kratki sadržaj na hrvatskom jeziku..... 81
9. Kratki sadržaj na engleskom jeziku……..... 82
10. Popis literature..... 83
11. Kratka biografija.....102

POPIS OZNAKA I KRATICA

AJCC – Američko društvo za rak (engl. *American Joint Committee on Cancer*)

BRCA 1 – tumor supresor gen koji sudjeluje u popravku DNA (engl. *Breast cancer gene 1*)

CAS protein – engl. *cellular apoptosis susceptibility protein*

CEA – karcinoembrijski antigen

CT – kompjutorizirana tomografija

DAB – diaminobenzidin

ERβ – estrogenski receptor beta

EMT – epitelno-mezenhimalna tranzicija

FAK – fokalna adhezijska kinaza

FIGO – klasifikacija ginekoloških karcinoma (engl. *International Federation of Gynecology and Obstetrics*)

G1 i G2 stadiji staničnog ciklusa – podstadiji interfaze staničnog ciklusa (od engl. *gap*)

HIV – virus humane imunodeficijencije (engl. *human immunodeficiency virus*)

HE – Hemalaun Eozin

HNSCC – planocelularni karcinom glave i vrata (engl. *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*)

HPV – humani papiloma virus

HZJZ – Hrvatski zavod za javno zdravstvo

IMH – imunohistokemija

IQR – interkvartilni raspon (engl. *interquartile range***)**

MR – magnetska rezonanca

mRNA – glasnička RNA (engl. *messenger ribonucleic acid*)

M – stadij staničnog ciklusa – mitotski stadij staničnog ciklusa

NEDD9 – engl. *Neural precursor cell Expressed, Developmentally Downregulated 9*

PET CT – pozitronska emisijska tomografija uz izvođenje kompjutorizirane tomografije

PSA – prostata specifični antigen

RNA – ribonukleinska kiselina (engl. *ribonucleic acid*)

TGFβ – transformirajući čimbenik rasta β (engl. *tumour growth factor*)

TNM – klasifikacija proširenosti tumora (engl. *tumor, lymph node metastasis, distant metastasis*)

UICC – Međunarodna unija za borbu protiv raka (engl. *Union for International Cancer Control*)

UZV – ultrazvuk

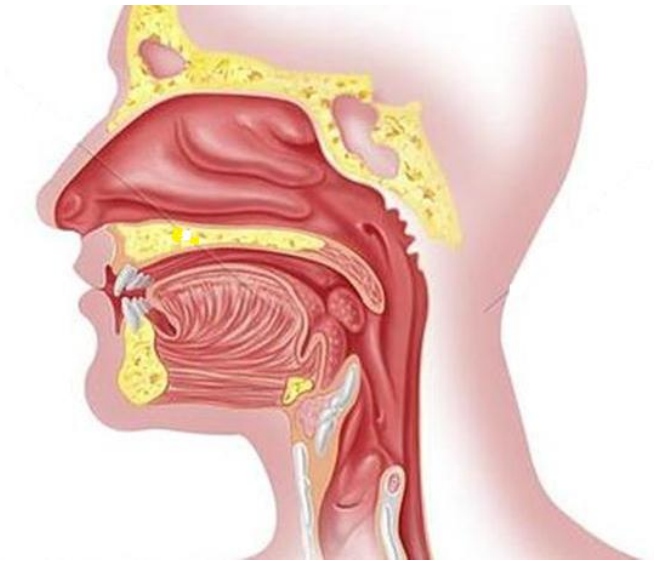
SAD – Sjedinjene Američke Države

1. Uvod i svrha rada

1.1. Planocelularni karcinomi glave i vrata

Gornji respiratorni, a dijelom i probavni sustav, čine nazofarinks, orofarinks, hipofarinks i larinks (Slika 1). Planocelularni karcinomi glave i vrata (HNSCC; engl. *head and neck squamous cell carcinoma*) peti su najčešći karcinomi u svijetu te najčešće vrste tumora sluznice gornjeg respiratornog i probavnog sustava kod ljudi (1). Prema podacima Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo (HZJZ), u Hrvatskoj se na godinu dijagnosticira oko 900 novootkrivenih bolesnika, uz incidenciju od oko 20/100 000 stanovnika (2).

Važan čimbenik je genetska predispozicija (3, 4, 5) koja, udružena s dugotrajnom izloženošću egzogenim kancerogenim tvarima, duhanu i alkoholu (6, 7, 8), uzrokuje stanične genetske promjene. U novije je vrijeme humani papiloma virus (HPV) prepoznat kao karcinogen odgovoran za značajan porast učestalosti planocelularnog karcinoma u području glave i vrata (8, 9, 10). Smatra se najvažnijim čimbenikom porasta učestalosti planocelularnog karcinoma orofarinksa u zapadnim zemljama posljednjih dvadesetak godina (Slika 1) (11).



Slika 1. Shematski prikaz gornjeg respiratornog i probavnog sustava

Planocelularni karcinomi glave i vrata znatno narušavaju kvalitetu života bolesnika (12). Svojim napredovanjem, tumor ugrožava disanje i gutanje, a promijenjen vanjski izgled,

teški bolovi i poteškoće u govoru (13) uzrok su brojnim negativnim psihičkim i društvenoekonomskim posljedicama (14, 15).

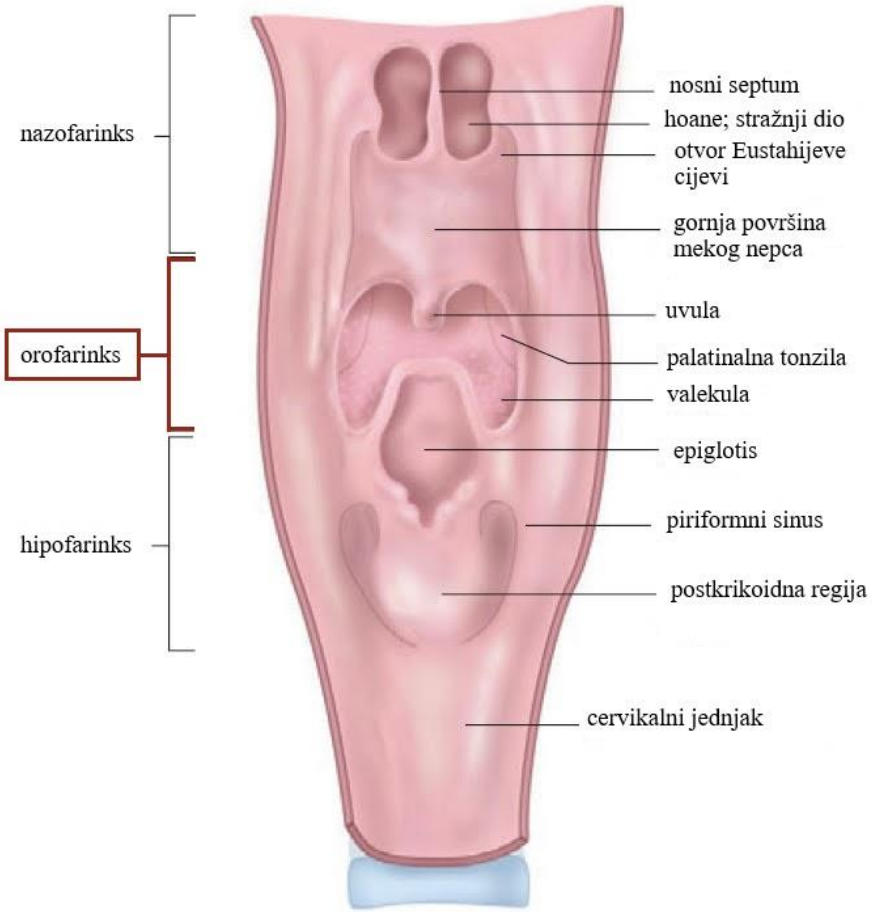
Unaprijeđene kirurške tehnike, nove tehnike radioterapije, kao i uvođenje novih kemoterapijskih lijekova u protokole multimodalnog liječenja, nisu u posljednjih nekoliko desetljeća donijeli zadovoljavajuće povećanje stope preživljenja. U ranim stadijima bolesti (stadij I i II) kirurgijom ili zračenjem moguće je postići izlječenje u 70 do 80 posto bolesnika. U uznapredovalim stadijima bolesti (stadij III i IV) petogodišnje preživljenje iznosi između 30 i 40 posto (16, 17, 18, 19). Imunoterapijski postupci intenzivno su istraživani u novim kliničkim studijama, s ciljem da se optimalno iskoriste terapijske mogućnosti te nove grupe lijekova (20, 21, 22).

Proširenost tumora u trenutku postavljanja dijagnoze (TNM) i histološki stupanj diferenciranosti tumora najčešće su korišteni prognostički čimbenici. Najčešći uzroci smrti bolesnika su lokoregionalni recidivi bolesti, udaljene metastaze te pojava drugog primarnog tumora u gornjem aerodigestivnom sustavu (23).

Nezadovoljavajući napredak u preživljenju bolesnika s karcinomima glave i vrata povećava potrebu za dodatnim istraživanjima genetskih i molekularnih promjena kako bi se opširnije objasnili nastanak i biološko ponašanje ove vrste karcinoma te njegov metastatski potencijal. Razumijevanje molekularne razine karcinogeneze razjasnit će rezistentnost tumora prema provedenom terapijskom postupku. Prepoznavanjem važnih staničnih receptora i glasnika, kao i ključnih signalnih puteva, bit će moguće definirati točke interesa te terapijske ciljeve novih antineoplastičnih lijekova i postupaka.

1.1.1. Orofarinks

Orofarinks ili mezofarinks središnji je dio farinksa i proteže se od prednjeg tonzilarnog luka do superiorne ravnine hioida te ga dijelimo na bazu jezika (stražnja trećina jezika), tonzile i tonzilarne lože, meko nepce i uvulu te faringealni zid (lateralni i stražnji) (Slika 2) (24).



Slika 2. Anatomske regije farinksa, označena regija orofarinksa (prilagođeno iz ref. 24)

Planocelularni karcinom tonzile najčešći je karcinom orofarinksa. Četvrtina svih karcinoma orofarinksa povezana je s HPV infekcijom (16 i 18), najčešće karcinomom tonzila. U Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) 80 posto karcinoma orofarinksa povezano je s HPV-om. Zanimljivo je da karcinomi tonzile koji su HPV pozitivni imaju bolju prognozu od HPV negativnih (24).

Orofarinks, slično kao i hipofarinks, ima bogatu limfnu opskrbu pa su metastaze u limfnim čvorovima vrata često prvi simptom bolesti. Najčešće su zahvaćeni limfni čvorovi

vrata regija II, III i IV. Moguće je pojavljivanje metastaza i u retrofaringealnim limfnim čvorovima. Karcinomi smješteni blizu medijalne linije ili oni koji je prelaze mogu imati kontralateralne metastaze na vratu.

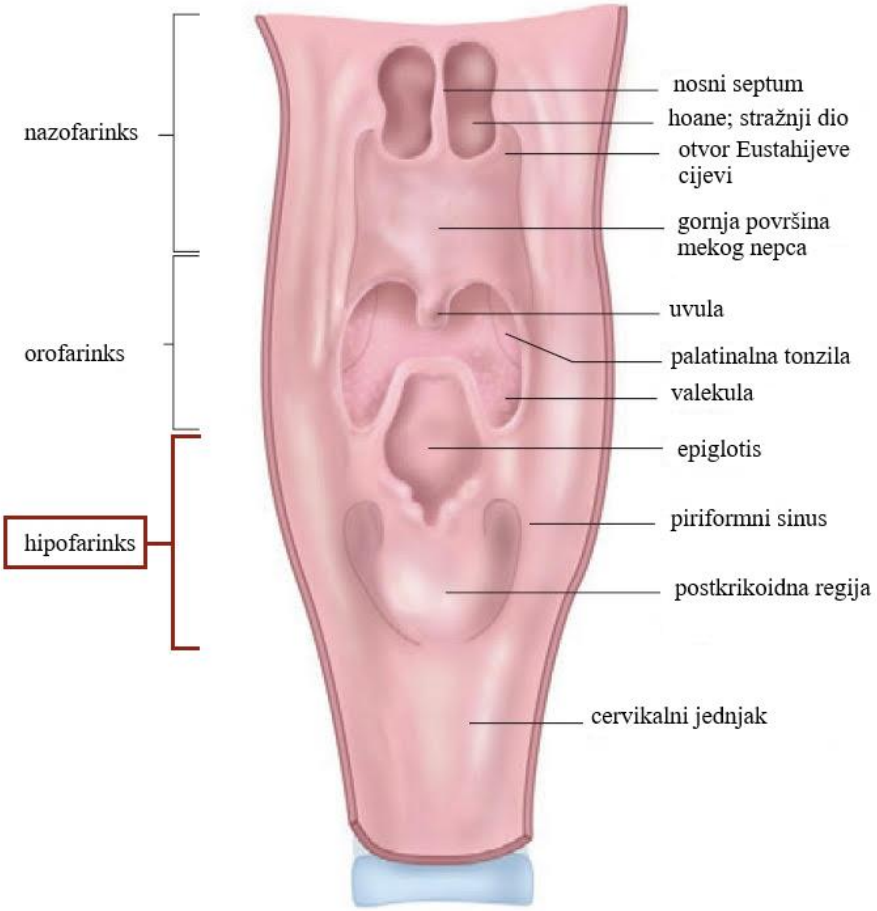
Liječenje ranijih stadija bolesti provodi se kirurški ili radioterapijom, dok onih uznapredovalih kirurški uz konkomitantno kemoradioterapijsko liječenje. Kod inoperabilnih karcinoma ove regije liječenje se provodi radioterapijom i/ili kemoterapijom (25).

Ukupno petogodišnje preživljenje ovisno o stadijima i lokalizaciji bolesti iznosi 55-85 posto u stadiju I, 50-80 posto u stadiju II, 10-60 posto u stadiju III te 10-55 posto u stadiju IV (24).

Karcinomi tonzile i baze jezika imaju bolju prognozu od karcinoma mekog nepca i faringealnih zidova. Rizik povrata bolesti najveći je u prve dvije do četiri godine, kada se javlja 80 do 90 posto recidiva.

1.1.2. Hipofarinks

Hipofarinks se anatomski proteže od vrha epiglotisa do donjeg ruba krikoida. Dijeli se na piriformne sinuse, posteriorni faringealni zid i postkrikoidno područje (24).



Slika 3. Anatomske regije farinksa, označena regija hipofarinksa (prilagođeno iz ref. 24)

Karcinomi hipofarinksa češće se javljaju u muškaraca između 50. i 60. godine koji konzumiraju alkohol i puše. Postkrikoidni karcinom povezan je s nutritivnim deficitom i anemijom (26). Hipofarinks ima obilnu limfnu drenažu u jugulodigastrične, jugulo-omohioidne, gornje i srednje duboke cervikalne i retrofaringealne limfne čvorove (26).

Zbog kasne pojave simptoma i obilne limfne drenaže, dijagnoza se često postavlja u uznapredovaloj fazi bolesti. Više od 50 posto ovih bolesnika pri dolasku liječniku ima

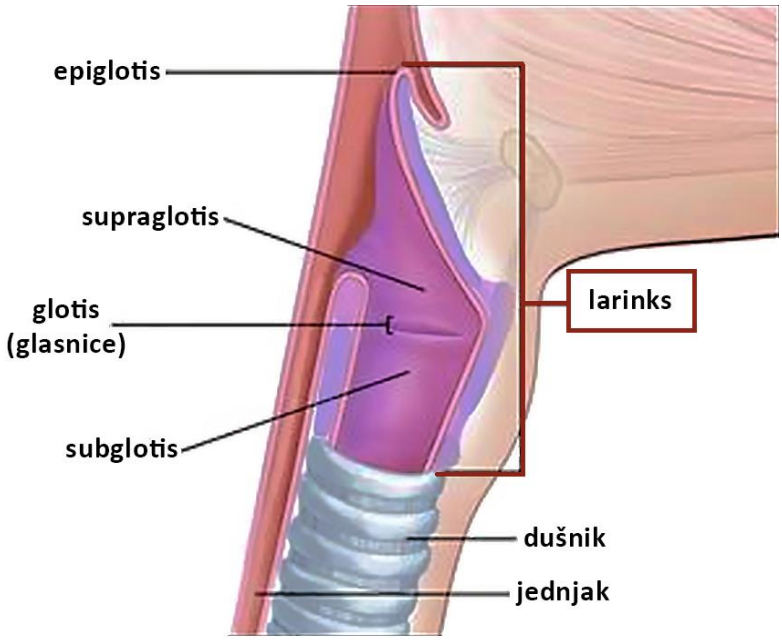
metastaze u limfnim čvorovima vrata pa je palpabilan čvor na vratu često prvi simptom bolesti (26).

Karcinomi hipofarinksa najčešće zahvaćaju piriformne sinuse te imaju sklonost submukoznom širenju. Pojava sinhronih tumora na drugim lokalizacijama, često u jednjaku, nije rijetkost (24). Ustanovljeno je da oko 25 posto bolesnika oboli od novog primarnog tumora (26).

Kirurški zahvat ili radioterapijsko liječenje glavni su načini liječenja ovog karcinoma. U uznapredovalim stadijima bolesti liječenje se, osim navedenih načina, provodi i uz dodatak kemoterapije (26).

1.1.3. Larinks

Gornja anatomska granica larinksa je vrh epiglotisa, donja je donji rub krikoida, a dijeli se na tri podjedinice: supraglotis, glotis i subglotis.



Slika 4. Shematski prikaz anatomskih regija larinksa

Laringealni je karcinom po učestalosti jedanaesti maligni tumor u svijetu, a drugi među karcinomima aerodigestivnog sustava, odmah iza karcinoma pluća (Slika 4) (27). Visokim postotkom od 85 do 95 posto zastupljen je planocelularni karcinom larinksa, a petogodišnje preživljenje, prema podacima za Sjedinjene Američke Države, iznosi oko 60 posto (28). Laringealni karcinomi čine trećinu karcinoma glave i vrata, a često se dijagnosticiraju u bolesnika koji puno puše. Pušenje je etiološki čimbenik u 70-95 posto slučajeva, najizraženije kod karcinoma glotisa. Alkohol djeluje sinergistički s pušenjem. Uloga pušenja marihuane u etiologiji laringealnog karcinoma nije do kraja jasna, primarno zbog činjenice da su oni koji puše marihuanu vrlo često i pušači duhana (29, 30). Prema novijim podacima dobivenih meta-analizom podataka, humani papiloma virus ima značajnu ulogu u etiologiji laringealnog karcinoma (31). Prosječna dob bolesnika koji obolijevaju je 65

godina i češće su to muškarci te pripadnici crne rase (24). Najčešći simptomi su promuklost, osjećaj stranog tijela u grlu, a u uznapredovalim stadijima disfagija, hemoptiza, uhobolja, otežano disanje i smanjenje tjelesne težine (24).

Karcinomi larinksa ovisno o lokalizaciji imaju različitu kliničku sliku i ponašanje te terapijski pristup. Oko 59 posto svih laringealnih karcinoma nastaje u glotisu, 40 posto u supraglotisu te jedan posto u subglotisu (24). Rani stadij karcinoma larinksa (odnosno T1 i T2) se uspješno liječi jednim, lokalno usmjerenim načinom liječenja, radijacijskom terapijom ili kirurškim zahvatom. Kod uznapredovalih stadija bolesti (T3 i T4) liječenje je kirurško uz konkomitantno kemoradioterapijsko liječenje (24).

Ukupno petogodišnje preživljenje ranih stadija bolesti (T1 i T2) je visoko; iznosi oko 90 posto kod karcinoma glotisa i oko 80 posto kod karcinoma supraglotisa. Uznapredovali stadiji bolesti (T3 i T4) izlječivi su u 45-75 posto kod karcinoma glotisa i u 44-73 posto kod karcinoma supraglotisa (24).

Karcinomi supraglotisa

Supraglotis je dio larinksa koji seže od vrha epiglotisa i valekule do ventrikla i donje plohe lažnih glasnica, a dijeli se na aritenoidne hrskavice, ariepiglotske nabore, lažne glasnice i epiglotis (24). S obzirom na kasno pojavljivanje simptoma, u trenutku postavljanja dijagnoze kod 70 posto bolesnika radi se o uznapredovaloj bolesti (25), 55 posto bolesnika ima metastaze u limfnim čvorovima vrata, a njih 16 posto ima zahvaćene kontralateralne limfne čvorove vrata. Najčešće su zahvaćeni cervikalni limfni čvorovi regije II, III i IV. Karcinomi supraglotisa često se šire na bazu jezika, valekule i piriformne sinuse (24).

Karcinomi glotisa

Glotis se proteže od vetrikla do 0,5 centimetara ispod ruba glasnica. Dijelimo ga na glasnice i prednju komisuru. Simptomi, najčešće promuklost, pojavljuju se u ranoj fazi bolesti. Posljedično tome, kod 75 posto bolesnika u trenutku postavljanja dijagnoze bolest je lokalizirana (24).

Karcinomi subglotisa

Subglotis je dio larinksa koji se proteže od pet milimetara ispod slobodnog ruba glasnica do donjeg ruba krikoida. Limfna opskrba ovog područja je oskudna, a drenira se u razinu IV i VI cervikalnih limfnih čvorova (24).

1.2. Epidemiologija

Godišnje se u svijetu dijagnosticira više od 550 000 novih slučajeva planocelularnih karcinoma glave i vrata, s 380 000 smrtnih slučajeva svake godine (32). U Sjedinjenim Američkim Državama oko 63 000 stanovnika godišnje oboli od karcinoma glave i vrata, a njih 13 000 umire od te bolesti (incidencija tri posto) (33). U Europi je 2012. godine bilo oko 250 000 slučajeva novooboljelih (incidencija se procjenjuje na četiri posto) sa 63 500 smrtnih slučajeva (34). Zbog češće konzumacije većih količina alkohola i pušenja, muškarci obolijevaju znatno češće u odnosu na žene, a taj omjer iznosi od 2:1 do 4:1. Stopa incidencije u muškaraca prelazi 20 na 100 000 u nekim regijama Francuske, Hong Konga, Južne Azije, Srednje i Istočne Europe, Španjolske, Italije i Brazila te među Afroamerikancima u Sjedinjenim Državama. Karcinom usne šupljine i jezika češći je na području Južne Azije, karcinom nazofarinksa u Hong Kongu, a karcinom farinksa i/ili larinksa u drugim populacijama Azije (35, 36). Učestalost karcinoma larinksa, za razliku od karcinoma usne šupljine i farinksa, za oko 50 posto je veća kod afroameričkih muškaraca u odnosu na bijelu populaciju (37).

Tablica 1. Podaci Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo za karcinome orofarinksa, hipofarinksa i larinksa od 2011. do 2015. godine (2) Karcinomi orofarinksa označeni su plavo, hipofarinksa narančasto, a larinksa zeleno.

	Muškarci	Žene	Ukupno	Muškarci	Žene	Ukupno	Muškarci	Žene	Ukupno
2011.	**52**	**5**	**57**	**77**	**8**	**85**	**316**	**26**	**342**
2012.	**51**	**7**	**58**	**80**	**10**	**90**	**302**	**29**	**331**
2013.	**50**	**12**	**62**	**95**	**13**	**108**	**304**	**20**	**324**
2014.	**52**	**6**	**58**	**92**	**11**	**103**	**319**	**26**	**345**
2015.	**47**	**9**	**56**	**76**	**12**	**88**	**272**	**31**	**303**
Ukupno	**252**	**39**	**291**	**420**	**54**	**474**	**1513**	**132**	**1645**

Više od desetljeća humani papiloma virus (HPV) u fokusu je istraživača kao značajan etiološki čimbenik u etiopatogenezi planocelularnih karcinoma glave i vrata (38). Novije epidemiološke studije pokazuju da je više od 25 posto HNSCC-a sada uzrokovano HPV-om (39). Zadnjih je godina zamijećen izrazitiji porast orofaringealnog karcinoma u zemljama Zapadne Europe, SAD-a pa i Dalekog istoka, koji se dovodi u vezu s HPV infekcijom (40, 41, 42).

Zanimljivi su epidemiološki podaci koji ukazuju da je preživljenje duže u HNSCC pozitivnim osobama na HPV infekciju u odnosu na HNSCC uzrokovanim drugim etiološkim čimbenicima (43). Na istom je tragu studija Settlea i suradnika koja je pokazala da je u afroameričkih muškaraca oboljelih od laringealnog i orofaringealnog karcinoma i u kojih je prevalencija HPV-om niska, preživljenje značajno niže u odnosu na bijelce u kojih je prevalencija HPV-om značajno viša (44).

U studiji Leona i sur. (45) na više od pet tisuća hospitaliziranih bolesnika značajno je veći udio starije populacije i žena od očekivanog te manji postotak pušača i alkoholičara. Uočeno je smanjenje udjela bolesnika s karcinomom larinksa te progresivan porast udjela HPV-pozitivnih pacijenata s orofaringealnim karcinomom.

U bolesnika s planocelularnim karcinomima glave i vrata značajan je rizik razvoja novih primarnog tumora gornjeg i donjeg aerodigestivnog sustava te jednjaka i javlja se u četiri posto slučajeva godišnje (46, 47).

1.3. Etiologija

1.3.1. Pušenje i konzumiranje alkohola

Pušenje i konzumacija alkohola te HPV infekcija najčešći su čimbenici rizika povezani s karcinomom glave i vrata. Duhanski proizvodi, odnosno pušenje cigareta, cigara i lule, važan su čimbenik rizika u razvoju karcinoma glave i vrata (48). U duhanskom je dimu više tisuća sastojaka, od kojih šezdesetak ima kancerogeni učinak: policiklički aromatski ugljikovodici, nitrozamin, aldehidi, fenoli, razni teški metali i mnogi drugi (49).

Kod teških pušača cigareta rizik razvoja karcinoma glave i vrata je pet do 25 puta veći u odnosu na nepušače (48, 50). U nekim istraživanjima pouzdano je povezana količina popušenih cigareta i dužina pušenja s većim rizikom razvoja karcinoma glave i vrata (51, 52). Korištenje duhana za šmrkanje povezano je s povećanim rizikom od raka farinksa, a duhana za žvakanje s karcinomom usne šupljine (53). Pušenje cigara i lule povezano je s povećanom učestalošću raka glave i vrata, i to u onih koji prethodno nikada nisu pušili cigarete (54). Pasivno pušenje također je prepoznato kao rizičan faktor za razvoj karcinoma glave i vrata, poglavito karcinoma jezika, prije svega kod žena koje nikada nisu aktivno pušile, niti konzumirale alkohol (55).

Povezanost uporabe marihuane s razvojem karcinoma glave i vrata je dvojbena. U studijama koje su istraživale ovaj problem istovremena konzumacija alkohola i duhana u ispitanika onemogućuje konzistentne zaključke, odnosno ne omogućuje da se sa sigurnošću isključi ili potvrdi ta povezanost (56, 57).

Prekomjerna konzumacija alkohola odavno je definirana kao važan pojedinačan rizičan čimbenik razvoja planocelularnih karcinoma glave i vrata (58). Iako je često teško razdvojiti učinke pušenja i alkohola, jasno je da potonji neovisno povećava rizik od raka u gornjem aerodigestivnom sustavu (59, 60, 61). Brojni podaci govore u prilog činjenici da relativni rizik pojave karcinoma glave i vrata raste ovisno o količini konzumiranog alkohola (50, 60, 61). Sinergističko djelovanje alkohola i dima iz cigarete ima multiplicirajući učinak na rizik od razvoja karcinoma glave i vrata (50, 62, 63).

Žvakanje betelovih oraha česta je navika u jugoistočnoj Aziji, a smatra se da je ta navika u Indiji odgovorna za 50 posto svih karcinoma usne šupljine i orofarinksa u muškaraca i za 90 posto karcinoma usne šupljine i orofarinksa u žena (64).

1.3.2. Virusne infekcije

Virusne su infekcije prepoznate kao važan etiološki čimbenik za pojavu karcinoma glave i vrata. Najznačajnija je uloga infekcije humanim papiloma virusom (HPV), posebno sojevima visokog rizika HPV 16 i HPV 18 (65). Prema ranijim istraživanjima, HPV je u SAD-u bio uzročnik od 40 do 80 posto orofaringealnih karcinoma, dok je taj broj bio izrazitije varijabilan u Europi: od 20 pa do 90 posto (66). Taj je broj i u Europi i SAD-u prema nedavnim istraživanjima sada 70 do 80 posto (67). Svjetski statistički podaci govore u prilog značajnom porastu incidencije orofaringealnog karcinoma i u zemljama u razvoju, poglavito u muškaraca mlađe životne dobi, što upućuje na značajnu ulogu HPV-a (68). HPV pozitivni orofaringealni karcinomi predstavljaju sasvim novi entitet koji se u patohistološkom i molekularnom smislu značajno razlikuje od HPV negativnih karcinoma orofarinksa (69). Danas se smatra da su HPV pozitivni orofaringealni karcinomi spolno prenosiva bolest, javljaju se u bolesnika mlađe dobi, bez značajnije ovisnosti o nikotinu i alkoholu. Radi se o bolesnicima koji, iako nerijetko kasno otkriveni, imaju bolju prognozu od HPV negativnih karcinoma (70). Takav ishod objašnjava se pojačanom imunološkom reakcijom organizma na HPV, odnosno boljom osjetljivošću tumora na radiokemoterapiju (71).

Uloga HPV virusa u drugim planocelularnim karcinomima glave i vrata nije do kraja definirana. Meta-analize i internacionalne studije koje su istraživale ovaj problem vrlo su heterogene, no evidentno je da učestalost HPV infekcije prevalira od 22 do 46 posto, ovisno o lokalizaciji tumora, a prevalencija HPV 16 pozitiviteta se kreće od 13 pa do 40 posto (72).

U bolesnika s infekcijom HIV-a povećan je rizik za pojavu malignih bolesti, a učestalost planocelularnih karcinoma glave i vrata je dva do tri puta veća u odnosu na ostalu populaciju, što se objašnjava posljedicom imunosupresije (73, 74).

1.3.3. Hormoni

Spolni hormoni (estrogen i testosteron) i pripadajući im receptori poznati su etiološki čimbenici u nastanku mnogih karcinoma (75, 76) pa tako i karcinoma glave i vrata.

Estrogenski receptori nalaze se u stanicama karcinoma glave i vrata, što zajedno s drugim čimbenicima poput epitelnog čimbenika rasta vjerojatno dovodi do progresije bolesti (77).

Yoo i sur. (78) su dokazali kako su u alkoholičara koji su imali karcinome glave i vrata dokazane znatno više razine estrogena i niže razine testosterona u odnosu na bolesnike s karcinomima glave i vrata koji nisu bili alkoholičari. Nadalje su Singh i sur. (79) ustanovili kako je smanjena razina testosterona korelirala s kraćim preživljanjem u bolesnika s karcinomom glave i vrata.

Nastanak karcinoma glave i vrata povezan je s alkoholom i pušenjem, pri čemu je poznato da alkohol djeluje na razinu estrogena, dok pušenje djeluje na razinu testosterona (80, 81).

Gršić i sur. (82) analizirali su ukupno 174 bolesnika; njih 42 posto imalo je pozitivnu izraženost ERβ. Izraženost ERβ statistički je značajno povezana s lokalizacijom primarnog tumora. Udio pozitivnih ERβ tumora bio je najveći u usnoj šupljini (56 posto) i orofarinksu (51,5 posto), nešto manji u hipofarinksu (39 posto) te najmanji u larinksu (30,2 posto). Nije nađeno da je ekspresija ERβ povezana s patohistološkim stadijem bolesti, odnosno ukupnim stadijem bolesti (TNM). Nije utvrđena povezanost izraženosti ERβ s petogodišnjem preživljenjem bolesnika s tumorima usne šupljine, larinksa i hipofarinksa. Međutim, utvrđena je statistički značajna povezanost pozitivne izraženosti ERβ s boljim petogodišnjim preživljenjem bolesnika s planocelularnim tumorima orofarinksa. Istim je istraživanjem potvrđena hipoteza da je povećana ekspresija estrogen receptora beta (ERβ) u bolesnika s planocelularnim karcinomima glave i vrata pokazatelj povoljne prognoze, međutim samo za planocelularne karcinome orofarinksa.

1.3.4. Prehrana

Odavno je poznata moguća veza između smanjenih razina serumskih vitamina (B, C i E) i sklonosti nastanku određenih karcinoma, a posebno karcinoma glave i vrata. Edefonti i sur. (83) su dokazali kako vitamin E i C mogu imati protektivan učinak na nastanak karcinoma glave i vrata. Maasland i sur. (84) su ustanovili znakovitu povezanost između razine selena s karcinomom larinksa.

Nadalje, Maasland i sur. (85) izvijestili su kako jedenje povrća i voća može imati zaštitni učinak na nastanak karcinoma glave i vrata. Nour i sur. (86) navode kako smanjen unos povrća, žitarica i pića s visokim udjelom kafeina dovode do povećanog rizika za nastanak karcinoma glave i vrata, dok niska razina unosa masnoća i ulja smanjuje rizik od istog.

Sapkota i sur. (87) su dokazali kako je konzumacija mliječnih proizvoda bila u negativnoj korelaciji s laringealnim i ezofagealnim karcinomima. Konzumacija žutog/narančastog povrća bila je inverzno povezana s karcinomom larinksa i farinksa, dok je unos smrznutog povrća bio pozitivno povezan s rizikom nastanka oba karcinoma. Peters i sur. (88) su pokazali pozitivnu povezanost između konzumacije mliječnih proizvoda i nastanka karcinoma glave i vrata, kao i indikativnu povezanost između jedenja životinjskih masnoća i povećanog rizika za nastanak karcinoma glave i vrata. Zhang i sur. (89) navode kako nema povezanosti između konzumacija čaja i rizika od nastanka karcinoma larinksa i farinksa.
Guercio i sur. (90) pokazali su inverznu povezanost između unosa luka i rizika od nastanka karcinoma gornjih aerodigestivnih putova. Vlastarakos i sur. (91) ustanovili su veću potrošnju pržene hrane, mesa, plodova mora i cinka u bolesnika s karcinomom larinksa. Veća potrošnja mliječnih proizvoda ustanovljena je u kontrolnih ispitanika, što ukazuje na zaštitnu ulogu kalcija. Nadalje su isti autori pokazali kako konzumacija limuna, cijeđenog voćnog soka i lubenice smanjuje rizik od nastanka karcinoma larinksa.

Perloy i sur. (92) zaključili su kako konzumiranje ribe nije koreliralo s rizikom za nastanak karcinoma glave i vrata, dok unos mesnih prerađevina nije bio pozitivno povezan s nastankom orofaringealnog i laringealnog karcinoma, ali je bio pozitivno povezan s nastankom oralnog karcinoma.

1.3.5. Zanimanje

Dugotrajna izloženost aerosolima u osoba koje rade s azbestom, bojama i lakovima, pesticidima, agensima u kemijskim čistionicama, niklom i kromom, mineralnim vlaknima, u radnika u kožnoj, metalnoj, građevinskoj i drvnoj industriji te kod farmera, korelira s povećanim rizikom za razvoj planocelularnih karcinoma glave i vrata (93, 94, 95). Carton i sur. (96) su pokazali kako izloženost određenim kemikalijama poput perkloretilena ili trikloretilena može povećati rizik od nastanka karcinoma glave i vrata u žena. Koh i sur. (97) su zaključili da postoji moguća povezanost karcinoma farinksa i zaposlenja u petrokemijskoj industriji. Povišeni, ali beznačajni rizik zabilježen je za nastanak karcinoma glave i vrata kod uličnih prodavača, pekara, zavarivača i plameno-rezača navode Carton i sur. (98).

Reijula i sur. (99) su na velikom broju bolesnika pokazali kako je među muškim konobarima postojala veća učestalost karcinoma glave i vrata, što se objašnjava činjenicom da su izloženi stalnom pasivnom pušenju te da sami više puše i više konzumiraju alkohol.

1.3.6. Lijekovi

Upotreba osvježivača i tekućina za ispiranje usta dovodi se u vezu s većom incidencijom planocelularnih karcinoma glave i vrata, primarno, kako se smatra, zbog sadržaja alkohola u tim tekućinama (100).

Istraživanje Tanga i sur. (101), na temelju sistemskog pregleda literature, pokazuje kako upotreba nesteroidnih protuupalnih lijekova i aspirina ne smanjuje rizik od nastanka karcinoma glave i vrata.

Papagerakis i sur. (102) su izvijestili kako rutinsko uzimanje antacidnih lijekova može imati znakovite dobrobiti u bolesnika s karcinomima glave i vrata.

Hashim i sur. (103) su dokazali dva puta manju učestalost nastanka karcinoma glave i vrata u žena koje su dobivale hormonsku nadomjesnu terapiju.

1.3.7. Sindromi

Češća pojava karcinoma glave i vrata zamijećena je u bolesnika s Fanconijevom anemijom (104, 105). Van Monsjou i sur. (106) smatraju da naslijeđeni sindromi poput Fanconijeve anemije i Bloomovog sindroma dovode do pojačane sklonosti nastanka karcinoma glave i vrata.

1.3.8. Društvenoekonomski status

Bryere i sur. (107) napravili su kontrolirano istraživanje na 2415 bolesnika s karcinomom glave i vrata i na 3555 kontrolnih ispitanika u Francuskoj. Povišeni rizik za nastanak karcinoma glave i vrata ustanovljen je u rastavljenih osoba u usporedbi s oženjenim osobama, zatim u osoba koje su imale samo osnovnu školu u usporedbi s onima koji su bili educiraniji (posebice radnici u odnosu na menadžere) i kod osoba koje su živjele u siromašnim u odnosu na one koji su živjeli u bogatim područjima. Isti autori (107) zaključuju kako je nepobitna uloga društvenoekonomskog statusa osobe u nastanku karcinoma glave i vrata, iako život u depriviranim područjima također povećava sklonost nastanku istog.

Konski i sur. (108) su ustanovili kako su bolesnici koji su pohađali fakultet imali više i znakovito bolje ukupno preživljenje i lokoregionalnu kontrolu bolesti. Multivarijantna analiza pokazala je kako je stupanj edukacije bio znakovit u predviđanju ukupnog preživljenja i lokoregionalne kontrole.

Smatra se kako socijalne nejednakosti postoje s obzirom na hipofaringealne i laringealne karcinome u mnogim zemljama, a ponuđeno objašnjenje je razlika u konzumiranju cigareta i alkohola. Stoga su Menvielle i sur. (109) analizirali podatke o prije navedenim bolesnicima te su dokazali da su laringealni i hipofaringealni karcinomi bili znakovito povezani sa stupnjem edukacije odnosno poslom koji su oboljeli obavljali. Isti autori (109) zaključuju kako se socijalne nejednakosti vezane uz ove karcinome ne mogu samo objasniti konzumiranjem alkohola i cigareta, već nastaju uslijed ekspozicije na poslu.

Ista je saznanja pokazalo istraživanje Pinara i sur. (110), naime posao koji su oboljeli obavljali (visoko rizični poslovi, odnosno rad u industriji drva, građevini, mineri, kemijska i metalna industrija te poljoprivreda) i pušenje su bili znakoviti neovisni čimbenici za nastanak karcinoma glave i vrata među radnicima.

Također su Johnson i sur. (111), na temelju podataka američkog Nacionalnog istraživanja zdravlja i logističke regresijske analize, ustanovili kako su karcinomi gornjeg aerodigestivnog trakta, kao i cervikalni karcinomi, korelirali s niskim društvenoekonomskim statusom.

Chen i sur. (112) su ustanovili smanjenje stope mortaliteta u bolesnika s karcinomom farinksa, među bijelcima i crncima, ali je smanjenje bilo najveće u onih koji su imali najmanje 12 godina edukacije. Isti autori (112) zaključuju kako razlike u trendu mortaliteta mogu odražavati prevalenciju pušenja i seksualnih ponašanja u populacijama koje su različito školovane. Takav su nalaz potvrdili i Santi i sur. (113).

Olsen i sur. (114) su na velikom uzorku od 9683 slučajeva karcinoma glave i vrata ustanovili povezanost s niskim prihodima, kao i u slučaju kad su muškarci živjeli sami. Za karcinom glotisa postojala je znakovita povezanost s duljinom trajanja školovanja, dok su karcinomi hipofarinksa imali veću učestalost pojavljivanja u osoba koje žive u ruralnim sredinama ili provincijskim gradovima. Isti su autori (114) ustanovili društvenoekonomske razlike u stadiju postavljanja dijagnoze za sve podtipove karcinoma glave i vrata, što su potvrdili i Hagedoorn i sur. (115), Baishya i sur. (116) te Shin i sur. (117) za karcinome farinksa.

Santi i sur. (118) su pak ustanovili kako je radna izloženost, posebice kancerogenim tvarima, uspjela objasniti velik broj slučajeva povezanosti između stupnja edukacije i rizika od nastanka laringealnog karcinoma.

1.4. Patohistologija

Gornji respiratorni i probavni sustav građen je od mnogoslojnog pločastog epitela. Iznimka su dijelovi larinksa koji su prekriveni višerednim cilindričnim epitelom. Planocelularni karcinom nastaje iz mnogoslojnog pločastog epitela ili iz cilindričnog epitela nakon pločaste metaplazije (119).

Dvije su osnovne karakteristike planocelularnog karcinoma:

1. Pločasta diferencijacija tumorskih stanica – keratinizacija (odlaganje keratina i formiranje bisernih perli ili gnijezda izmiješanih s tumorskim nakupinama).
2. Invazivni rast – proboj bazalne membrane, infiltracija podležećeg tkiva, infiltracija krvnih žila i živaca, perineuralna i perivaskularna infiltracija; dezmoplastični stromalni odgovor, snažna upala s limfocitima i plazma stanicama (120).

Histološki gradus planocelularnog karcinoma dijelimo na:

1. **Gradus I** (dobro diferencirani tumori): sličan normalnom pločastom epitelu; dobro definirani međustanični mostovi, keratinske biserne perle, blag do umjeren pleomorfizam jezgara, niska stopa mitoza.

2. **Gradus II** (srednje diferencirani tumor): manje izražena keratinizacija, jasan pleomorfizam jezgara i mitotska aktivnost, abnormalne mitoze.

3. **Gradus III** (slabo diferencirani tumor): minimalna keratinizacija, dominacija nezrelih stanica, brojne tipične i atipične mitoze, moguće zone nekroze tkiva.

Planocelularne karcinome glave i vrata smještene na bazi jezika, tonzili i hipofarinksu karakterizira slaba diferencijacija. S kliničkog gledišta, histološki gradus ima prediktivnu vrijednost u ishodu liječenja (119, 120).

1.5. Dijagnostika

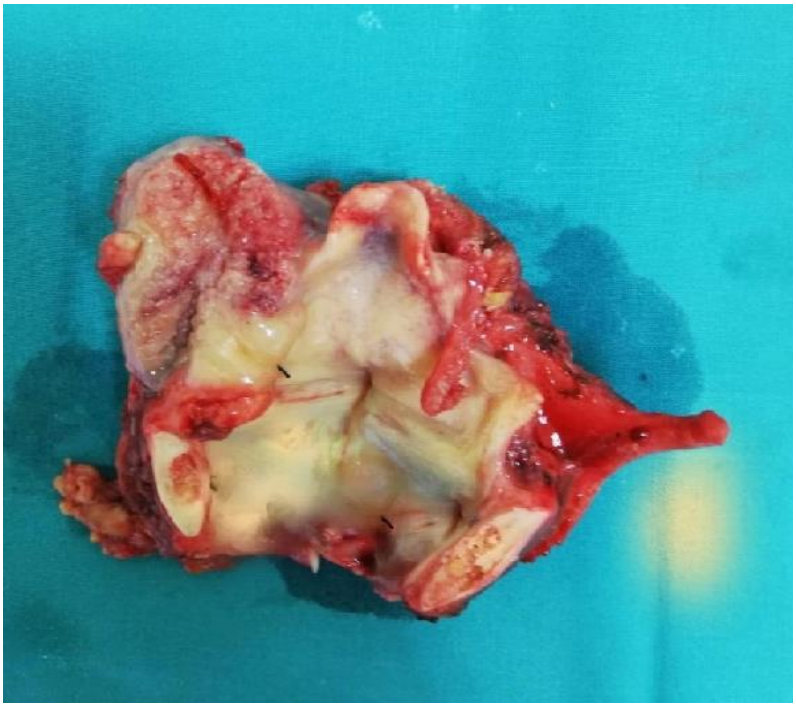
U dijagnostičkoj obradi karcinoma glave i vrata primarno je učiniti temeljiti klinički pregled, često nadopunjen endoskopskom pretragom fiberendoskopom.

Prije početka liječenja nužno je uzeti bioptat primarnog tumora te učiniti patohistološku analizu tkiva. Zatim slijedi procjena veličine tumora te njegove proširenosti i odnosa prema okolnim strukturama.

Slika 5. Fotografija karcinoma orofarinksa prije operativnog zahvata; intraoralni pristup (iz arhive Odjela kirurgije glave i vrata; Klinika za tumore)

Od iznimnog značaja u dijagnostici je upotreba kompjuterizirane tomografije (CT), posebice u slučaju tumora larinksa te određivanja odnosa tumora prema kostima glave i vrata – dakle, za tvrda tkiva u području glave i vrata. CT je koristan u bolesnika s dubljom lokalnom tumorskom invazijom ili kod infiltracije okolnih struktura, što je teško otkriti samo fizikalnim pregledom (preepiglotični prostor, laringealna hrskavica, paraglotični i subglotični prostor te regionalni limfni čvorovi). Koštana i hrskavična invazija lako se prepoznaju (121).

Nasuprot tome, magnetska rezonanca (MR) je metoda izbora za detaljnije sagledavanje mekih tkiva, usne šupljine i orofarinksa (122, 123).

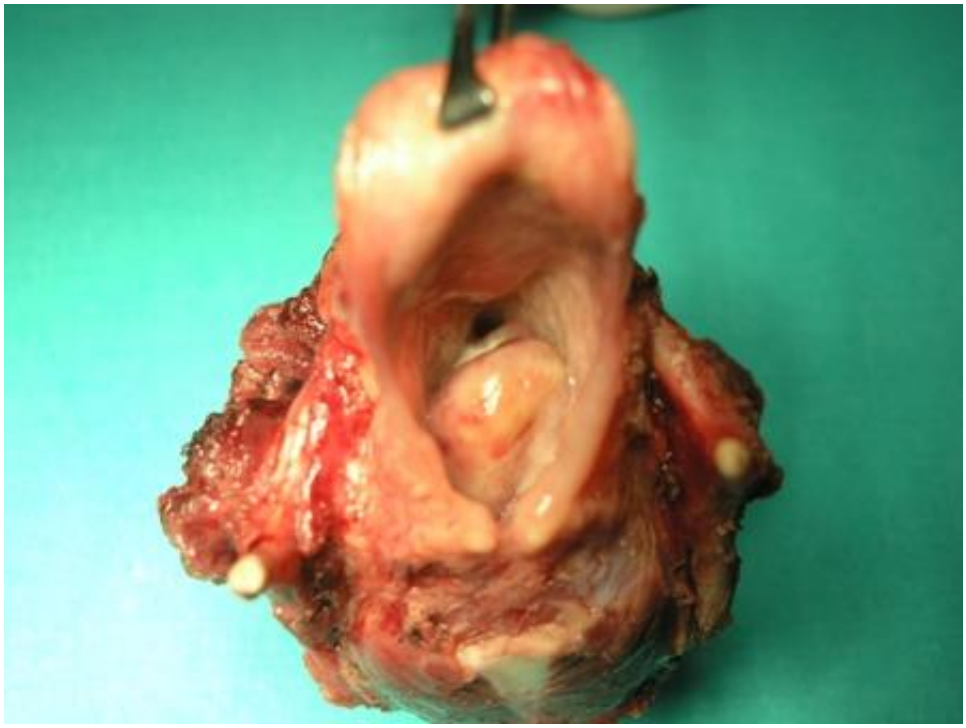


Slika 6. Fotografija karcinoma hipofarinksa nakon operativnog zahvata (iz arhive Odjela kirurgije glave i vrata; Klinika za tumore)

Status limfnih čvorova vrata određuje se izvođenjem ultrazvuka vrata, pri čemu suspektne limfne čvorove treba punktirati i citološki analizirati.

U većini studija osjetljivost MR-a u dijagnosticiranju nodalnih metastaza kreće se od 57 do 67 te je CT metoda izbora (124). CT je superiorniji i ultrazvuku, no uporaba uobičajenih kriterija veličine i prisutnosti centralne nekroze predstavlja ograničenja kojim se teže otkrivaju čvorovi manjih veličina bez nekroze ili ekstrakapsularno širenje (125).

U slučaju postojanja metastaza na vratu, bez znakova evidentnog primarnog tumora, ili pak sumnje na postojanje udaljenih metastaza ili drugog primarnog tumora, indicirano je izvođenje pozitronske emisijske tomografije s CT-om. Za određivanje eventualne diseminacije bolesti, uz PET-CT potrebno je učiniti i radiološke snimke torakalnih organa i ultrazvuk abdomena.



Slika 7. Fotografija karcinoma larinksa nakon totalne laringektomije (iz arhive Odjela kirurgije glave i vrata; Klinika za tumore)

PET i PET CT u značajnoj su mjeri zamijenili druge slikovne metode u otkrivanju udaljenih metastaza i sinkronih primarnih tumora, iako lažno pozitivni nalazi ponekad predstavljaju ozbiljan problem (126, 127).

1.6. Određivanje stadija bolesti

Međunarodna unija za borbu protiv raka (engl. *Union for International Cancer Control – UICC*) i Američko društvo za rak (engl. *American Joint Committee on Cancer – AJCC*) uspostavili su TNM klasifikaciju. To je općepriznati standardizirani obrazac za podjelu zloćudnih tumora, pa tako i tumora glave i vrata te određivanje stadija bolesti. Vremenom se klasifikacija nadograđivala i mijenjala. Osmo izdanje TNM klasifikacije objavljeno je u studenom 2016. godine, pri čemu su ove godine dodane još neke izmjene (Tablica 2 – 10) (128).

Dodaci VIII. izdanju TNM klasifikacije:

1. Sve lokalizacije tumora imaju klasifikacije patoloških limfnih čvorova na vratu.
2. Uvedena je nova klasifikacija orofaringealnih karcinoma s obzirom na prisutnost HPV infekcije.
3. Modificirana je klasifikacija nazofaringealnih karcinoma i onih štitnjače.
4. Uvedena je nova klasifikacija za karcinome kože u području glave i vrata.
5. Uvedena je nova klasifikacija za cervikalne limfne čvorove bez poznatog primarnog karcinoma.

Važno je naglasiti da je podjela bolesnika u ovom istraživanju učinjena prema 7. klasifikaciji objavljenoj 2006. godine (129), prije nego što je došlo do zadnjih izmjena.

T stadij tumora označava veličinu primarnog tumora i njegov odnos prema okolnim strukturama, a razlikuje se prema lokalizaciji: orofarinks, hipofarinks i larinks. Klasifikacija uključuje i prisutnost metastatski pozitivnih limfnih čvorova vrata (N), kao i udaljenih metastaza (M).

Ciljevi TNM klasifikacije su sljedeći:

- pomaže u planiranju liječenja i omogućava određivanje prognoze
- pomaže u vrednovanju rezultata liječenja
- olakšava izmjenu informacija među različitim centrima liječenja
- doprinosi nastavku istraživanja malignih bolesti
- podupire aktivnosti vezane uz kontrolu karcinoma, uključujući i one putem registara za karcinom.

1.6.1. Klasifikacija primarnog tumora – T stadij bolesti

Orofarinks

Tablica 2. Veličina primarnog tumora orofarinksa prema TNM klasifikaciji

Tx	veličina primarnog tumora ne može se procijeniti
T0	bez znakova primarnog tumora
T1	tumor ≤ 2 cm u najvećem promjeru
T2	tumor > 2 cm i ≤ 4 cm u najvećem promjeru
T3	tumor > 4 cm u najvećem promjeru ili se širi na lingvalnu površinu epiglotitisa
T4a	lokalno uznapredovala bolest tumor infiltrira larinks, vanjske mišiće jezika, medijalni pterigoid, tvrdo nepce ili mandibulu
T4b	izrazito lokalno uznapredovala bolest tumor infiltrira lateralni pterigoidni mišić, pterigoidne nastavke, lateralni nazofarinks, bazu lubanje ili zahvaća karotidnu arteriju

Hipofarinks

Tablica 3. Veličina primarnog tumora hipofarinksa prema TNM klasifikaciji

Tx	veličina primarnog tumora ne može se procijeniti
T0	bez znakova primarnog tumora
T1	tumor ograničen na jedan segment hipofarinksa, 2 ≤ cm u najvećem promjeru
T2	tumor zahvaća više od jednog segmenta hipofarinksa ili strukturu u neposrednoj blizini, ili je veličine od dva do četiri centimetara u najvećem promjeru, bez fiksacije glasnice
T3	tumor > 4 cm, ili tumor koji fiksira glasnicu, ili tumor koji se širi u jednjak
T4a	lokalno uznapredovala bolest tumor infiltrira okolne strukture: tiroidnu/krikoidnu hrskavicu, hioidnu kost, štitnu žlijezdu ili meka tkiva središnjeg dijela vrata
T4b	izrazito lokalno uznapredovala bolest tumor zahvaća prevertebralni prostor, karotidnu arteriju ili se širi u medijastinum

Larinks

Tablica 4. Veličina primarnog tumora larinksa prema TNM klasifikaciji

Tx	veličina primarnog tumora ne može se procijeniti
T0	bez znakova primarnog tumora
T1	tumor ograničen na jedan segment supraglotisa uz normalnu mobilnost glasnice
T2	tumor zahvaća sluznicu više od jednog segmenta supraglotisa ili glotisa, ili regije u neposrednoj blizini (npr. sluznice baze jezika, valekule, medijalnog zida piriformnog sinusa), bez fiksacije hemilarinksa
T3	tumor ograničen na larinks, s fiksacijom hemilarinksa i/ili infiltracijom postkrikoidne regije, preepiglotskog ili paraglotskog prostora, i/ili infiltracijom unutarnjeg korteksa
T4a	lokalno uznapredovala bolest tumor prolazi kroz tiroidnu hrskavicu i/ili infiltrira okolne strukture (traheju, meka tkiva vrata uključujući duboke mišiće jezika, infrahioidnu muskulaturu, štitnu žlijezdu ili jednjak)
T4b	izrazito lokalno uznapredovala bolest tumor zahvaća prevertebralni prostor, karotidnu arteriju ili se širi medijastinalno

Tablica 5. Veličina primarnog tumora supraglotisa prema TNM klasifikaciji

T1	tumor ograničen na jedan segment supraglotisa uz normalnu mobilnost glasnice
T2	tumor zahvaća sluznicu više od jednog segmenta supraglotisa ili glotisa, ili regije u neposrednoj blizini (npr. sluznice baze jezika, valekule, medijalnog zida piriformnog sinusa), bez fiksacije hemilarinksa
T3	tumor ograničen na larinks, s fiksacijom hemilarinksa i/ili infiltracijom postkrikoidne regije, preepiglotskog ili paraglotskog prostora, i/ili infiltracijom unutarnjeg korteksa
T4a	lokalno uznapredovala bolest tumor prolazi kroz tiroidnu hrskavicu i/ili infiltrira okolne strukture (traheju, meka tkiva vrata uključujući duboke mišiće jezika, infrahioidnu muskulaturu, štitnu žlijezdu ili jednjak)
T4b	izrazito lokalno uznapredovala bolest tumor zahvaća prevertebralni prostor, karotidnu arteriju ili se širi medijastinalno

Tablica 6. Veličina primarnog tumora glotisa prema TNM klasifikaciji

T1	tumor ograničen na glasnice (može zahvaćati prednju ili stražnju komisuru) uz normalnu mobilnost glasnice
T1a	tumor zahvaća jednu glasnicu
T1b	tumor zahvaća obje glasnice
T2	tumor se širi na supraglotis i/ili subglotis i/ili je poremećena mobilnost glasnice
T3	tumor ograničen na larinks s fiksacijom glasnice i/ili infiltracijom paraglotskog prostora i/ili prisutnom infiltracijom unutarnjeg korteksa tiroidne hrskavice
T4a	lokalno uznapredovala bolest tumor prolazi kroz tiroidnu hrskavicu i/ili infiltrira okolne strukture (traheju, meka tkiva vrata uključujući duboke mišiće jezika, infrahioidnu muskulaturu, štitnu žlijezdu ili jednjak)
T4b	izrazito lokalno uznapredovala bolest tumor zahvaća prevertebralni prostor, karotidnu arteriju ili se širi medijastinalno

Tablica 7. Veličina primarnog tumora subglotisa prema TNM klasifikaciji

T1	tumor ograničen na subglotis
T2	tumor se širi na jednu ili obje glasnice uz normalnu ili poremećenu mobilnost glasnice
T3	tumor ograničen na larinks s fiksacijom glasnice tumor prolazi kroz tiroidnu hrskavicu i/ili infiltrira okolne strukture (traheju, meka tkiva vrata uključujući duboke mišiće jezika, infrahioidnu muskulaturu, štitnu žlijezdu ili jednjak)
T4a	lokalno uznapredovala bolest tumor prolazi kroz tiroidnu hrskavicu i/ili infiltrira okolne strukture (traheju, meka tkiva vrata uključujući duboke mišiće jezika, infrahioidnu muskulaturu, štitnu žlijezdu ili jednjak)
T4b	izrazito lokalno uznapredovala bolest tumor zahvaća prevertebralni prostor, karotidnu arteriju ili se širi medijastinalno

1.6.2. Klasifikacija regionalnih metastaza – N stadij bolesti

Prisutnost metastaza u limfnim čvorovima vrata jedan je od najvažnijih prognostičkih čimbenika u bolesnika s planocelularnim karcinomom glave i vrata. Pri postavljanju dijagnoze gotovo polovica bolesnika ima regionalne metastaze, što im u istom omjeru umanjuje vjerojatnost preživljenja. Stoga je precizno određivanje statusa limfnih čvorova vrata izuzetno važno za uspjeh onkološkog liječenja.

Limfni čvorovi vrata dijele se na obje strane vrata u pet glavnih regija, dok je šesta u središnjem dijelu vrata, a sedma predstavlja limfne čvorove gornjeg medijastinuma.

Tablica 8. Podjela limfnih čvorova vrata po skupinama

Skupina I IA submentalni limfni čvorovi – između prednjeg trbuha digastričnog mišića i hioidne kosti IB submandibularni limfni čvorovi – u trokutu omeđenim prednjim i stražnjim trbuhom digastričnog mišića i donjim rubom mandibule
Skupina II gornji jugularni čvorovi – oko unutarnje jugularne vene od baze lubanje do visine bifurkacije karotide, te hioidne kosti, ispred lateralnog ruba sternokleidomastoidnog mišića, a iza lateralnog ruba sternohioidnog mišića, akcesorni živac dijeli regiju na medijalni (IIA), te lateralni (IIB) dio
Skupina III srednji jugularni čvorovi – oko unutarnje jugularne vene od visine hioidne kosti do omohioidnog mišića do donjeg ruba krikoida, straga do lateralnog ruba sternokleidomastoidnog mišića, a naprijed do lateralnog ruba sternohioidnog mišića
Skupina IV donji jugularni čvorovi – oko unutarnje jugularne vene od donjeg ruba krikoidne hrskavice do klavikule, straga do lateralnog ruba sternokleidomastoidnog mišića, a naprijed do lateralnog ruba sternohioidnog mišića
Skupina V stražnji trokut vrata – u trokutu koji omeđuju stražnji rub sternokleidomastoidnog mišića, prednji rub trapezoidnog mišića i klavikula, akcesorni živac dijeli regiju na gornji (VA) te donji dio (VB)
Skupina VI središnji dio vrata – prelaringealni, pretrahealni, paratrahealni te čvorovi traheoezofagealnog prijelaza, hioid je cefalična granica, sternum kaudalna, a karotide lateralne granice
Skupina VII gornji medijastinalni čvorovi – čvorovi prednjeg gornjeg medijastinuma

Rizik pojave metastaza tumora glave i vrata u regionalne vratne limfne čvorove ovisi o tri čimbenika: stadiju primarnog tumora (T), lokalizaciji i patohistološkim karakteristikama.

U stadiju T1 rizik za pojavu metastaza je manji od 15 posto, za T2 iznosi od 15 do 30 posto, a T3 od 30 do 50 posto. Kod T4 tumora rizik je veći od 75 posto.

Gledano prema svim lokalizacijama karcinoma glave i vrata, rizik raste od usne šupljine gdje je najniži, preko orofarinksa pa do hipofarinksa gdje su metastaze u trenutku dijagnoze najčešće. Za pojavu metastaza larinksa i farinksa rizik raste od medijalnom prema lateralnom. Tako tumori glasnica vrlo rijetko metastaziraju, nasuprot tumoru lateralnog zida farinksa i hipofarinksa kod kojih se metastaze nalaze u dvije trećine bolesnika u trenutku kad je bolest otkrivena.

Gledano patomorfološki, endofitični tumori imaju veći metastatski potencijal od egzofitičnih tumora. Slabija diferenciranost tumora povećava vjerojatnost pojave regionalnih metastaza.

Planocelularni karcinomi glave i vrata metastaziraju u limfne čvorove vrata po predvidljivom obrascu: tumori larinksa i farinksa metastaziraju u skupine II, III i IV na istoj strani gdje je i primarni tumor. Tumori koji prelaze medijalnu liniju nerijetko metastaziraju na obje lateralne strane vrata. Iako ne prelaze medijalnu liniju, karcinomi medijalnog zida hipofarinksa često metastaziraju i u limfne čvorove suprotne strane vrata.

Tablica 9. Stadiji limfnih čvorova vrata (N) prema TNM klasifikaciji

Nx	prisutnost klinički pozitivnih limfnih čvorova ne može se odrediti
N0	nema klinički pozitivnih limfnih čvorova
N1	metastaza u jednom limfnom čvoru na istoj strani vrata ≤ 3 cm
N2	metastaza u jednom limfnom čvoru na istoj strani vrata > 3 cm, a ≤ 6 cm u najvećem promjeru, više metastaza u čvorovima iste strane vrata, ≤ 6 cm u najvećem promjeru, ili metastaze u obostranim ili čvorovima suprotne strane, ≤ 6 cm u najvećem promjeru
N2a	metastaza u jednom limfnom čvoru iste strane vrata > 3 cm, a ≤ 6 cm u najvećem promjeru
N2b	više metastaza u limfnim čvorovima na istoj strani, ≤ 6 cm u najvećem promjeru
N2c	metastaze obostrano ili u limfnim čvorovima suprotne strane ≤ 6 cm u najvećem promjeru
N3	metastaza veća od 6 cm u najvećem promjeru

1.6.3. Klasifikacija udaljenih metastaza – M stadij bolesti

Prema TNM klasifikaciji, odsutnost udaljenih metastaza označava se s M0, a dokaz njihova postojanja s M1.

Uvriježeno je mišljenje da planocelularni karcinomi glave i vrata imaju relativno nisku incidenciju udaljenih metastaza, no prema podacima iz literature incidencija je između jedan i 50 posto. Udaljene metastaze značajno utječu na planiranje terapijskog pristupa, a jasno je da se negativno odražavaju na preživljenje bolesnika.

Pojavnost udaljenih metastaza ovisi o anatomskoj lokaciji tumora, stadiju tumora (T) i uznapredovalosti metastaza u regionalnim limfnim čvorovima (N).

Veliki broj pozitivnih čvorova vrata koji infiltriraju unutarnju jugularnu venu te zauzimaju supraklavikularnu regiju vrata povećavaju rizik rasapa tumora, kao i veliki tumori s pozitivnim resekcijskim rubovima.

Udaljene metastaze najčešće su u plućima (66 posto), kostima (22 posto), jetri (deset posto), potom koži i limfnim čvorovima vrata medijastinuma.

1.6.4. Ukupan stadij bolesti prema TNM klasifikaciji

Po određenju TNM statusa raznim dijagnostičkim postupcima (histološka verifikacija, slikovne metode) određuje se i klinički stadij bolesti (Tablica 10).

Tablica 10. Ukupan stadij bolesti prema TNM klasifikaciji

Stadij	T	N	M
0.	Tis	N0	M0
I.	T1	N0	M0
II.	T2	N0	M0
III.	T3	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
IVA	T4a	N0	M0
	T4a	N1	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N2	M0
	T4a	N2	M0
IVB	T4b	N1-N3	M0
	T1-T4	N3	M0
IVC	T1-T4	N1-N3	M1

1.7. Planiranje liječenja i prognoza

Nakon provedenog dijagnostičkog postupka, patohistološka dijagnoza, uznapredovalost i lokalizacija tumora te opće stanje bolesnika faktori su koji će odlučiti o planu liječenja. Liječenju se mora pristupiti multidisciplinarno, uključivanjem kirurga, onkologa, radioterapeuta, stomatologa, logopeda, dijetetičara, psihoterapeuta i rehabilitacijskih terapeuta. Taj konzilij stručnjaka trebao bi sudjelovati pri donošenju terapijskih odluka tijekom cijelog liječenja (130). Složeni slučajevi karcinoma glave i vrata trebaju biti liječeni u velikim centrima gdje je za očekivati viši stupanj interdisciplinarne stručnosti (131), što potvrđuju i rezultati istraživanja prema kojima je bolja petogodišnja stopa preživljenja potvrđena kod liječenja u tercijarnim centrima, iako kod pacijenata prethodno nije bilo razlika u prognostičkim čimbenicima (131, 132).

Kurativna terapija usmjerena je na izlječenje bolesnika te najčešće kombinira kirurški postupak uz zračenje i kemoterapiju, iako je u ranim stadijima nekih oblika bolesti samo kirurgija ili radioterapija dostatan kurativni postupak.

Palijativna je terapija namijenjena onim bolesnicima u kojih izlječenje nije moguće. Nerijetko je potreba za takvim oblikom liječenja evidentna već pri postavljanju dijagnoze, a nemali je broj bolesnika u kojih se usprkos radikalnom liječenju bolest vratila pa je u nastavku potrebna palijacija: krucijalna je redukcija boli i održanje kvalitete života na što je višoj razini moguće. Da bi se to postiglo, simptomatsko liječenje nerijetko prate i kirurški postupci te radioterapija.

Najvažniji prognostički faktori, o kojima djelomično ovisi i način liječenja, su lokalizacija tumora, TNM status, resekcijski rubovi tumora, broj pozitivnih limfnih čvorova u disektatu te ekstrakapsularno, perineuralno i perivaskularno širenje tumora.

U ranom, I. i II. stadiju bolesti otkriva se od 30 do 40 posto bolesnika s karcinomima glave i vrata, a očekivano je da će njih od 70 do 90 posto biti izliječeno bilo kirurškom resekcijom, bilo radioterapijom. Radioterapija i kirurgija rezultiraju sličnim stopama uspješnosti liječenja i preživljenja; odabir terapije obično se temelji na kirurškoj dostupnosti tumora i funkcionalnom ishodu liječenja, odnosno postoperativnom morbiditetu.

Većina bolesnika, njih 60 do 70 posto, u trenutku postavljanja dijagnoze nalazi se u uznapredovalom stadiju bolesti (stadij III i IV). Zbog visokog rizika pojave lokalnog recidiva i udaljenih metastaza, nužan je kombinirani pristup liječenja kako bi se dugoročno

optimizirala pretpostavka kontrole bolesti (133, 134). Ovi kombinirani pristupi najčešće uključuju primarno kirurško liječenje, nakon čega slijedi postoperativna radioterapija ili kemoterapija. Ostali kombinirani pristupi uključuju indukcijsku kemoterapiju koja prethodi kirurškom liječenju, kemoterapiju bez kirurškog zahvata i sekvencijsku terapiju (indukcijska kemoterapija na koju se nastavlja standardna kemoterapija). Odluke o optimalnom liječenju zahtijevaju multidisciplinarni pristup. Na njih svakako utječe i bolesnik (komorbiditet, sklonost prema vrsti liječenja) i spremnost prihvaćanja funkcionalnih oštećenja nakon liječenja. Pri odabiru terapije treba uzeti u obzir i tehnologiju dostupnu u ustanovi u kojoj se bolesnika liječi.

Orofarinks

U početnim stadijima bolesti (I i II) postiže se ista razina preživljenja radioterapijom ili kirurgijom, a izbor postupka ovisi uglavnom o lokalizaciji primarnog tumora. Odabir terapijskog pristupa u bolesnika s uznapredovalom bolesti (stadiji III i IV) izuzetno je složen. Nema velikih randomiziranih studija koje uspoređuju očuvanje funkcije organa primjenom kombinacije kemoterapije i radioterapije u odnosu na kirurški pristup praćen radijacijom ili kemoterapijom u bolesnika s lokalno uznapredovalim orofaringealnim karcinomom.

Tehnika očuvanja funkcije organa dovela je do dominacije kemoradioterapijskog pristupa u liječenju, dok je kirurška terapija u pričuvnoj funkciji, ukoliko se liječenjem kemoradioterapijom ne postigne zadovoljavajući učinak (135, 136, 137, 138).

Hipofarinks i larinks

Svega jedan do dva posto svih karcinoma hipofarinksa otkrije se u I. ili II. stadiju bolesti. Radioterapija je terapija izbora u ranom stadiju bolesti, jer osigurava očuvanje larinksa u visokom postotku, uz istovremeno liječenje regionalnih limfnih čvorova. Odabrani slučajevi mogu biti kirurški liječeni, uz obveznu eksploraciju vrata, zbog visoke učestalosti okultnih metastaza. Iz istog razloga preporučuje se kasnije radioterapijsko liječenje. Preživljenje u bolesnika liječenih radioterapijom usporedivo je s onima liječenim radikalnom laringektomijom ili poštednom kirurgijom (139), dok rezultati nekih studija ukazuju da je moguće sačuvati funkcionalnost transoralnim pristupom uz postizanje istog ishoda (140, 141).

U ranom stadiju laringealnog karcinoma radioterapija i poštedna kirurgija larinksa visoko su i podjednako učinkovite. Prema dosadašnjim studijama, petogodišnje preživljenje za oba terapijska postupka je oko 90 posto za stadij I i oko 80 posto za stadij II (142).

Prednost je na strani radioterapije zbog funkcionalnih razloga, odnosno boljeg očuvanja glasa, no u slučaju neuspjeha kirurško liječenje je neminovno. U bolesnika s uznapredovalim tumorima hipofarinksa i larinksa, unatoč pokušajima očuvanja organa provođenjem kemoterapije i radioterapije, provođenje radikalnog kirurškog liječnja s postoperativnom kemoterapijom i/ili radioterapijom i dalje dominira (143, 144).

Gledajući po segmentima larinksa, prisutne su neke razlike koje treba posebno naglasiti.

Supraglotis

Kod supraglotičnih karcinoma u ranim stadijima bolesti terapija izbora je radioterapija ili kirurgija, čime se postiže djelotvorna početna lokalna kontrola bolesti u 90 posto bolesnika s I. stadijem bolesti i 80 posto bolesnika sa stadijem II (145), ali petogodišnje preživljenje je od 55 do 75 posto (146). Radioterapija uključuje i limfne čvorove vrata, dok je kirurgija nerijetko kombinirana s postoperativnom iradijacijom operacijskog područja i vrata, čime se postiže visok postotak lokoregionalne kontrole bolesti (88 posto u tri godine) i dobar funkcionalni ishod u 90 posto bolesnika (147).

Glotis

Terapija izbora kod ranih karcinoma glotisa je zračenje ili minimalno invazivna kirurgija, a petogodišnje preživljenje iznosi oko 95 posto (148). Zbog minimalne limfne drenaže tog područja i vrlo niske incidencije okultno pozitivnih limfnih čvorova, preporučuje se opservacija bez kirurške intervencije u području vrata (149).

Subglotis

Primarni su tumori subglotisa vrlo rijetki, često asimptomatični do uznapredovale faze. Vrlo su agresivni s čestim prodorom izvan larinksa. To su razlozi zbog kojih je petogodišnje preživljenje općenito niže pa za I. stadij iznosi 86, a za stadij II 50 posto (150). Kao i kod ostalih anatomskih regija larinksa, i karcinomi subglotisa se u početnom stadiju s jednakom uspješnošću liječe kirurški ili radioterapijom, dok se oni uznapredovali liječe kirurški uz postoperativno kemo i/ili radioterapijsko liječenje.

Kao što je već rečeno za uznapredovale tumore farinksa i kod liječenja istih, radikalni kirurški pristup koji je podrazumijevao totalnu laringektomiju s poslijeoperativnim zračenjem zamijenjen je kombinacijom kemoterapije i radioterapije, s ciljem da se sačuva organ i izbjegne mutilacija. Desetogodišnja studija u bolesnika s uznapredovalim laringealnim karcinomom koji su liječeni radikalnom laringektomijom nakon indukcijske kemoterapije nije pokazala značajne razlike u preživljenju u usporedbi s bolesnicima koji su nakon indukcijske kemoterapije liječeni radioterapijom. Desetogodišnje preživljenje u grupi s radioterapijom bilo je 13 posto, a u grupi s kirurškim liječenjem 14 posto, uz napomenu da je u grupi s iradijacijom 62 posto bolesnika zadržalo normalan larinks (151).

Konkomitantna kemoradioterapija (istovremena primjena radioterapije i kemoterapije) postigla je bolje rezultate u lokoregionalnoj kontroli bolesti, no s povećanim brojem neobjašnjenih smrti među bolesnicima liječenim po tom protokolu (152).

Bez obzira na sve gore navedeno te na protokole liječenja u zapadnim zemljama, u Hrvatskoj se, bez obzira na stadij bolesti, u većini slučajeva još uvijek daje velika prednost primarnom kirurškom liječenju, nakon kojeg, ako je potrebno, slijede kemoterapijsko i radioterapijsko liječenje.

1.8. Uloga i funkcija proteina NEDD9 u ljudskom tijelu

NEDD9 (engl. *Neural precursor cell Expressed, Developmentally Downregulated 9*) je citoskeletni protein koji sudjeluje u prijenosu staničnih signala koji povezuju vanjske stimulacijske signale s proteinima koji mogu direktno promovirati metastaze u tumorima. Brojna istraživanja pokazala su kako NEDD9 ima osnovnu ulogu u proliferaciji, apoptozi, adheziji, migraciji i invaziji stanica (153).

Iako do danas nema dokaza o tome kako NEDD9 ima enzimsku aktivnost, identificirano je nekoliko strukturnih domena koji se nalaze u interakciji s različitim proteinima. NEDD9 gen se nalazi na ljudskom kromosomu 6p25-24 i kodira 843 aminokiseline. Regulacija ekspresije NEDD9 dinamičan je i složen proces koji uključuje fosforilaciju, transkripcijsku aktivaciju i proteolizu te pokazuje direktan ili indirektan utjecaj na različite biološke procese. Fokalna adhezijska kinaza (FAK) i proteini obitelji Src bili su prvi otkriveni enzimi koji sudjeluju u regulaciji NEDD9 fosforilacije. U procesu stanične adhezije, integrin prvo aktivira FAK, zatim aktivirani FAK, fosforilacijom tirozina blizu NEDD9 terminalne domene, stvara mjesta vezanja za Src, a još daljnja fosforilacija dovodi do opsežnijeg stvaranja strukturne domene supstrata NEDD9. Fosforilacija NEDD9 omogućava njegovo vezanje s molekulama koje su povezane s migracijom i invazijom stanica te proliferacijskim signalnim putevima. U određenim tipovima karcinomskih stanica, čak i bez aktivacije integrina, fosforilacija NEDD9 može nastati samo putem pretjerane ekspresije ili aktivacije FAK i Src. Istraživanje je pokazalo kako FAK djeluje kao aktivacijsko sredstvo za NEDD9. Fosforilacija NEDD9 je pod utjecajem integriteta aktina citoskeleta. Puknuće aktina s farmakološkim tvarima može dovesti do defosforilacije NEDD9 (153).

Ekspresija NEDD9 niska je u stanicama koje su u mirovanju, ali se znakovito povećava kada stanice ulaze u stanični ciklus. Iako regulacija ekspresije NEDD9 nije do kraja pojašnjena, poznati su određeni čimbenici indukcije koji reguliraju ekspresiju NEDD9. Transformirajući čimbenik rasta β (TGF-β), kako se čini, pojačava razinu mRNA NEDD9 kao i ekspresiju proteina. Zanimljivo je da signalni putevi TGF-β imaju ulogu u proteolizi NEDD9, a isto tako NEDD9 može inhibirati signalni put TGF-β. Bliska povezanost NEDD9 i TGF-β pokazuje njihovu važnu ulogu u nastanku metastaza (153).

1.8.1. Uloga proteina NEDD9 u migraciji, adheziji i invaziji stanica

Migracija stanica složen je proces koji uključuje promjenu polarnosti stanica, nastajanje mikrofilamenata i mikrotubula i na kraju složeniju regulaciju koja obuhvaća dinamiku staničnih membrana i nastanak adhezijskih plakova. NEDD9 je smješten u staničnom adhezijskom plaku i utječe na migraciju stanica putem regulacije interakcije znakovitih molekula koje potiču migraciju stanica. Tijekom fizioloških procesa poput onih rasta i razvoja te kod upalnih procesa, migracija stanica ima pozitivan utjecaj, no tijekom malignih procesa je migracija stanica pretjerano aktivirana. Nadalje je ustanovljeno kako promjene u ekspresiji NEDD9 imaju važnu ulogu u nepatološkim pomacima stanica hematopoetskog sustava, ali i u migraciji melanoma, karcinoma dojke i glioblastoma. Istraživanja su pokazala kako NEDD9 izravno regulira nastanak i prekid fokalne adhezije. Daljnja su istraživanja pokazala kako je interakcija NEDD9 i FAK kritični događaj tijekom procesa migracije i invazije stanica. Također je dokazano kako NEDD9 može doći u interakciju sa signalnim proteinima, koji se na taj način aktiviraju putem regulacije GTP enzima i posljedičnog promoviranja migracije i invazije stanica. Različiti pokusi *in vitro* pokazali su kako pretjerana ekspresija NEDD9 u različitim tipovima stanica može promovirati migraciju stanica, dok smanjena ekspresija NEDD9 može smanjiti kemotaksiju stanica (153).

Pretjerana ekspresija NEDD9 može aktivirati nizvodne čimbenike poput mitogenima aktiviran protein kinazu, izvanstaničnu signalno-reguliranu kinazu ½ i INK. Pretjerana ekspresija NEDD9 može aktivirati određene gene koji imaju ulogu u migraciji stanica, a koji uključuju i matriksne metaloproteinaze, miozin kinazu lakih lanaca, gene povezane s depolimerizacijom, Rho kinazu, Nck interaktivnu kinazu, receptore za TGF kao i receptore za ErbB2/Her2/Neu. Iako do sada jasni učinci ovih staničnih čimbenika nisu do kraja poznati, dokazano je kako čimbenici poput matriksnih metaloproteinaza i proteina koji su povezani s depolimerizacijom promoviraju migraciju i invaziju stanica (153).

1.8.2. Uloga proteina NEDD9 u apoptozi stanica

Normalna apoptoza stanica započinje cijepanjem kaspazama koje cijepaju druge proteine i stanične komponente. Apoptozu prate morfološke promjene koje uključuju okrugli oblik stanica, izbočenja stanične membrane i raspad adhezijskog plaka. Cijepanje staničnih komponenti koje je uzrokovano kaspazama može dovesti do aktivacije ili inaktivacije ciljnih molekula tijekom apoptoze stanica. NEDD9 i p130Cas su ciljni proteini za cijepanje

posredovano kaspazama. U tom smislu NEDD9 može inhibirati aktivnost integrina što znači da djeluje kao senzor u nastanku adhezijskih plakova. Sukladno tome, inhibicija integrina može dovesti do aktivacije kaspaza. U karcinomskim stanicama pretjerana ekspresija NEDD9 c-terminalnog 28kDa peptida može potaknuti apoptozu stanica, kao što to može i pretjerana ekspresija cijelog NEDD9 proteina. Pretpostavlja se da slabo cijepanje NEDD9 stvara malu količinu p28, što dovodi do raspada adhezijskog plaka i apoptoze stanica. Tako u stanicama karcinoma dojke NEDD9 promovira migraciju stanica i konačno dovodi do apoptoze, a djelovanje NEDD9 usko je povezano sa staničnim ciklusom. Doduše, istraživanja na stanicama glioma i melanoma pokazala su kako pretjerana ekspresija NEDD9 ne dovodi do apoptoze. Moguće objašnjenje ovog nalaza je da je aktivacija puta preživljenja stanica neophodna u procesu izmjene metastatskog fenotipa u stanicama karcinoma. NEDD9 može promovirati metastaze stanica karcinoma tek nakon prijašnje aktivacije puteva preživljenja (153).

1.8.3. Uloga proteina NEDD9 u staničnom ciklusu

Ekspresija NEDD9 je niska u mirnom stadiju i G1 stadiju staničnog ciklusa, postupno se povećava u S stadiju i doseže vrhunac u G2/M stadiju. Ustanovljeno je kako se NEDD9 većinom nalazi u centrosomu tijekom mitoze u G2 stadiju, a kada mitoza započne pomiče se u intermedijarnu zonu mitoze uzduž osi. Kada se citoplazma dijeli, NEDD9 se nalazi u međutijelu. Pretjerana ekspresija NEDD9 može povećati broj osi i centromera u fazi mitoze što dovodi do neuspjeha u odvajanju citoplazme. Ipak, smanjena ekspresija NEDD9 može dovesti do preranog odvajanja centrosoma i nedostatne aktivacije tubulina tijekom procesa odvajanja što dovodi do neuspjeha u diobi stanice. Stanice s poremećenom ekspresijom NEDD9 ostaju u stadiju G1, što je u skladu s razmišljanjem kako NEDD9 potiče stanice da uđu u diobu, a uslijed prekida staničnog ciklusa stanice na kraju ulaze u apoptozu (153).

1.8.4. Uloga proteina NEDD9 u drugim ljudskim patološkim stanjima

Nekoliko je istraživanja pokazalo kako NEDD9, osim u procesima kancerogeneze, ima ulogu i u drugim bolestima. NEDD9 je povišeno reguliran u neuronima cerebralnog korteksa i hipokampusa nakon prolazne globalne ishemije u štakora. Potaknuti NEDD9 je tirozinom fosforiliran i veže se za FAK u dendritima i somi neurona te promovira rast neurita, što doprinosi oporavku neurološke funkcije nakon cerebralne ishemije (153).

Nedavno je istraživanje pokazalo kako je ekspresija NEDD9 povišena u osoba s policističnom bolesti bubrega kao i na mišjem modelu. Iako genetska ablacija NEDD9 neovisno ne utječe na citogenezu, konstitutivni nedostatak NEDD9 jako promovira nastanak cista u mišjem modelu policistične bolesti bubrega. Biološke aktivnosti NEDD9 u policističnoj bolesti bubrega odražavaju aktivaciju Aurora A kinaze koja potiče resorpciju cilija te tako ograničava poremećeno signaliziranje (153).

Uz to, NEDD9 sudjeluje u različitim procesima koji su povezani s imunološkim sustavom poput signaliziranja T receptora, autoimunosti, kemotaksije, adhezije limfocita i odgovora na virusne infekcije. Ukratko, NEDD9 je neovisno otkriven kao protein koji je jako fosforiliran nakon adhezije na beta 1 integrinske receptore u T stanicama (153).

Na kraju se čini kako NEDD9 kao intracelularni protein nije pogodna meta za imunoterapiju karcinoma, ali budući da sudjeluje u zrenju imunološkog sustava i odgovoru/toleranciji antigena na podražaj, nije isključeno da ima ulogu u predviđanju imunološkog odgovora.

1.8.5. Uloga proteina NEDD9 u liječenju karcinoma

S obzirom na ulogu NEDD9 u raznim karcinomima, nekoliko je istraživanja uzelo u obzir njegovu ulogu kao cilja terapije. Uslijed manjka domene kinaze ili bilo koje katalitičke domene i iz razloga što se nalazi intracelularno, NEDD9 je teška molekula za ciljanje. U pre-kliničkim modelima specifično se inhibira sa siRNA ili shRNA, iako je dotok male interferirajuće RNA u ljudi trenutno problematičan (153).

NEDD9 služi kao molekula za druge signalne proteine koji imaju važnu ulogu u nastanku karcinoma, a učinak pretjerane ekspresije NEDD9 u podupiranju metastaza mogao bi biti mitigiran inhibicijom viših regulatora ili donjih ciljeva. Predložena je inhibicija FAK i SRC, kao i ciljanje matriksnih metaloproteinaza ili uklanjanje hondroitin sulfata E s hondroitinazom ABC (153).

1.8.6. Uloga proteina NEDD9 u drugim karcinomima

1.8.6.1. Uloga proteina NEDD9 u gastrointestinalnim karcinomima

Pozitivna ekspresija NEDD9 u tkivu karcinoma jednjaka bila je znakovito viša u usporedbi s prekanceroznim i normalnim tkivom, po navodu Zhanga i sur. (154). Isti autor sa sur. (155) je, uz pomoć imunohistokemije i tehnike tkivne mikromatrice, odredio NEDD9 i fokalnu adhezijsku kinazu (FAK) te ustanovio povećanu ekspresiju NEDD9 i FAK u tkivu karcinoma želuca u odnosu na okolno zdravo tkivo. Nadalje je visoka ekspresija NEDD9 korelirala s dobi bolesnika, veličinom tumora, mjestu na kojem se nalazio isti, dubinom invazije, invazijom krvnih žila, metastazama u limfne čvorove i udaljenim metastazama. Multivarijantna analiza pokazala je kako je ekspresija NEDD9 bila neovisan prognostički čimbenik u bolesnika s karcinomom želuca. Kumulativno petogodišnje preživljenje bolesnika koji su imali povećanu ekspresiju NEDD9 i FAK bilo je znakovito niže u odnosu na one bolesnike koji su imali smanjenu ekspresiju oba biljega. Čini se kako ekspresija NEDD9 implicira progresiju karcinoma želuca. Isti autori (155) zaključuju kako, na temelju TNM stadija, NEDD9 i FAK mogu biti prognostički čimbenici koji pokazuju veličinu tumorske progresije i prognozu u bolesnika s karcinomom želuca.

Karabulut i sur. (156) su, uz pomoć enzimskog imunotesta, mjerili razinu NEDD9 u serumu te ustanovili kako su srednje vrijednosti NEDD9 u bolesnika s karcinomom želuca bile indikativno povišene u odnosu na serumske vrijednosti NEDD9 u kontrolnoj skupini. Isti autori (156) nisu ustanovili znakovite razlike s obzirom na kliničko-patološke i laboratorijske nalaze. Serumska razina NEDD9 imala je znakovit utjecaj na period bez bolesti, ali nije bilo povezanosti s ukupnim preživljenjem i razinom NEDD9. Također, nije bilo povezanosti između razine NEDD9 i odgovora na kemoterapiju. Isti autori (156) zaključuju kako razina NEDD9 može biti dijagnostički biljeg u bolesnika s karcinomom želuca.

Nadalje su Feng i sur. (157), uz pomoć imunohistokemije, Western blota i reakcije lančane polimeraze, ustanovili kako se ekspresija NEDD9 dramatično povećala u tkivima karcinoma želuca i staničnim linijama te je ujedno bila znakovito povezana s nastankom karcinoma želuca.

Liu i sur. (158) su dokazali kako je ekspresija NEDD9 bila znakovito povišena u tkivu karcinoma želuca u usporedbi s normalnim tkivom i benignim lezijama želuca. Povišena ekspresija NEDD9 bila je u znakovitoj korelaciji s visokom preoperativnom razinom karcinoembrijskog antigena (CEA), slabijom diferencijacijom tumora, invazijom tkiva,

prisutnim metastazama u limfne čvorove i uznapredovalijim TNM stadijem. Povišena ekspresija NEDD9 pozitivno je korelirala s kraćim ukupnim petogodišnjim preživljenjem bolesnika te prije spomenuti autori (158) navode kako NEDD9 može biti koristan biljeg u prognoziranju bolesnika s karcinomom želuca.

Shi i sur. (159) su, na temelju imunohistokemijskog bojanja, pokazali kako postoji povećana ekspresija NEDD9 u tkivu karcinoma želuca u odnosu na prekancerozne lezije želuca kao i u odnosu na normalno tkivo želuca. Razina ekspresije NEDD9 bila je usko povezana s lošom diferencijacijom, krvožilnom invazijom, dubinom invazije te je pozitivno korelirala s TNM stadijem na način da je u uznapredovalijim stadijima odnosno TNM-u postojala povećana ekspresija NEDD9. Postojala je, osim toga, znakovita povezanost između povišene ekspresije NEDD9 i lošije prognoze u bolesnika s karcinomom želuca.

Dai i sur. (160) zaključili su kako NEDD9 može biti biljeg u procjeni agresivnosti karcinoma i pomoći u odabiru aktivnih tvari koje bi usporile napredovanje tumora. Li i sur. (161) su na temelju imunohistokemije pokazali kako je visoka ekspresija NEDD9 (u 68 od 92 uzorka kolorektalnog karcinoma) bila prisutna u samo 12 od 92 uzorka normalnog tkiva. Daljnja je analiza podataka pokazala kako je ekspresija NEDD9 znakovito korelirala s uznapredovalim TNM stadijem, pT stadijem, pN i pM statusom. Bolesnici koji su imali višu ekspresiju NEDD9 imali su znakovito kraće vrijeme preživljenja. Multivarijantna analiza pokazala je kako je ekspresija NEDD9 neovisan prognostički čimbenik za ukupno preživljenje bolesnika te isti autori zaključuju kako je NEDD9 mogući prognostički čimbenik i cilj novih terapija u liječenju bolesnika s kolorektalnim karcinomom.

Nadalje su Kim i sur. (162) pokazali kako je NEDD9 jako izražen u kultiviranim stanicama kolorektalnog karcinoma koje su podvrgnute hipoksiji, kao i u hipoksičnim uzorcima ljudskog kolorektalnog karcinoma. A Xia i sur. (163) su pokazali kako u stanicama kolorektalnog karcinoma upalni medijator prostaglandin E2 dovodi do pretjerane ekspresije NEDD9 i posljedične proliferacije stanica, progresije staničnog ciklusa i rasta tumora, što nastaje kao posljedica interakcije između NEDD9 s mitotičkom kinazom Aurora A.

Nekoliko je autora proučavalo ulogu NEDD9 u hepatocelularnom karcinomu. Tako su Zhou i sur. (164) ustanovili kako je visoka ekspresija NEDD9 bila povezana s invazivnošću hepatocelularnog karcinoma. Stoga isti autori zaključuju kako NEDD9 može promovirati metastaze, ali i biti terapijski cilj u liječenju hepatocelularnog karcinoma.

Wang i sur. (165) su ustanovili kako je pojačana ekspresija NEDD9 promovirala migraciju, invaziju i adheziju stanica na izvanstanični matriks u stanicama hepatocelularnog karcinoma. Nadalje, Lu i sur. (166) su, uz upotrebu reakcije lančane polimeraze i *western blot* analize te imunohistokemije, pokazali kako su NEDD9 mRNA i ekspresija proteina u tkivu hepatocelularnog karcinoma bili znakovito viši u odnosu na zdravo tkivo jetre. Visoka ekspresija NEDD9 korelirala je s većim tumorima, uznapredovalijim stadijem tumora, metastazama, intrahepatalnom venskom invazijom, kraćim periodom bez recidiva i kraćim ukupnim preživljenjem. Isti autori (166) zaključuju kako NEDD9 može biti neovisan prognostički čimbenik preživljenja bolesnika s hepatocelularnim karcinomom.

1.8.6.2. Uloga proteina NEDD9 u karcinomu bubrega

Wang i sur. (167) su, uz pomoć kvantitativne reakcije lančane polimeraze i imunohistokemije, ustanovili nisku ekspresiju NEDD9 u normalnom tkivu bubrega, ali i visoku ekspresiju NEDD9 u tkivu karcinoma bubrega. Visoka ekspresija NEDD9 rezultira znatno kraćim preživljenjem u usporedbi s pacijentima u kojih je ekspresija NEDD9 normalna. Njihovi podaci sugeriraju da je NEDD9 mogući novi cilj u liječenju metastaza i prevenciji pojave novih, kao i recidiva karcinoma bubrega.

1.8.6.3. Uloga proteina NEDD9 u karcinomu pluća

Precizna uloga i mehanizmi povezani s NEDD9 posredovanim metastazama pluća nisu još uvijek razjašnjeni. Stoga su Jin i sur. (168) napravili istraživanje u kojem su ustanovili kako NEDD9 promovira migraciju karcinomskih stanica pluća i invaziju karcinoma te navode kako je NEDD9 važan medijator koji promovira metastaze u oboljelih od karcinoma pluća. Taj nalaz su potvrdili i Okon i sur. (169).

Daljnjim su istraživanjem Miao i sur. (170) ustanovili pozitivnu korelaciju pretjerane NEDD9 ekspresije s metastazama u limfne čvorove u bolesnika s ne-malim stanicama karcinoma pluća. Dokazali su kako je ukupno preživljenje ovih bolesnika koji su imali pretjeranu ekspresiju NEDD9 bilo znakovito kraće u odnosu na bolesnike koji su imali normalnu ekspresiju NEDD9. Nakon multivarijatne analize podataka, pretjerana ekspresija NEDD9 i TNM stadij pokazali su se u ovih bolesnika kao neovisni prognostički čimbenici za ukupno preživljenje. Isto su potvrdili Feng i sur. (171), koji su pokazali kako je povećana

ekspresija NEDD9 bila povezana s malignom progresijom i metastazama. Kondo i sur. (172) su dokazali kako je pretjerana ekspresija NEDD9 promovirala metastaze u pluća, doduše kod miševa. Konačno su univarijantna i multivarijantna analiza pokazale kako postoji jaka povezanost između NEDD9 ekspresije i preživljenja bez recidiva bolesti, kao i ukupnog preživljenja. Stoga se NEDD9 smatra obećavajućim biljegom u prognoziranju karcinoma pluća, a njegova ekspresija može promovirati nastanak metastaza.

1.8.6.4. Uloga proteina NEDD9 u karcinomu dojke

Loskutov i sur. (173) su validirali NEDD9 kao klinički relevantan terapijski cilj za liječenje metastatskog karcinoma dojke. Štajduhar i sur. (174) ustanovili su povišenu ekspresiju receptora hormona rasta kao i NEDD9 proteina u stromalnim i epitelnim dijelovima unutar metastaza u aksilarne limfne čvorove u usporedbi s ne-metastatskim tumorima te su na taj način dokazali kako ova dva biljega mogu biti biljezi agresivnosti tumora. Osim prije navedenih autora, Kong i sur. (175) dokazali su kako je ekspresija NEDD9 bila često pojačana u triple negativnim podtipovima karcinoma dojke i u agresivnim karcinomima dojke. Zatim su Bradshaw i sur. (176), na temelju saznanja kako estradiol ima ključnu ulogu u karcinomu dojke, istraživali povezanost ekspresije NEDD9 i ekspozicije estrogenu te pokazali kako se upotrebom tamoksifena (anti-estrogena) smanjuje ekspresija NEDD9 koja se inače nakon tri dana ekspozicije estrogenu dramatično povećava. Istraživanje Izumchenka i sur. (177) prvi put dokazuje *in vivo* ulogu NEDD9 u progresiji karcinoma dojke te sugerira kako NEDD9 može biti biljeg za progresiju tumora.

1.8.6.5. Uloga proteina NEDD9 u malignom melanomu

Povezanost između pretjerane ekspresije NEDD9 i metastatskog potencijala dobro je dokumentirana u melanomu. Rambow i sur. (178) su pokazali kako je NEDD9 direktni cilj miR-125b, koji je uključen u modulaciju migracije i invazije stanica melanoma. Ulogu NEDD9 u malignom melanomu su proučavali i Kim i sur. (179) te su ustanovili kako je NEDD9 pojačao invaziju karcinomskim stanicama *in vitro*, a metastaze *in vivo* u normalnim i promijenjenim melanocitima. Osim toga, isti autori (179) navode kako je NEDD9 ekspresija znakovito veća u ljudskim uzorcima metastatskog melanoma u odnosu na primarne melanome te da je razina ekspresije NEDD9 veća od 50 posto u primarnim melanomima u odnosu na

benigne madeže. Sve navedeno jasno ukazuje da je pretjerana ekspresija NEDD9 važna u tumorigenezi malignog melanoma.

1.8.6.6. Uloga proteina NEDD9 u cervikalnom karcinomu

Sima i sur. (180) ustanovili su pojačanu ekspresiju NEDD9 u krvi bolesnica s cervikalnim karcinomom u usporedbi sa zdravim cervikalnim tkivom, kao i povezanost ekspresije NEDD9 s histološkim stadijem tumora i metastazama u limfne čvorove te FIGO (engl. *International Federation of Gynecology and Obstetrics*) klasifikacijom stadija cervikalnog karcinoma. Isti autori (180) su ustanovili kako pretjerano izražen NEDD9 promovira migraciju i invaziju u stanicama cervikalnog karcinoma.

1.8.6.7. Uloga proteina NEDD9 u karcinomu prostate

Morimoto i sur. (181) su, u 45 uzoraka karcinoma prostate i deset uzoraka zdravog tkiva prostate, imunohistokemijski dokazali znakovitu pozitivnu korelaciju između rezultata NEDD9 bojanja i agresivnosti tumora (stadij po Gleasonu, serumska razina prostata specifičnog antigena (PSA)). Rezultat NEDD9 bojenja u primarnom karcinomu prostate s koštanim metastazama bio je znakovito viši u odnosu na karcinom prostate bez metastaza. Isti autori (181) zaključuju kako NEDD9 može biti ključni čimbenik u liječenju metastatskog karcinoma prostate i u prevenciji širenja lokaliziranog karcinoma prostate na druge organe.

1.8.6.8. Uloga proteina NEDD9 u gliomu, glioblastomu i neuroblastomu

Jako invazivno ponašanje stanica glioblastoma povezano je s ekspresijom NEDD9, navode Natarajan i sur. (182). U stanicama neuroblastoma deplecija NEDD9 znakovito je smanjila migraciju stanica, izvještavaju Zhong i sur. (183).

Speranza i sur. (184) ustanovili su kako je oko 50 posto bolesnika s gliomom niskog stupnja imalo veću ekspresiju NEDD9 u usporedbi s normalnim tkivom mozga, a period bez progresije bolesti je bio kraći u ovih bolesnika u odnosu na one koji su imali snižene razine NEDD9. Isti autori (184) sugeriraju moguću ulogu NEDD9 kao biljega u progresiji glioma.

Nadalje su Syed i sur. (185) dokazali kako je poremećaj regulacije NEDD9, proteina koji je uključen u migraciju stanica, vjerojatno prognostički pokazatelj u progresiji glioma.

1.8.6.9. Uloga proteina NEDD9 u leukemiji i limfomu

Uloga NEDD9 u nastanku hematoloških malignih bolesti istraživana je na nekoliko mišjih modela. Tako su Seo i sur. (186) ustanovili kako je bolest bila puno agresivnija u miševa kojima je nedostajao NEDD9. Isti autori (186) su pretpostavili da je to uslijed toga što NEDD9 ima ulogu u ograničavanju ekstramedularne hiperplazije. Izumchenko i sur. (187) pokazali su kako je pojačana ekspresija kao i fosforilacija NEDD9 primijećena u adultnim leukemijama i limfomima T-stanica. Iwata i sur. (188) pretpostavljaju kako je povećana ekspresija NEDD9 u adultnoj leukemiji/limfomu T-stanica posebno zanimljiva, jer NEDD9 može doprinijeti infiltracijskim svojstvima leukemičnih stanica u ovoj bolesti koju karakterizira opsežna infiltracija mnogih organa i tkiva s T-stanicama.

2. Hipoteza

Povećana izraženost proteina NEDD9 u bolesnika s planocelularnim karcinomima glave i vrata pokazatelj je lošijeg preživljenja.

3. Ciljevi rada

Ciljevi rada bili su odrediti imunohistokemijsku izraženost proteina NEDD9 u tkivima bolesnika oboljelih od planocelularnih karcinoma glave i vrata, s obzirom na:

1. lokalizaciju primarnog karcinoma (orofarinks, hipofarinks, larinks)
2. proširenost tumora (TNM) u trenutku postavljanja dijagnoze
3. stupanj diferenciranosti tumora (histološki gradus)
4. preživljenje bolesnika.

4. Materijali i metode

U ovom retrospektivnom istraživanju analizirala se imunohistokemijska izraženost proteina NEDD9 u planocelularnim karcinomima glave i vrata bolesnika operiranih i liječenih na Odjelu za kirurgiju glave i vrata Zavoda za onkološku kirurgiju Klinike za tumore Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice u razdoblju od 2000. do 2006. godine. Arhivirani patohistološki materijal koristio se nakon odobrenja Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice.

Ukupno je analiziran 131 bolesnik (128 muškaraca i tri žene, prosječne dobi 62 godine, dok je raspon dobi iznosio 53-68 godina) s lokalizacijom primarnog tumora u području orofarinksa, hipofarinksa i larinksa koji su praćeni najmanje pet godina.

Uvjeti za uključivanje u istraživanje bili su:

1. patohistološka dijagnoza planocelularnog karcinoma glave i vrata (orofarinks, hipofarinks i larinks)
2. bolesnik se prvi put liječi zbog karcinoma u području glave i vrata, uz uvjet da je prvi primijenjeni modalitet liječenja radikalna operacija (na kraju operacije prema operativnom nalazu nema podatka o makroskopskom ostatku tumora)
3. dostupan materijal za analizu (parafinske kocke tumora iz arhive Odjela za onkološku patologiju i kliničku citologiju Klinike za tumore Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice)
4. dostupan podatak o TNM stadiju bolesti u trenutku postavljanja dijagnoze
5. dostupni podaci o vrsti liječenja i tijeku bolesti
6. dostupan podatak o preživljenju i smrti bolesnika (iz povijesti bolesti te iz podataka Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo).

Istraživanje se provelo na uzorcima tkiva planocelularnih karcinoma glave i vrata uklopljenih u parafinske blokove iz arhive Odjela za onkološku patologiju i kliničku citologiju Klinike za tumore.

Uzorci tkiva obrađeni su standardnim histološkim postupkom, što uključuje 24 do 48--satnu fiksaciju tkiva u deset-postotnom puferiranom formalinu. Nakon fiksiranja u formalinu, procesom pripreme tkiva kroz uzlaznu seriju alkohola i ksilola, tkivo je uklopljeno u parafin. Nakon patohistološke dijagnostike, stakla i parafinske kocke su arhivirane. Na tako

pripremljenom preparatu učinila se revizija patohistološke dijagnoze i odredio stupanj diferenciranosti tumora.

Dodatni rez svakog primarnog tumora debljine dva do tri mikrometra montirao se na silaniziranim predmetnim staklima, koja su imunohistokemijski obojena upotrebom primarnog mišjeg anti-humanog protutijela na protein NEDD9 (klon 2G9, AbCam USA) razrijeđena u omjeru 1:50 u puferu za razrjeđivanje (Antibody diluent, S2023, Dako Danska). Prije početka metode preparat se oko 40 minuta sušio u termostatu na 60 ^{o}C, nakon čega je deparafiniran i rehidriran zbog demaskiranja antigena. Svi postupci obavili su se istovremeno, kuhanjem preparata 20 minuta u Tris/EDTA puferu pH 9 na 97 ^{o}C u PT link uređaju (Dako, Danska).

Postupak imunohistokemijskog bojenja proveo se automatskom obradom u Dako Autostainer Universal Staining System uređaju metodom streptavidin imuno peroksidaze.

Svi reagensi za imunohistokemijsko bojenje sadržani su u vizualizacijskom paketu EnVision Flex High pH (K8010, Dako Danska). Vizualizacija specifične reakcije učinila se s DAB (diaminobenzidin) kromogenom, a kontrastno obojenje hemalaun eozinom.

Imunohistokemijska reakcija očitavala se pozitivnom u slučaju obojenja citoplazme tumorskih stanica, prema preporuci proizvođača. Analiza imunohistokemijske reakcije izražena je semikvantitativno određivanjem indeksa bojanja (IB) koji je umnožak postotka pozitivnih tumorskih stanica i intenziteta obojenja.

Postotak pozitivnih tumorskih stanica očitavao se:

0 (negativna reakcija) – nema obojenja u citoplazmi tumorskih stanica

1 (slabo pozitivna reakcija) – do deset posto pozitivnih tumorskih stanica

2 (umjereno pozitivna reakcija) – od 11 do 50 posto pozitivnih tumorskih stanica

3 (jako pozitivna reakcija) – više od 51 posto pozitivnih tumorskih stanica.

Intenzitet citoplazmatskog obojenja određen je kao slab (1), umjeren (2) i jak (3). Vrijednost IB kretao se u rasponu od 0 do 9. Dobivene IB vrijednosti 0, 1, 2 i 3 smatrane su negativnim, dok su IB vrijednosti 4, 6 i 9 smatrane pozitivnim.

Statistička analiza podataka

Podaci su prikazani u tablicama i slikama. Nakon ispitivanja normalnosti Kolmogorov-Smirnovovim testom, odlučeno je da se u analizama koriste neparametrijski testovi. Kategoričke varijable prikazane su kao apsolutne frekvencije uz odgovarajuće udjele, a kvantitativne varijable kroz medijane i interkvartilne raspone. U slučaju Fisher-Freeman--Haltonovog egzaktnog testa, kada je tablica slučajnosti veća od 2 x 2, korištena je za analizu razlika u kategorijskim kliničkim parametrima između ocjena NEDD9 izraženosti. Analiza preživljavanja Kaplan-Meier s Log-Rank (Mantel-Cox) testom korištena je za analizu preživljavanja u vezi s ekspresijom NEDD9 tijekom 60 mjeseci praćenja, dok je predviđeno preživljenje prikazano kroz prosječne vrijednosti uz pripadajući interval pouzdanosti od 95 posto. Načinjen je Coxov proporcionalni model rizika za model preživljavanja za procjenu multivarijantnog prediktivnog modela u odnosu na praćenje i predikciju smrtnog ishoda. Sve P vrijednosti ispod 0,05 smatrane su značajnim. Statističkim analizama i grafičkim slikama korišten je softverski sustav za analizu podataka IBM SPSS Statistics, verzija 25.0 (https://www.ibm.com/analytics/spss-statistics-software).

S obzirom na vrlo slično kliničko ponašanje i preživljenje bolesnika s karcinomom orofarinksa i hipofarinksa, oni se, za potrebe dijela statističke analize, grupiraju u jednu skupinu te tako dobivamo dvije skupine bolesnika, one s karcinomom orofarinksa i hipofarinksa (n 69; 52,7 posto) te bolesnike s karcinomom larinksa (n 62; 47,3 posto).

5. Rezultati

5.1. Analiza obilježja tumora odabranih za imunohistokemijsku obradu

Tablica 11. Klinički i demografski pokazatelji ispitanika (n = 131)

NEDD 9 izraženost	Negativna izraženost: n (%)	26 (19,8)
	Pozitivna izraženost: n (%)	105 (80,2)
Lokalizacija tumora	Larinks: n (%)	62 (47,3)
	Orofarinks: n (%)	31 (23,7)
	Hipofarinks: n (%)	38 (29,0)
T status	1: n (%)	24 (18,3)
	2: n (%)	57 (43,5)
	3: n (%)	36 (27,5)
	4: n (%)	14 (10,7)
T status (skupine)	Početni (T1-T2): n (%)	81 (61,8)
	Uznapredovali (T3-T4): n (%)	50 (38,2)
N status	0: n (%)	61 (46,6)
	1: n (%)	13 (9,9)
	2: n (%)	49 (37,4)
	3: n (%)	8 (6,1)
N status (skupine)	N0: n (%)	61 (46,6)
	N1, 2 ili 3: n (%)	70 (53,4)
M status	M0: n (%)	131 (100,0)
	M1: n (%)	0 (0,0)
Klinički stadij bolesti (TNM)	1: n (%)	20 (15,3)
	2: n (%)	20 (15,3)
	3: n (%)	25 (19,1)
	4: n (%)	66 (50,4)
Klinički stadij bolesti (TNM; skupine)	Početni (1-2): n (%)	40 (30,5)
	Uznapredovali (3-4): n (%)	91 (69,5)
Radioterapija	Bez radioterapije: n (%)	32 (24,4)
	Postoperativno: n (%)	99 (75,6)
Kemoterapija	Ne: n (%)	119 (90,8)
	Da: n (%)	12 (9,2)
Smrtni ishod	Ne: n (%)	57 (43,5)
	Da: n (%)	74 (56,5)
Uzroci smrti	Lokalni recidiv: n (%)	21 (28,4)
	Diseminacija: n (%)	13 (17,6)
	Ostali uzroci indirektno povezani s primarnom bolešću: n (%)	40 (54,0)
Dob (godine): medijan (IQR)*		62,0 (53,0-68,0)
BMI (kg/m2): medijan (IQR)*		23,9 (20,9-27,7)
Vrijeme preživljenja (mjeseci): medijan (IQR)*		44,0 (12,0-60,0)

* IQR = interkvartilni raspon

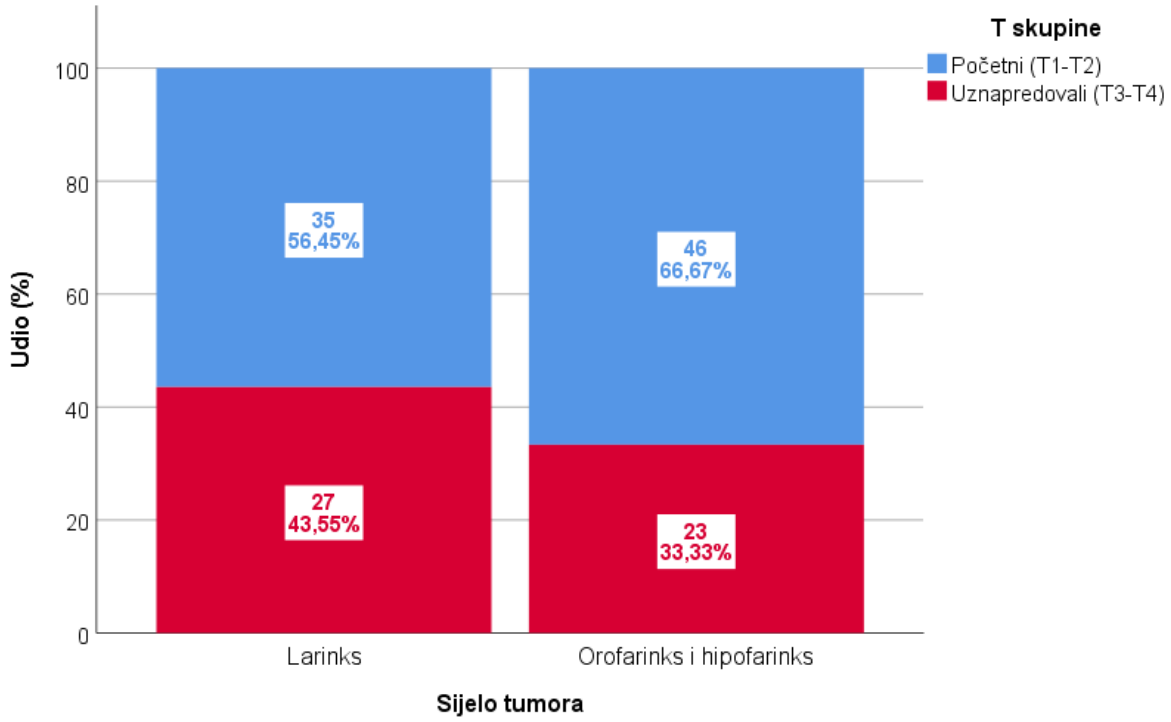
Klinički i demografski pokazatelji ispitanika prikazani su u Tablici 1. Pozitivnu izraženost NEDD9 imalo je 105 (80,2 posto) ispitanika. Sijelo tumora u larinksu imalo je 62 (47,3 posto) ispitanika, uznapredovali T status (T3 i 4) 38,2 posto ispitanika, pozitivne metastaze u limfne čvorove 53,4 posto ispitanika, uznapredovali klinički stadij tumora 69,5 posto ispitanika te smrtni ishod 74 (56,5 posto) ispitanika.

Medijan dobi (interkvartilni raspon) iznosio je 62 (53,0-68,0) godina, dok je medijan vremena preživljenja svih ispitanika iznosio 44 (12,0-60,0) mjeseci.

5.2. Analiza međuodnosa obilježja odabranih tumora

Tablica 12. Odnos lokalizacije i veličine primarnog tumora (T): Fisher-Freeman-Haltonov egzaktni test

		Sijelo tumora				P
		Larinks		Hipofarinks + Orofarinks		
		N	%	N	%	
T klasifikacija	1	14	22,6 %	10	14,5 %	0,074
	2	21	33,9 %	36	52,2 %	
	3	17	27,4 %	19	27,5 %	
	4	10	16,1 %	4	5,8 %	
T skupine	Početni (T1-T2)	35	56,5 %	46	66,7 %	0,230
	Uznapredovali (T3-T4)	27	43,5 %	23	33,3 %	

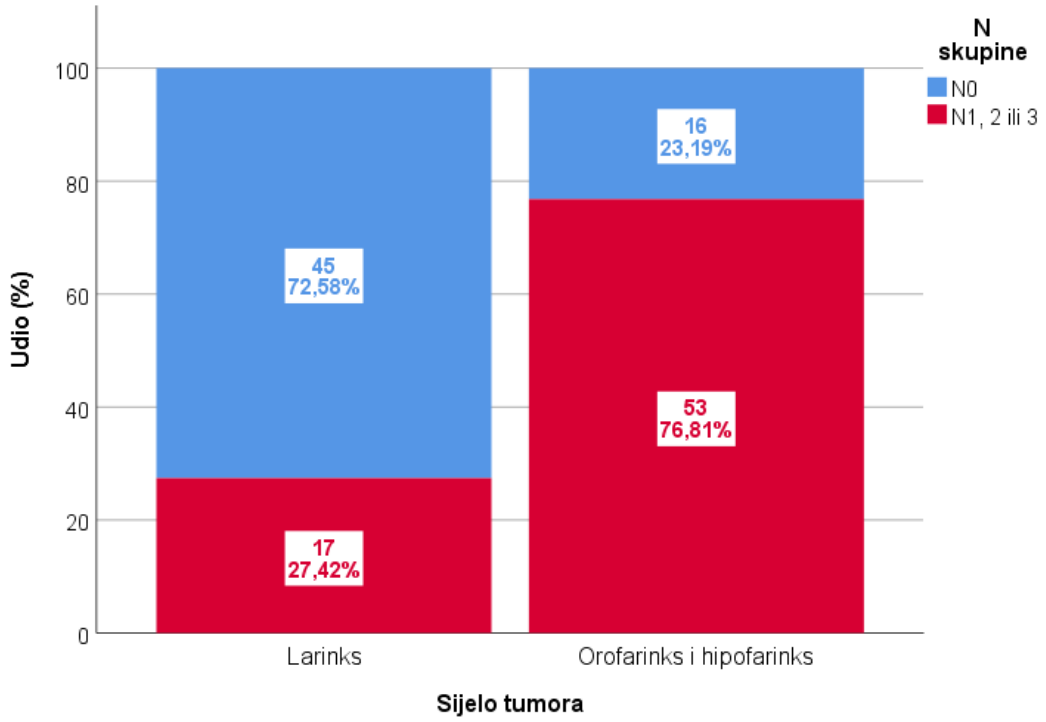


Slika 8. Odnos lokalizacije i veličine primarnog tumora (T)

Nisu zabilježene značajne razlike između lokalizacije i veličine primarnog tumora.

Tablica 13. Odnos lokalizacije tumora i metastaza u limfne čvorove na vratu (N): Fisher--Freeman-Haltonov egzaktni test

		Sijelo tumora				P
		Larinks		Hipofarinks + Orofarinks		
		N	%	N	%	
N klasifikacija	0	45	72,6 %	16	23,2 %	< 0,001
	1	5	8,1 %	8	11,6 %	
	2	12	19,4 %	37	53,6 %	
	3	0	0,0 %	8	11,6 %	
N skupine	N0	45	72,6 %	16	23,2 %	< 0,001
	N1, 2 ili 3	17	27,4 %	53	76,8 %	

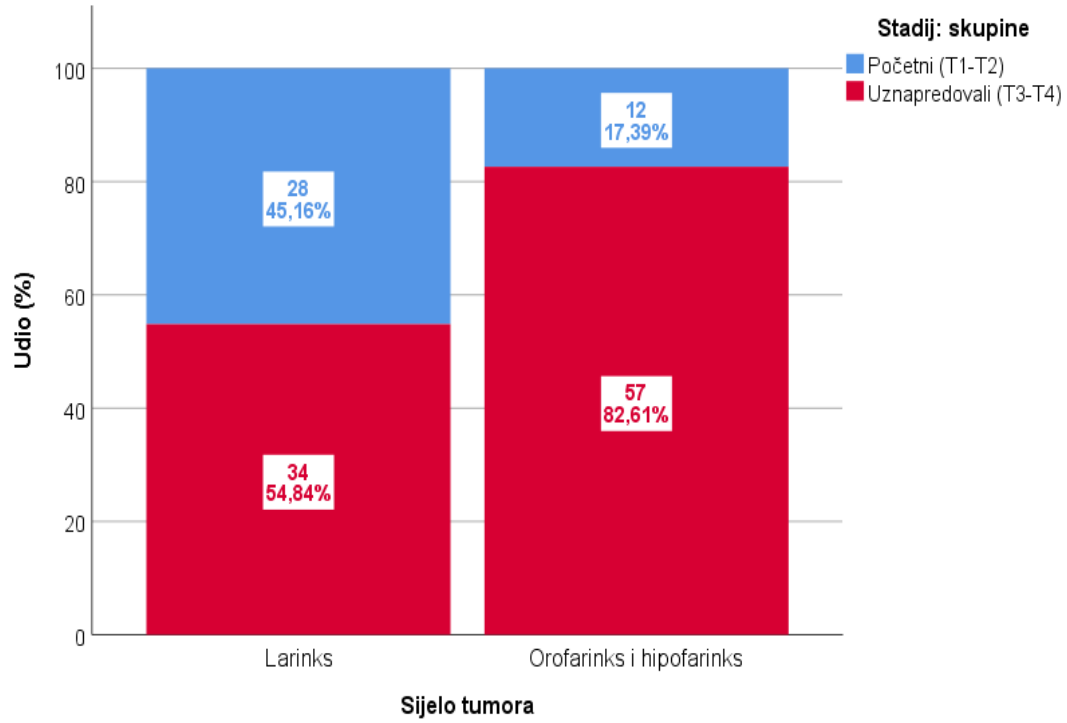


Slika 9. Odnos lokalizacije tumora i metastaza u limfne čvorove na vratu (N)

Kod tumora sa sijelom u orofarinksu i hipofarinksu značajno su češće pozitivni limfni čvorovi na vratu (P < 0,001).

Tablica 14. Odnos lokalizacije tumora i kliničkog stadija bolesti (TNM): Fisher-Freeman--Haltonov egzaktni test

		Sijelo tumora				P
		Larinks		Hipofarinks + Orofarinks		
		N	%	N	%	
Stadij: klasifikacija	1	14	22,6 %	6	8,7 %	0,001
	2	14	22,6 %	6	8,7 %	
	3	14	22,6 %	11	15,9 %	
	4	20	32,3 %	46	66,7 %	
Stadij: skupine	Početni	28	45,2 %	12	17,4 %	0,001
	Uznapredovali	34	54,8 %	57	82,6 %	

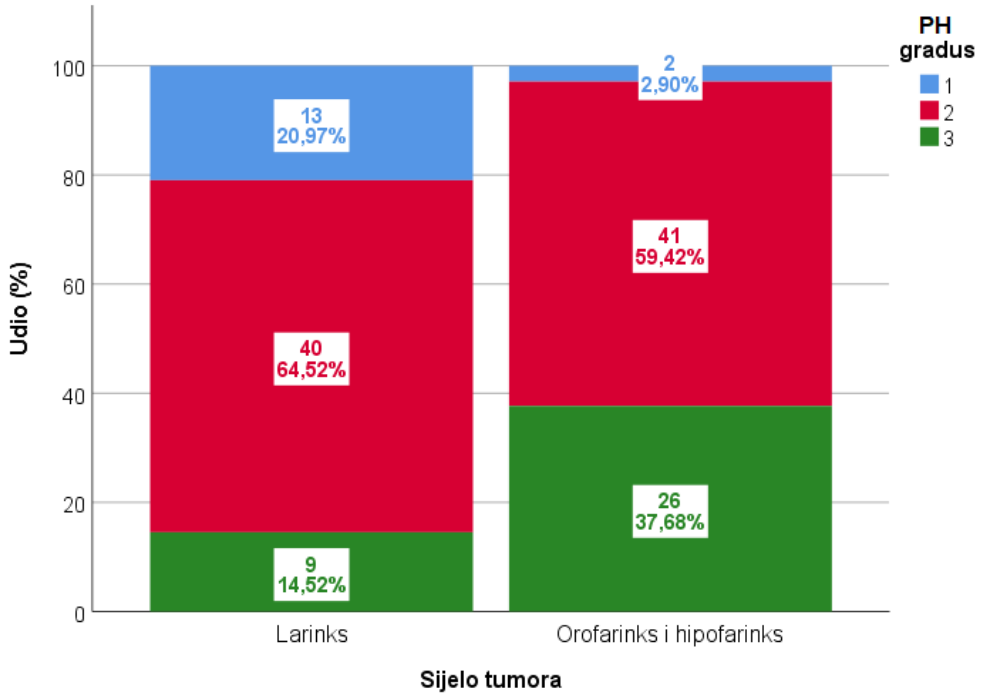


Slika 10. Odnos lokalizacije tumora i kliničkog stadija bolesti (TNM)

Kod tumora sa sijelom u orofarinksu i hipofarinksu značajno su zastupljeniji uznapredovali klinički stadiji bolesti (P = 0,001).

Tablica 15. Odnos lokalizacije i stupnja diferenciranosti tumora (PH gradus): Fisher--Freeman-Haltonov egzaktni test

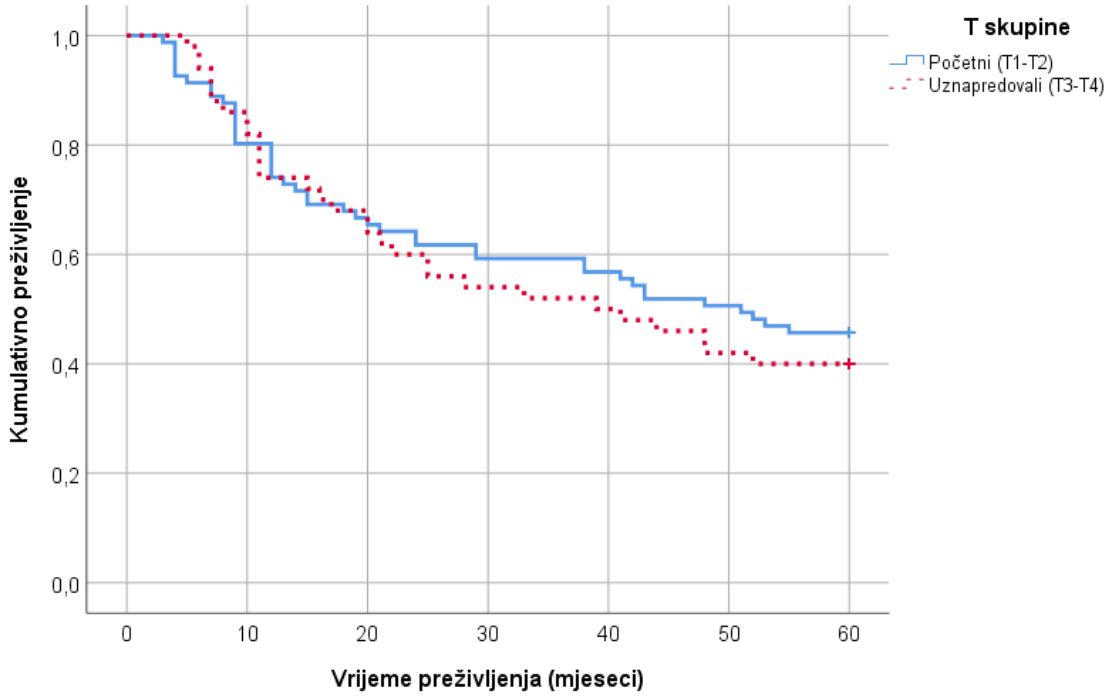
		Sijelo tumora				P
		Larinks		Hipofarinks + Orofarinks		
		N	%	N	%	
PH gradus	1	13	21,0 %	2	2,9 %	< 0,001
	2	40	64,5 %	41	59,4 %	
	3	9	14,5 %	26	37,7 %	



Slika 11. Odnos lokalizacije i stupnja diferenciranosti tumora (PH gradus)

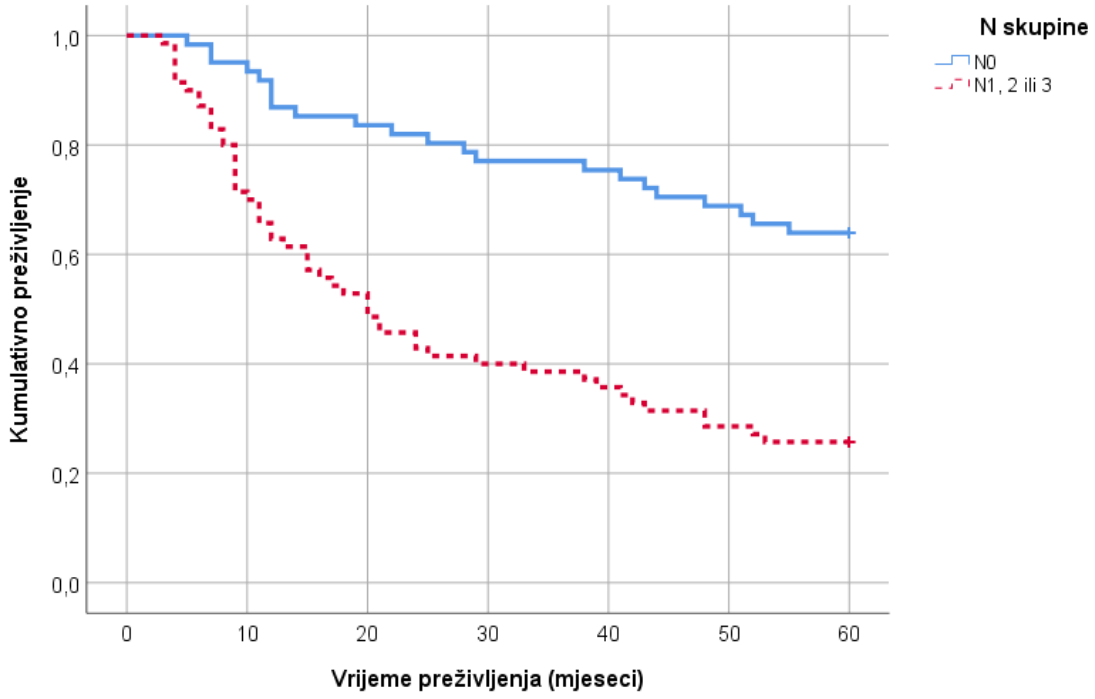
Kod tumora sa sijelom u orofarinksu i hipofarinksu značajno je zastupljeniji gradus 3 (P < 0,001).

5.3. Analiza preživljenja



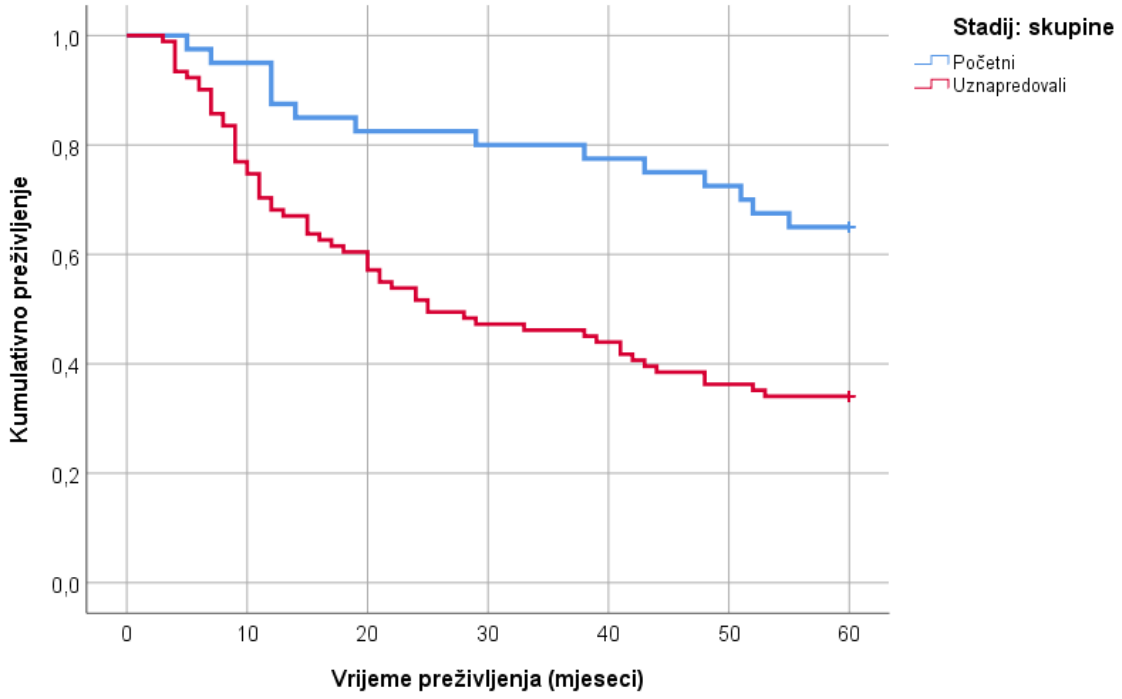
Slika 12. Preživljenje ovisno o T stadiju bolesti: Kaplan-Meierova krivulja s log-rank testom (P = 0,567).

Nije bilo statistički značajne razlike u preživljenju obzirom na T stadij (P = 0,567).



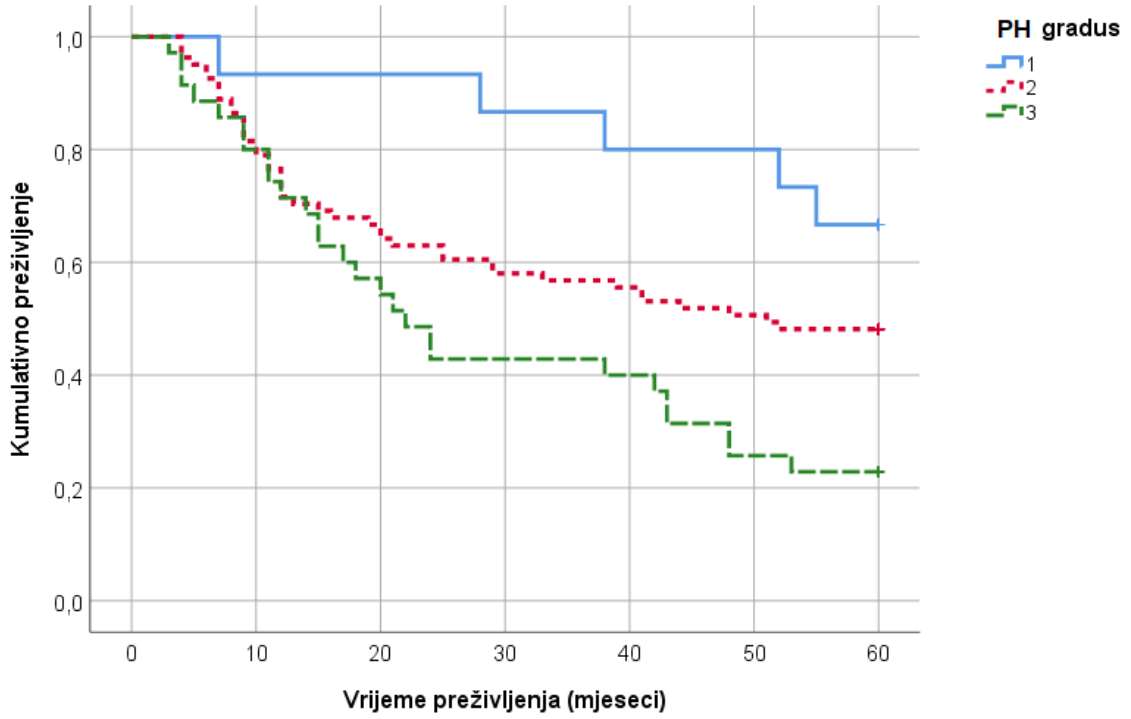
Slika 13. Preživljenje ovisno o N stadiju bolesti: Kaplan-Meierova krivulja s log-rank testom (P < 0,001)

Skupina bolesnika koja nije imala metastaze u limfne čvorove na vratu imala je prosječno preživljenje 47,9 (95 posto CI 43,2-52,7) mjeseci u odnosu na N pozitivnu skupinu koja je imala značajno lošije preživljenje s prosjekom od 28,9 (95 posto CI 23,8-34,1) mjeseci (P < 0,001).



Slika 14. Preživljenje ovisno o kliničkom stadiju bolesti (TNM): Kaplan-Meierova krivulja s log-rank testom (P = 0,001)

Skupina bolesnika koja je u početnom kliničkom stadiju bolesti imala prosječno preživljenje 48,9 (95 posto CI 43,1-54,7) mjeseci tijekom 60-mjesečnog praćenja u odnosu na skupinu s uznapredovalim stadijem bolesti koja je imala značajno lošije preživljenje s prosjekom od 32,9 (95 posto CI 28,3-37,6) mjeseci (P = 0,001).

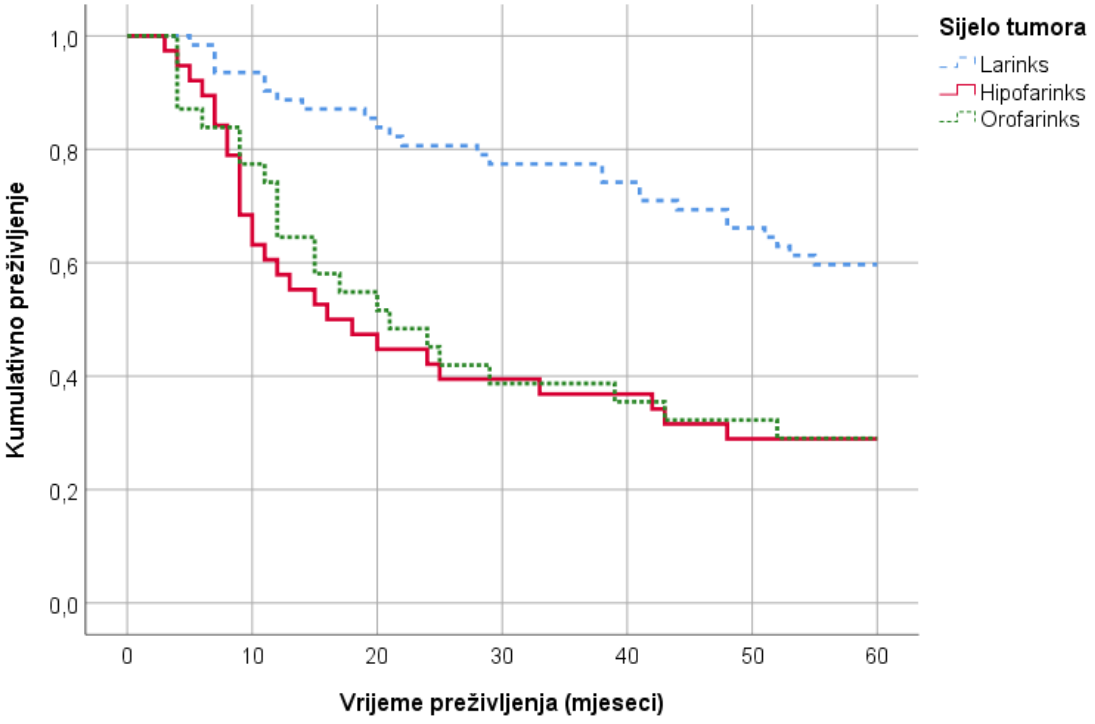


Slika 15. Preživljenje ovisno o stupnju diferenciranosti tumora (PH gradus): Kaplan--Meierova krivulja s log-rank testom (P = 0,007)

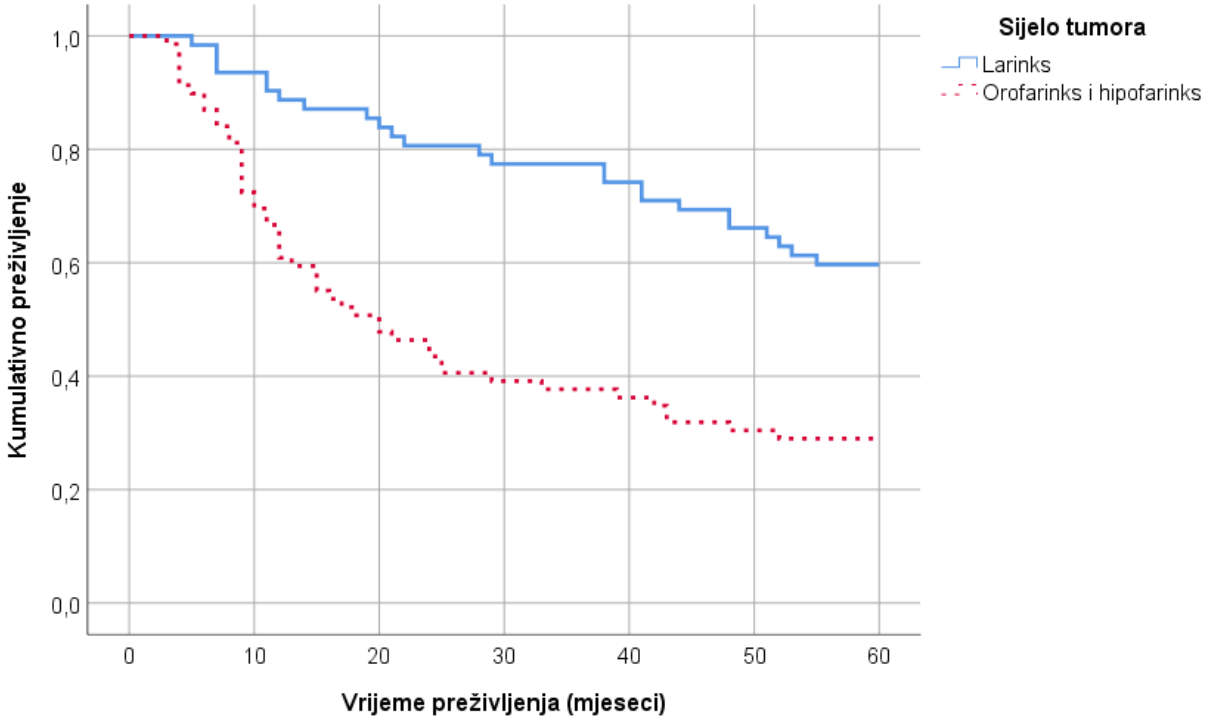
Najbolje preživljenje ima gradus 1: 52,0 (95 posto CI 44,3-59,7) mjeseci, nakon čega dolazi gradus 2 s prosječnim preživljenjem od 38,4 mjeseca (95 posto CI 33,4-43,4), a najlošije je preživljenje kod gradusa 3 te iznosi 30,3 mjeseca (95 posto CI 23,3-37,2),

P = 0,007. Iz Slike 7 vidljivo je kako u prvih godinu dana nema razlike u preživljenju između gradusa 2 i 3, odnosno ispitanici s tim gradusima podjednako umiru. Prava razlika između gradusa 2 i 3 nastaje tek nakon godinu dana praćenja.

Slike 16. i 17. prikazuju analizu preživljenja s obzirom na lokalizaciju tumora u tri skupine (larinks, hipofarinks i orofarinks), odnosno dvije skupine (larinks te orofarinks i hipofarinks zajedno). S obzirom da je preživljenje između lokalizacija na hipofarinksu i orofarinksu bilo gotovo identično (Slika 9), u daljnjoj su analizi te lokalizacije prikazane kao jedna skupina (Slika 10). Tumori lokalizirani u larinksu imaju značajno bolju prognozu i preživljenje (P < 0,001).



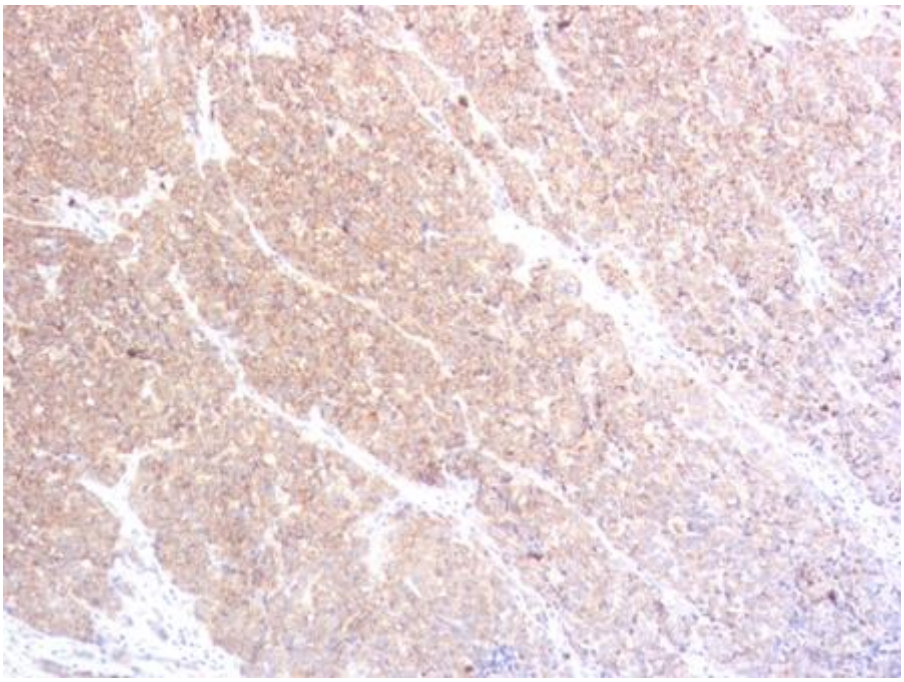
Slika 16. Preživljenje ovisno o lokalizaciji tumora (tri skupine): Kaplan-Meierova krivulja s log-rank testom (P < 0,001)



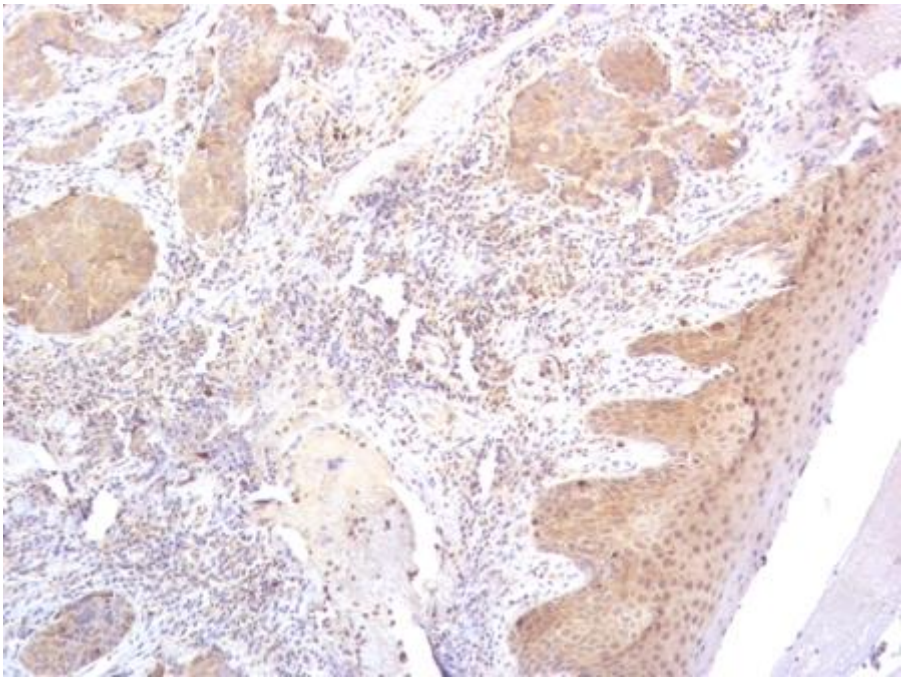
Slika 17. Preživljenje ovisno o lokalizaciji tumora (dvije skupine): Kaplan-Meierova krivulja s log-rank testom ($P < 0,001$)

5.4. Analiza izraženosti proteina NEDD9

Od ukupno 131 bolesnika, njih 105, odnosno 80,2 posto imalo je pozitivnu ekspresiju proteina NEDD9.



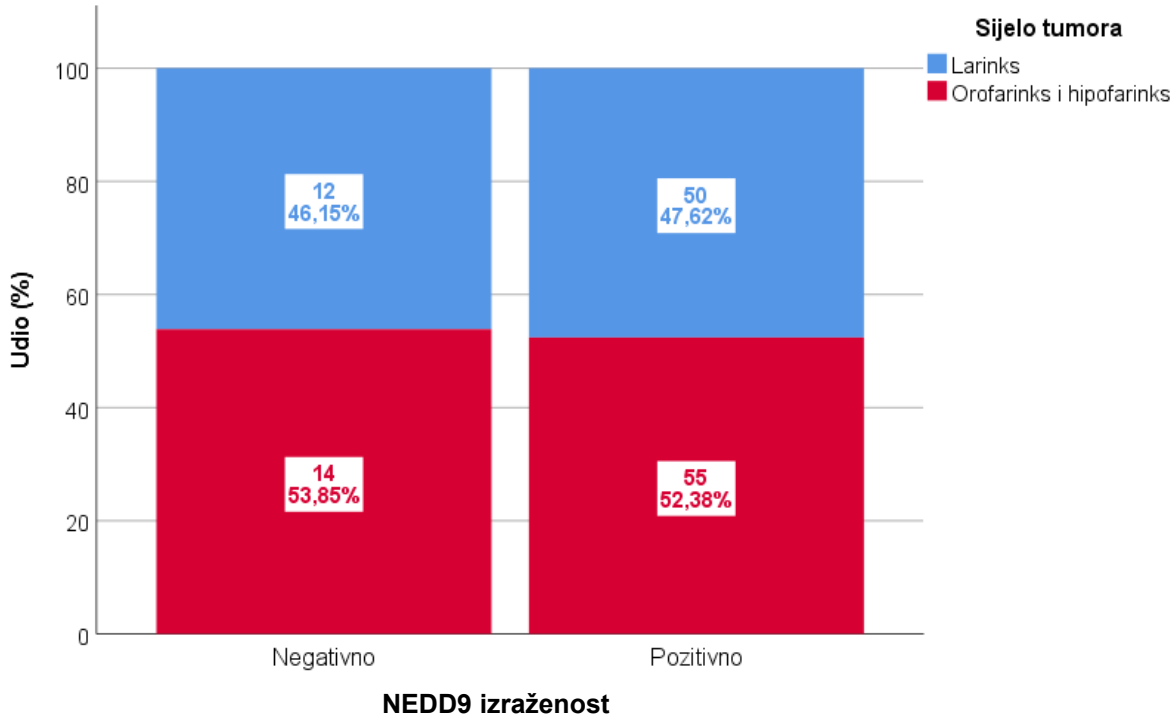
Slika 18. Jaka pozitivna reakcija u citoplazmama tumorskih stanica na protein NEDD9 (IMH 10x)



Slika 19. Umjereno pozitivna reakcija u citoplazmama tumorskih stanica i atipičnih pločastih stanica unutar površnog epitela na protein NEDD9 (IMH 10x)

Tablica 16. Odnos izraženosti NEDD9 i lokalizacije tumora: Fisher-Freeman-Haltonov egzaktni test

		NEDD9 izraženost skupine				P
		Negativno		Pozitivno		
		N	%	N	%	
Sijelo tumora	Larinks, orofarinks i hipofarinks	12	46,2 %	50	47,6 %	1,000
		14	53,8 %	55	52,4 %	

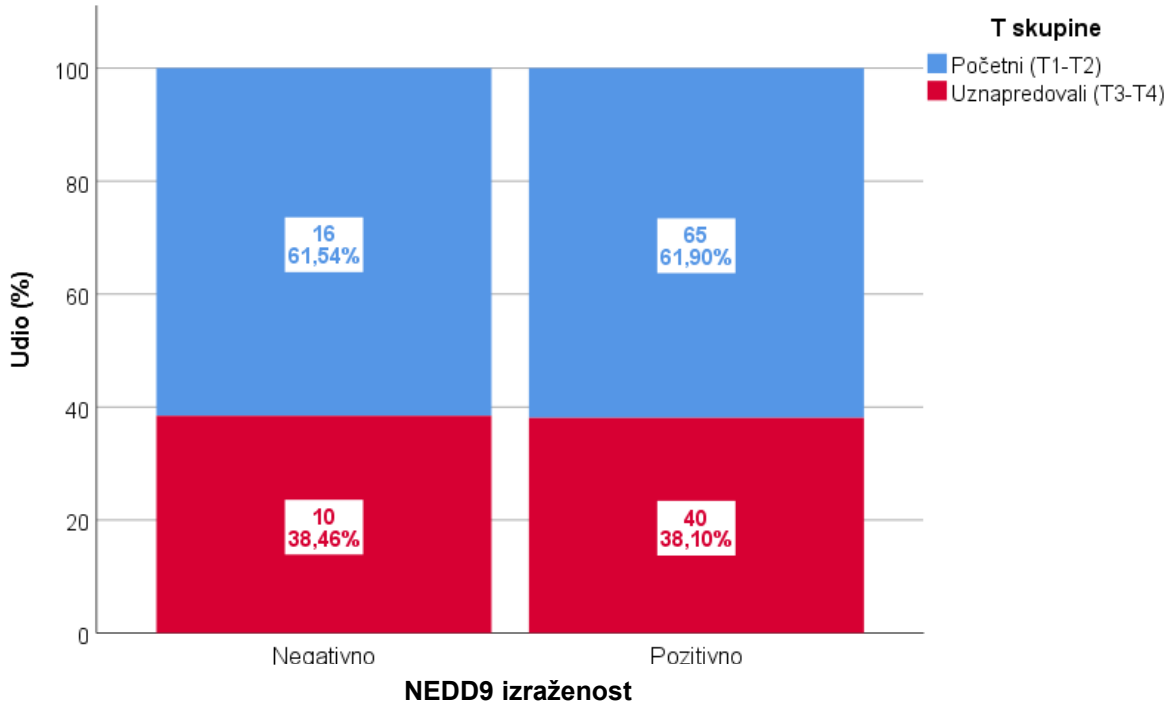


Slika 20. Odnos izraženosti NEDD9 i lokalizacije tumora

Nije bilo statistički značajnih razlika u odnosu izraženosti NEDD9 i lokalizacije tumora.

Tablica 17. Odnos izraženosti NEDD9 i veličine primarnog tumora (T): Fisher-Freeman--Haltonov egzaktni test

		NEDD9 izraženost skupine				P
		Negativno		Pozitivno		
		N	%	N	%	
T klasifikacija	1	7	26,9 %	17	16,2 %	0,554
	2	9	34,6 %	48	45,7 %	
	3	7	26,9 %	29	27,6 %	
	4	3	11,5 %	11	10,5 %	
T skupine	Početni (T1-T2)	16	61,5 %	65	61,9 %	1,000
	Uznapredovali (T3-T4)	10	38,5 %	40	38,1 %	

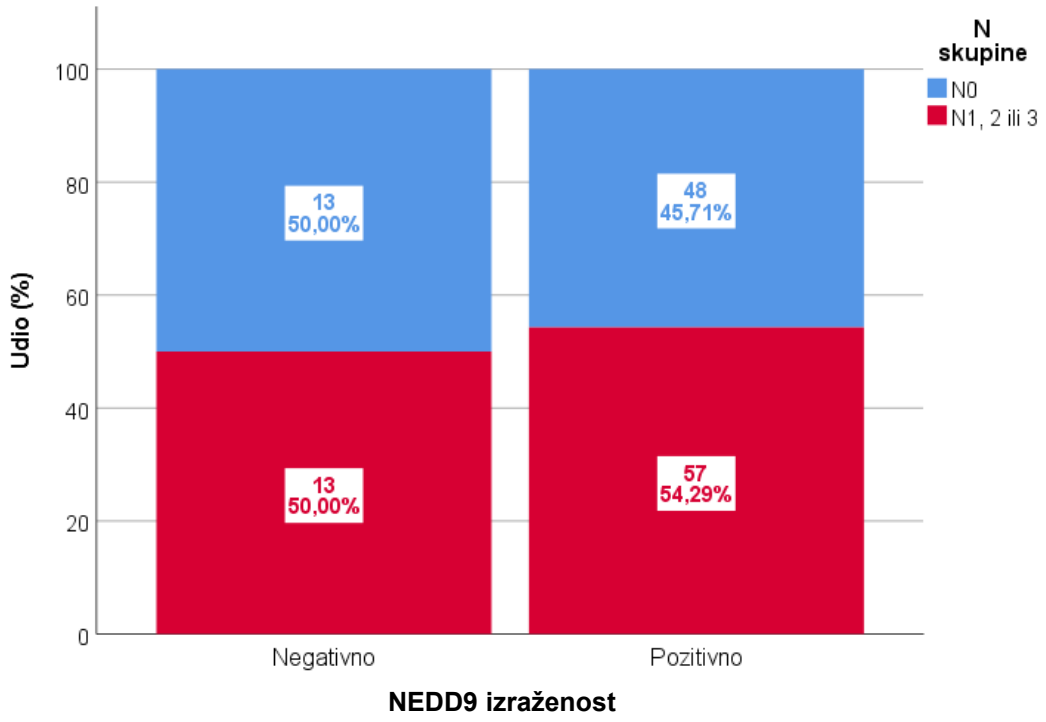


Slika 21. Odnos izraženosti NEDD9 i veličine primarnog tumora (T)

Nije bilo statistički značajnih razlika, odnosno NEDD9 izraženost bila je podjednako raspoređena obzirom na veličinu primarnog tumora (T).

Tablica 18. Odnos izraženosti NEDD9 i metastaza u limfne čvorove na vratu (N): Fisher--Freeman-Haltonov egzaktni test

		NEDD9 izraženost skupine				P
		Negativno		Pozitivno		
		N	%	N	%	
N klasifikacija	0	13	50,0 %	48	45,7 %	0,818
	1	3	11,5 %	10	9,5 %	
	2	8	30,8 %	41	39,0 %	
	3	2	7,7 %	6	5,7 %	
N skupine	N0	13	50,0 %	48	45,7 %	0,827
	N1, 2 ili 3	13	50,0 %	57	54,3 %	

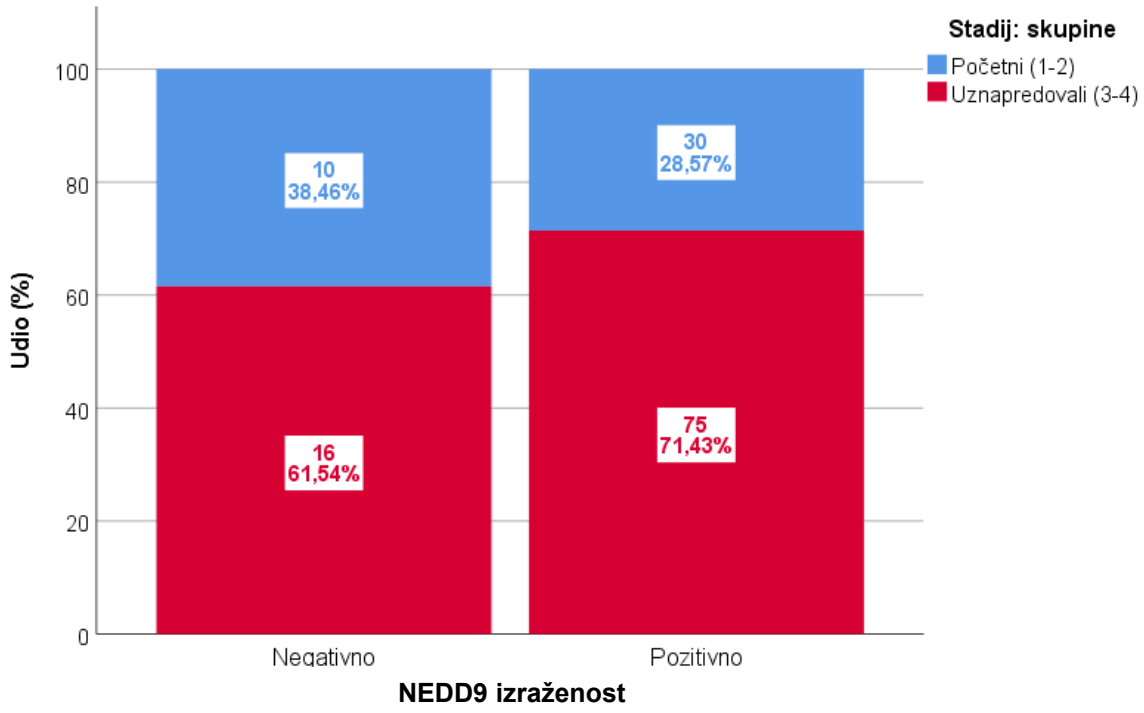


Slika 22. Odnos izraženosti NEDD9 i metastaza u limfne čvorove na vratu (N)

Nije bilo statistički značajnih razlika.

Tablica 19. Odnos izraženosti NEDD9 i kliničkog stadija bolesti (TNM): Fisher-Freeman--Haltonov egzaktni test

		NEDD9 izraženost skupine				P
		Negativno		Pozitivno		
		N	%	N	%	
Klinički stadij bolesti (TNM)	1	6	23,1 %	14	13,3 %	0,602
	2	4	15,4 %	16	15,2 %	
	3	5	19,2 %	20	19,0 %	
	4	11	42,3 %	55	52,4 %	
Klinički stadij bolesti (TNM; skupine)	Početni (1-2)	10	38,5 %	30	28,6 %	0,348
	Uznapredovali (3-4)	16	61,5 %	75	71,4 %	

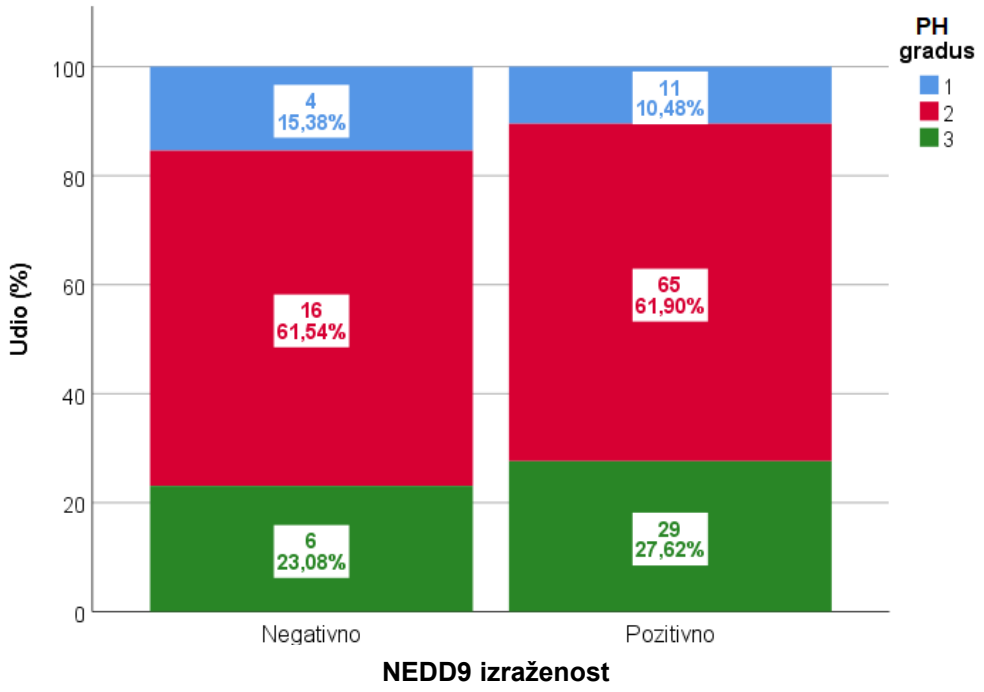


Slika 23. Odnos NEDD9 izraženosti i kliničkog stadija bolesti (TNM)

Nije bilo statistički značajnih razlika.

Tablica 20. Odnos izraženosti NEDD9 i stupnja diferenciranosti tumora (PH gradus): Fisher--Freeman-Haltonov egzaktni test

		NEDD9 izraženost skupine				P
		Negativno		Pozitivno		
		N	%	N	%	
PH gradus	1	4	15,4 %	11	10,5 %	0,685
	2	16	61,5 %	65	61,9 %	
	3	6	23,1 %	29	27,6 %	

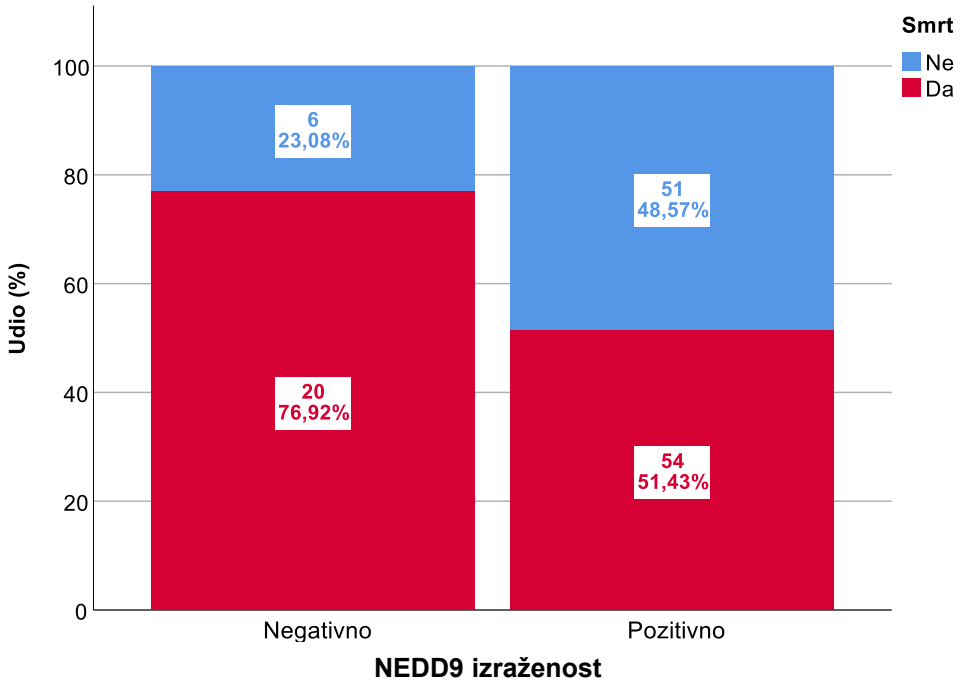


Slika 24. Odnos izraženosti NEDD9 i stupnja diferenciranosti tumora (PH gradus)

Nije bilo statistički značajnih razlika.

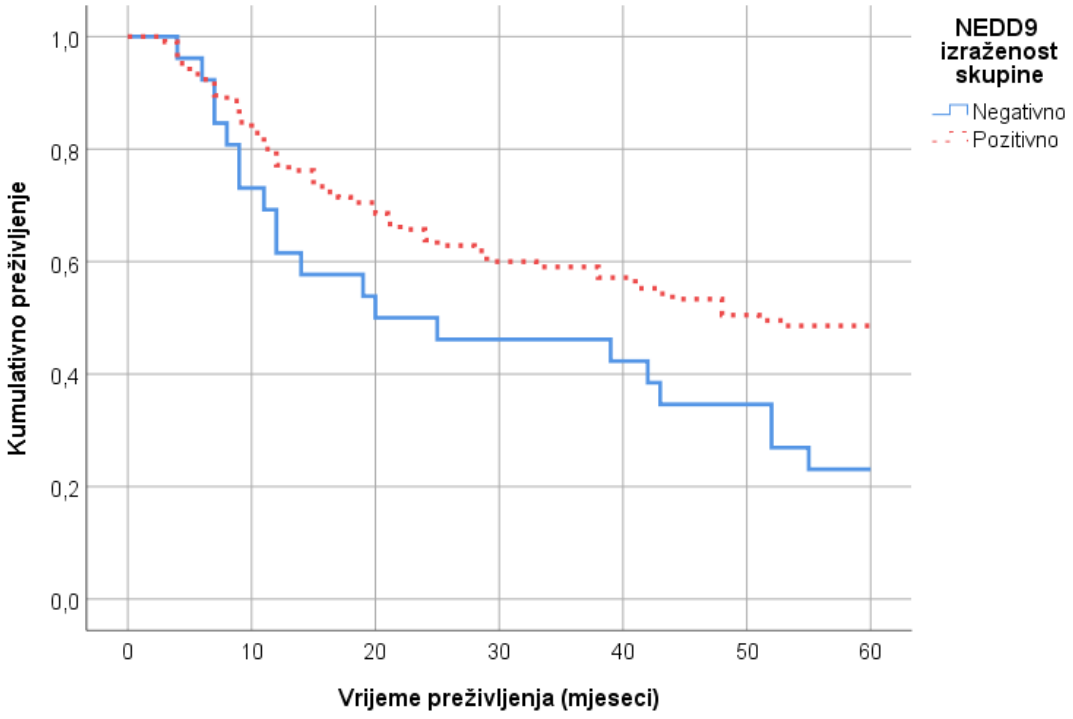
Tablica 21. Odnos izraženosti NEDD9 i mortaliteta: Fisher-Freeman-Haltonov egzaktni test

		NEDD9 izraženost skupine				P
		Negativno		Pozitivno		
		N	%	N	%	
Smrt	Ne	6	23,1 %	51	48,6 %	0,026
	Da	20	76,9 %	54	51,4 %	



Slika 25. Odnos izraženosti NEDD9 i mortaliteta

Skupina koja je imala negativnu izraženost NEDD9 imala je značajno veći mortalitet u odnosu na skupinu koja je imala pozitivnu NEDD9 izraženost: 76,9 naprema 51,4 posto, P = 0,026. Obzirom da NEDD9 izraženost nije bila značajno povezana ni sa sijelom niti veličinom tumora, N statusom, kliničkim statusom niti stupnjem diferenciranosti tumora prikazanim u prethodnim tablicama i slikama, ovaj podatak pokazuje kako je izraženost NEDD9 značajni neovisni pokazatelj mortaliteta.



Slika 26. Preživljenje ovisno o izraženosti NEDD9: Kaplan-Meierova krivulja s log-rank testom (P = 0,020)

Prosječno preživljenje (95 posto CI) za NEDD9 negativne ispitanike iznosilo je 31,0 (35,2--43,8) mjesec, dok je za NEDD9 pozitivne ispitanike iznosilo 39,5 (35,2-43,8) mjeseci, što je bilo i značajno duže (P = 0,020).

Tablica 22. Multivarijatna analiza preživljenja: Coxov regresijski model proporcionalnih opasnosti

	HR	95 % CI		P
		Donji	Gornji	
Dob (godine)	0,99	0,97	1,02	0,597
Uznapredovali klinički stadij	1,35	0,53	3,44	0,524
Pozitivan N status	1,82	0,85	3,88	0,122
Veći T stadij	1,01	0,57	1,78	0,982
Radioterapija	1,73	0,79	3,80	0,171
Kemoterapija	1,50	0,73	3,07	0,271
Sijelo tumora u hipo ili orofarniksu	1,72	0,99	2,99	0,052
NEDD9: negativna izraženost	2,10	1,23	3,58	**0,006**

Multivarijatna analiza preživljenja prikazana je u Tablici 22. Coxov regresijski model preživljenja bio je statistički značajan (hi kvadrat test = 38,04, df = 8, P < 0,001). NEDD9 negativna izraženost, kontrolirana na utjecaj drugih varijabli uključenih u model, imala je značajan omjer rizika (HR) od 2,10 (95 posto CI: 1,23-3,58, P = 0,006). Ovaj rezultat ukazuje da je utjecaj NEDD9 izraženosti na stopu preživljavanja također značajan u modelu multivarijantnog preživljavanja, a negativnu NEDD9 izraženost treba smatrati važnim neovisnim prediktorom preživljenja.

6. Rasprava

Planocelularni karcinomi glave i vrata su i u novije vrijeme bolesti s lošom prognozom unatoč unaprijeđenim kirurškim tehnikama i radioterapijskim modalitetima liječenja te novim kemoterapijskim protokolima. Ukupno preživljenje bolesnika nije se značajnije promijenilo unazad četrdesetak godina te ono i dalje iznosi niskih 50 posto (82). Djelomičan razlog tome je i skupina bolesnika koja obolijeva. To su bolesnici nižeg društvenoekonomskog statusa, lošijeg obrazovanja, rizičnog ponašanja koji puše i konzumiraju alkohol i koji često na bolest reagiraju kasno te se na prvi pregled kod liječnika javljaju tek u uznapredovalom stadiju bolesti. Nasuprot tome, u zapadnim zemljama opada broj bolesnika koji puše i piju alkohol, ali sve više dolazi do izražaja nova rizična skupina bolesnika (65). To su bolesnici mlađe životne dobi, pozitivni na infekciju humanim papiloma virusom 16 i 18, kod kojih je u porastu incidencija karcinoma glave i vrata, predominantno karcinoma orofarinksa (67).

Kirurškim ili radioterapijskim liječenjem ranih stadija karcinoma glave i vrata (stadij I i II) moguće je postići petogodišnje preživljenje u 70 do 80 posto bolesnika, dok u uznapredovalim stadijima bolesti (stadij III i IV) taj postotak pada na niskih 30 do 40 posto (16, 19). Najčešći uzroci smrti bolesnika su lokoregionalni recidivi bolesti. Od ostalih uzroka smrti izdvajaju se udaljene metastaze te pojava drugog primarnog tumora u gornjem aerodigestivnom sustavu. Proširenost tumora u trenutku postavljanja dijagnoze (TNM) i histološki stupanj diferenciranosti tumora najčešće su korišteni prognostički čimbenici (119). Nezadovoljavajući napredak u preživljenju bolesnika s karcinomima glave i vrata te agresivnost ove vrste bolesti povećava potrebu za dodatnim istraživanjima genetskih i molekularnih promjena. Bolje razumijevanje molekularne razine karcinogeneze i redefiniranje prognostičkih čimbenika te stvaranje djelotvornijih terapijskih protokola dodatno bi objasnili nastanak i biološko ponašanje ove vrste karcinoma te poboljšalo uspjeh u liječenju.

U ovoj disertaciji prikazani su rezultati provedenog istraživanja imunohistokemijske izraženosti proteina NEDD9 u bolesnika s planocelularnim karcinomima glave i vrata. Analiza započinje usporedbom uključene skupine bolesnika s dostupnim podacima iz literature. U istraživanje je bio uključen 131 bolesnik s planocelularnim karcinomima glave i vrata, od čega je bilo 128 muškaraca i tri žene. Bolesnici su liječeni na Klinici za tumore, Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice tijekom razdoblja od 2000. do 2006. godine te je vrijeme njihova praćenja bilo najmanje pet godina.

Ukupna incidencija planocelularnih karcinoma glave i vrata u Hrvatskoj iznosi oko 20/100 000 stanovnika godišnje, što je u skladu sa stopom incidencije u Središnjoj i Istočnoj Europi, Sjedinjenim Američkim Državama, Hong Kongu, Južnoj Aziji i Brazilu gdje ta brojka neznatno prelazi 20 (1). Visoka incidencija objašnjava se visokim postotkom stanovnika nižeg društvenoekonomskog statusa koji puše i konzumiraju alkohol. Statistički podaci spolne distribucije karcinoma glave i vrata u svijetu navode kako na svaku oboljelu ženu obole dva do četiri muškarca. U Hrvatskoj češće od svjetskog prosjeka obolijevaju muškarci i taj omjer iznosi 6:1 (82). Dob ispitanika uključenih u ovo istraživanje je bila od 53 do 68 godina, pri čemu je prosječna dob iznosila 62 godine života, što je u skladu s dobnom raspodjelom iz literature (82).

Udio planocelularnog karcinoma larinksa iznosio je 47,3 posto te je on razmjeran stopi incidencije u Hrvatskoj, kao i udio karcinoma orofarinksa od 23,66 posto (očekivana stopa incidencije 25 posto). Udio karcinoma hipofarinksa iznosio je 29,01 posto te je on znatno veći od udjela njegove incidencije u Hrvatskoj (11 posto). Nesrazmjer u broju bolesnika pojedinih lokalizacija posljedica je razlike u stopi incidencije, ali i udjelu bolesnika liječenih u Klinici za tumore (2).

S obzirom na vrlo slično kliničko ponašanje i preživljenje bolesnika s karcinomom orofarinksa i hipofarinksa, oni se, za potrebe statističke analize, u daljnjoj obradi grupiraju u jednu skupinu te tako dobivamo dvije skupine bolesnika, bolesnike s karcinomom orofarinksa i hipofarinksa (n 69; 52,7 posto) te bolesnike s karcinomom larinksa (n 62; 47,3 posto). Uspoređujući karakteristike karcinoma ove dvije skupine bolesnika s obzirom na veličinu primarnog tumora (T) i stadija limfnih čvorova vrata (N), one su sukladne uvriježenom kliničkom ponašanju planocelularnih karcinoma glave i vrata.

Nadalje, rezultati ovog istraživanja pokazuju kako postoji znakovita razlika s obzirom na lokalizaciju primarnog tumora, klinički stadij bolesti i metastaze u limfne čvorove vrata. Naime kod tumora sa sijelom u orofarinksu i hipofarinksu znakovito češće su bili pozitivni limfni čvorovi vrata (76,8 posto), nasuprot onih s karcinomom larinksa (27,4 posto).

Karcinomi orofarinksa i hipofarinksa isto se tako puno češće javljaju u uznapredovalim stadijima bolesti (stadij III i IV) te taj postotak iznosi visokih 82,6 posto. Kod karcinoma larinksa bolest se gotovo podjednako javlja u početnim i uznapredovalim stadijima; 45,2 posto kod početnih stadija te 54,8 posto kod uznapredovalih stadija bolesti.

Znakovita je razlika u vremenu javljanja karcinoma između dvije istraživane skupine bolesnika. Tako se karcinomi larinksa u 30 posto više slučajeva javljaju u početnim stadijima bolesti, dok se karcinomi hipofarinksa za isti postotak češće javljaju u uznapredovalim stadijima bolesti.

U istraživanoj skupini bolesnika postoji statistički značajna razlika u analizi lokalizacije i stupnja diferenciranosti tumora (histološki gradus). Tako je gradus 1 značajno zastupljeniji kod karcinoma larinksa s obzirom na gradus 3 koji je zastupljeniji kod orofarinksa i hipofarinksa.

Bolesnici početnih stadija bolesti (stadij I i II) liječeni su isključivo kirurški (24,4 posto), dok je kod 75,6 posto bolesnika provedeno i radioterapijsko liječenje, a konkomitantnu kemoterapiju je dobilo 9,2 posto bolesnika, što je u skladu s rezultatima drugih autora.

Dobivene razlike s obzirom na lokalizaciju primarnog karcinoma i metastaza u limfne čvorove vrata (N stadij), ukupan stadij bolesti (TNM) i histološki gradus tumora su očekivane te slijede uvriježeni obrazac ponašanja planocelularnih karcinoma glave i vrata.

Naime, poznato je za karcinome larinksa da već početni tumori pokazuju prve simptome bolesti kao što je promuklost pa se na taj način i objašnjava visoki udio (45,5 posto) otkrivenih početnih karcinoma larinksa (stadij I i II) u istraživanoj skupini bolesnika. S druge strane, puno veći karcinomi hipofarinksa izazivaju minimalne simptome pa to objašnjava vrlo visoki udio (82,6 posto) ovih karcinoma u uznapredovalom stadiju bolesti (stadij III i IV). Nadalje, poznato je da je sama regija hipofarinksa bogato opskrbljena limfnom drenažom pa se i vrlo rano pojavljuju metastaze u limfnim čvorovima vrata. Klinički se vrlo slično ponašaju i karcinomi orofarinksa. U našem uzorku čak je 76,8 posto bolesnika s karcinomima orofarinksa i hipofarinksa imalo metastaze u limfnim čvorovima vrata. Što se tiče histološkog gradusa tumora, karcinom larinksa ima veći postotak gradusa 1, za razliku od agresivnijih karcinoma orofarinksa i hipofarinksa koji češće imaju gradus 3.

Nakon analize obilježja karcinoma ispitivane skupine učinjena je analiza petogodišnjeg preživljenja. Ukupno petogodišnje preživljenje bolesnika u ovom istraživanju je iznosilo 43,5 posto, što je nešto niže od poznatog prosjeka preživljenja (11, 16, 33). Uzroci smrti bili su indirektno povezani s primarnom bolesti (54,0 posto) kao što su kardiovaskularni poremećaji, upala pluća te lokalni recidiv (28,4 posto) i diseminacija bolesti (17,6 posto). Zanimljiv podatak dobiven je u analizi preživljenja s obzirom na veličinu primarnog tumora (T). Iako se očekuje da bolesnici s uznapredovalim T stadijem (T3 i T4) imaju lošije

preživljenje, u našoj skupini bolesnika nije bilo značajnije razlike u preživljenju s obzirom na T stadij.

Značajna razlika u preživljenju postojala je s obzirom na metastaze u limfnim čvorovima vrata (N stadij). Skupina bolesnika bez metastaza na vratu (N0) imala je prosječno preživljenje od 47,9 mjeseci, dok je skupina s metastazama (N1, N2, N3) imala značajnije niže preživljenje s prosjekom od 28,9 mjeseci. Takav podatak u skladu je s poznatim obrascem ponašanja planocelularnih karcinoma glave i vrata (32, 33, 34). Značajna razlika pokazala se i u analizi preživljenja početnih kliničkih stadija bolesti (stadij I i II) od prosječno 48,9 mjeseci (tijekom 60 mjeseci praćenja), dok uznapredovali klinički stadiji imaju značajno lošije preživljenje s prosjekom od 32,9 mjeseci, što i odgovara podacima iz literature (34).

Ustanovljena je veza preživljenja bolesnika s obzirom na stupanj diferenciranosti tumora (histološki gradus). Najbolje preživljenje ima gradus 1 koje iznosi 52 mjeseca, nakon čega slijedi gradus 2 u kojem prosječno preživljenje iznosi 38,4 mjeseca, dok je najlošije preživljenje kod gradusa 3 i iznosi 30,3 mjeseca, što se objašnjava spoznajom kako se gradus 3 povezuje s većom agresivnošću tumora (32, 82). Tijekom prve godine praćenja bolesnika nije nađena razlika u preživljenju bolesnika s gradusom 2 i 3, odnosno ti bolesnici podjednako brzo umiru, a značajna razlika između bolesnika s gradusom 2 i 3 nastaje tek nakon godine dana praćenja ovih bolesnika.

Sveobuhvatna statistička analiza kliničkih i demografskih podataka primjenjena u ovom istraživanju pokazuje kako je odabrana skupina bolesnika, uz manja odstupanja, činila prikladan istraživani uzorak planocelularnih karcinoma glave i vrata koji se kvalitetno može usporediti s dosadašnjom literaturom.

Glavni cilj ovog istraživanja bilo je odrediti imunohistokemijsku izraženost proteina NEDD9 kao mogućeg biljega proširenosti bolesti, prvenstveno metastaziranja, odgovora na liječenje, ali i preživljenja bolesnika. NEDD9 je istraživan u mnogim karcinomima, no do danas nikada u planocelularnim karcinomima glave i vrata. Do sada je ekspresija NEDD9 određivana u malignom melanomu, glioblastomu, karcinomu dojke, karcinomu bubrega, hepatocelularnom karcinomu, karcinomu pluća, želuca, adenokarcinomu pankreasa i kolorektalnom karcinomu. Rezultati navedenih istraživanja pokazuju kako je pojačana ekspresija NEDD9 povezana s invazivnijim ponašanjem karcinoma, pojavnosti metastaza, kraćem periodu bez bolesti i lošijem ukupnom preživljenju, uznapredovalim TNM stadijem,

veličinom tumora i stupnjem diferencijacije, kao i s dubokom invazijom i invazijom u krvne žile (153-188).

U dosadašnjoj literaturi ne postoji istraživanje imunohistokemijske izraženosti proteina NEDD9 u planocelularnim karcinomima glave i vrata.

U ovom istraživanju, na temelju citoplazmatskog obojenja stanice, pozitivitet NEDD9 ekspresije određen je u četiri skupine; negativna reakcija (bez obojenja tumorskih stanica), slabo pozitivna reakcija (od jedan do deset posto tumorskih stanica ima pozitivnu reakciju), umjereno pozitivna reakcija (od 11 do 50 posto tumorskih stanica ima pozitivnu reakciju), te jako pozitivna reakcija (više od 51 posto tumorskih stanica ima pozitivnu reakciju). Također se semikvantitativnom metodom očitavao intenzitet obojenja stanice kao slab, umjeren i jak (1; 2; 3). Kao rezultat umnoška postotka pozitivnih tumorskih stanica i intenziteta obojenja dobili smo dvije skupine bolesnika. Rezultat 0; 1; 3 je uzet kao negativan, a 4; 6; 9 kao pozitivan. Pokazalo se kako je pozitivna ekspresija bila prisutna u 105 bolesnika od ukupno 131, odnosno u 80,2 posto uzorka.

Skupina bolesnika s negativnom NEDD9 ekspresijom imala je znakovito veći mortalitet u usporedbi sa skupinom koja je imala pozitivnu ekspresiju NEDD9: 76,9 posto prema 51,4 posto, P = 0,026. Kako ekspresija NEDD9 nije bila u znakovitoj korelaciji s lokalizacijom i veličinom tumora, statusom limfnih čvorova, kliničkim stadijem i PH stadijem tumora, proizlazi zaključak kako je ekspresija NEDD9 znakovit neovisni pokazatelj mortaliteta.

Prosječno preživljenje za bolesnike s negativnom NEDD9 ekspresijom je bilo 31 (35,2-43,8) mjesec, dok je za bolesnike s NEDD9 pozitivnom ekspresijom ono iznosilo 39,5 (35,2-43,8) mjeseci, što je ujedno bilo i znakovito duže (P = 0,020).

Rezultati ovog istraživanja pokazali su pozitivnu ekspresiju proteina NEDD9 u vrlo visokom postotku u planocelularnim karcinomima glave i vrata. Ekspresija NEDD9 nije bila povezana s lokalizacijom ili veličinom primarnog tumora kao ni s metastazama u limfne čvorove vrata, kliničkim stadijem bolesti ni stupnjem diferenciranosti tumora, što bi ukazivalo na to kako NEDD9 nije dobar biljeg same progresije bolesti. Ipak, kako su ustanovljene znakovite razlike s obzirom na ekspresiju NEDD9 i mortalitet bolesnika, a neovisno o prije navedenim parametrima, može se zaključiti kako je izraženost NEDD9 znakovit neovisni pretkazatelj mortaliteta. Naime, bolesnici koji su imali negativnu izraženost NEDD9 imali su

znakovito veći mortalitet. Osim toga, pozitivna ekspresija NEDD9 ukazivala je na znakovito duže preživljenje bolesnika.

Zaključno, u skupini bolesnika s planocelularnim karcinomima glave i vrata dobiveni rezultati ukazali su na to kako se protein NEDD9 ne smije shvatiti kao isključivo negativni prediktor preživljenja i prognoze.

U prilog dobivenim rezultatima u našem istraživanju posljednjih je godina objavljeno više znanstvenih radova na zloćudnim tumorima drugih sijela čiji rezultati bacaju novo svjetlo na mehanizme djelovanja NEDD9.

Istraživanja na duktalnim adenokarcinomima gušterače iznose oprečne rezultate ekspresije ovog proteina i njegove povezanosti s ishodom bolesti. Iz istraživanja Yu-Zenga i sur. vidljivo je da je pojačana ekspresija NEDD9 bila izražena kod 53,8 posto bolesnika. Autori također pokazuju korelaciju pojačane ekspresije s kliničkim stadijem bolesti, metastazama u limfnim čvorovima i histološkom diferencijacijom tumora. Ista skupina bolesnika je imala i lošije preživljenje (189). Novije istraživanje Radulovića i Kruslina (190) iz 2018. godine pokazuje kako je povišena ekspresija NEDD9 bila znakovito povećana u adenokarcinomu pankreasa (jaka ekspresija u 78,7 posto, srednja ekspresija u 21,3 posto), a smanjena u normalnom tkivu pankreasa, te, oprečno istraživanju Yu-Zenga, ne dovode pojačanu ekspresiju NEDD9 u korelaciju sa stadijem tumora, histološkim gradusom niti s preživljenjem bolesnika. Ovi rezultati ukazuju kako NEDD9 ne djeluje jednako na proces karcinogeneze kao na stanični ciklus.

Nadalje, u istraživanju o utjecaju NEDD9 u adenokarcinomu pluća Ostojić i sur. pretpostavljaju kako njegova ekspresija mora biti precizno i vremenski regulirana. U svom istraživanju ne dokazuju statistički značajnu korelaciju između povišene ekspresije NEDD9 i preživljenja u bolesnika s adenokarcinomom pluća kod kojih je učinjena transbronhalna biopsija, ali ukazuju kako jači intenzitet obojenja korelira s dužim preživljenjem što se odnosi i na nuklearni i citoplazmatski intenzitet. Također se sugerira da povećana ekspresija NEDD9 nastaje u tumorima čijem razvoju prethodi dugotrajnija premaligna lezija s objašnjenjem da bi takvim kontinuiranim procesom tumorske stanice uspjele razviti mehanizme kojima bi izbjegle staničnu smrt (192).

U prilog takvom mehanizmu obrane govore i rezultati istraživanja Pugacheve i sur. koji su pokazali kako NEDD9 ima važnu ulogu u signalnom putu stanice te kako njegova

ekspresija iznad određene razine neizbježno vodi do zaustavljanja staničnog ciklusa ili apoptoze (193).

Pallarès i sur. neočekivano dokazuju kako je NEDD9 neovisni prognostički čimbenik bolje prognoze u akutnoj mijelojičnoj leukemiji srednjeg rizika, što je suprotno s ranije dokazanom većom agresivnošću u akutnoj limfoblastičnoj leukemiji ovisnoj o BCR-ABL. Dokazuju kako je povišena ekspresija NEDD9 povezana s nižom incidencijom kumulativnog povrata bolesti te s boljim ukupnim preživljenjem i preživljenjem bez povrata bolesti (194).

Također se pokazalo kako ekspresija NEDD9 ima utjecaj na ishod terapije. Kondo i sur. u svom istraživanju pokazuju kako proteini NEDD9, BCAR1 i FAK potiču kaspaza-ovisnu degradaciju proteina o apoptozi. U ovoj studiji imaju utjecaj na proces apopoze uzrokovanom gefitinibom (172). Iz toga se može zaključiti kako povišena izraženost NEDD9 može ukazivati na bolju reakciju na kemoterapiju.

Dakle, zaključno se može navesti kako je, za razliku od do sada istraživanih karcinoma, negativna izraženost NEDD9 lošiji pokazatelj ishoda bolesti. Upitno je koliko je samo izraženost NEDD9 značajna kao prognostički biljeg, vjerojatnije je da se radi o multiuzročnoj povezanosti više biljega unutar karcinomskih stanica i ekstracelularnog matriksa, brojnoj interakciji signalih puteva među njima, kao i individualnim varijacijama bolesnika.

Kako se dijagnostika i liječenje većine ovih bolesnika temelji na standardnim odnosno jednakim protokolima, ne uzimajući individualne varijacije u psihološkom, imunološkom i čak fiziološkom funkcioniranju, a također i brojne biljege vezane uz sam karcinom, čini se kako će biti potrebna dodatna istraživanja kako bi se individualizirala terapija za svakog pojedinog bolesnika, s ciljem što većeg terapijskog uspjeha.

7. Zaključak

1. Protein NEDD9 imunohistokemijski je pozitivan u 105, odnosno 80,2 posto istraživanih bolesnika s planocelularnim karcinomima glave i vrata.
2. Izraženost proteina NEDD9 nije statistički značajno povezana s lokalizacijom primarnog tumora u orofarinksu, hipofarinksu i larinksu.
3. Izraženost proteina NEDD9 nije statistički značajno povezana s veličinom primarnog tumora (T).
4. Izraženost proteina NEDD9 nije statistički značajno povezana sa stadijem limfnih čvorova vrata (N).
5. Izraženost proteina NEDD9 nije statistički značajno povezana sa stadijem bolesti (TNM) u trenutku postavljanja dijagnoze.
6. Izraženost proteina NEDD9 nije statistički značajno povezana sa stupnjem diferenciranosti tumora (histološki gradus).
7. Skupina bolesnika s negativnom izraženosti proteina NEDD9 imala je znakovito veći mortalitet u usporedbi sa skupinom koja je imala pozitivnu izraženost proteina NEDD9 te to ukazuje na činjenicu kako je izraženost proteina NEDD9 znakovit neovisni pokazatelj mortaliteta.
8. Prosječno preživljenje za bolesnike s negativnom izraženosti proteina NEDD9 bilo je znakovito kraće nego kod bolesnika s pozitivnom izraženosti proteina NEDD9. Nadalje, negativnu izraženost proteina NEDD9 treba smatrati važnim neovisnim prediktorom preživljenja.

8. Kratki sadržaj na hrvatskom jeziku

Planocelularni karcinomi glave i vrata po učestalosti su peti najčešći karcinomi u svijetu te su povezani s pušenjem, konzumacijom alkohola i HPV virusima. Dijagnoza se često postavlja u uznapredovalom stadiju bolesti, a petogodišnje preživljenje iznosi oko 50 posto. Osim ranog prepoznavanja prekanceroznih lezija i istraživanja kojima bi se postigao napredak u liječenju, nužno je pronaći nove dijagnostičke i prognostičke biljege.

Pozitivna izraženost proteina NEDD9 prepoznata je kao prognostički nepovoljan čimbenik u karcinomima dojke, pluća, želuca, debelog crijeva, jetre, bubrega, jajnika, glioblastoma te malignog melanoma.

U ovom istraživanju po prvi put je analizirana imunohistokemijska izraženost NEDD9 u planocelularnim karcinomima orofarinksa, hipofarinksa i larinksa. Pozitivna izraženost NEDD9 bila je prisutna u 105 od ukupno 131 bolesnika (95 posto). Nije dokazana povezanost izraženosti NEDD9 s lokalizacijom i patohistološkim gradusom primarnog tumora ni ukupnim stadijem bolesti (TNM). Skupina bolesnika koja je imala negativnu izraženost NEDD9 imala je značajno veći mortalitet, što pokazuje kako je NEDD9 značajni neovisni pokazatelj mortaliteta u bolesnika s planocelularnim karcinomima glave i vrata. Prosječno preživljenje za bolesnike s negativnom izraženosti NEDD9 je bilo kraće, što NEDD9 čini važnim neovisnim prediktorom preživljenja.

Istraživanjem nije potvrđena hipoteza da je povećana izraženost proteina NEDD9 u bolesnika s planocelularnim karcinomima glave i vrata pokazatelj lošijeg preživljenja.

Ključne riječi: NEDD9, planocelularni karcinomi, preživljenje.

9. Kratki sadržaj na engleskom jeziku

Prognostic significance of immunohistochemical expression of NEDD9 protein in patients with head and neck squamous cell carcinoma

Iva Ledinsky Opačić, 2020

Head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) are the fifth most common cancer worldwide. Smoking, alcohol consumption and HPV viruses are important risk factors. Frequently, they are diagnosed in advanced stages where overall 5-year survival rate is around 50%. Apart from early recognition of the precancerous lesion and investigations of new therapeutical modalities, there is a need to find new diagnostic and prognostic markers.

Expression of protein NEDD9 has been recognized as a negative prognostic indicator in breast, lung, gastric, colorectal, hepatocellular, kidney and ovarian cancer, glioblastoma and malignant melanoma.

In this study the expression of NEDD9 immunohistochemicaly is analyzed for the first time in HNSCC of oropharynx, hypopharynx and larynx. Positive NEDD9 expression was evident in 105 of 131 included patients (80.2%). NEDD9 expression did not show significant difference according to tumour location, stage of disease (TNM) and PH grade. A group of patients with negative NEDD9 had significantly higher mortality, indicating that NEDD9 is a significant independent mortality predictor. Average survival for patients with negative NEDD9 expression was shorter, making NEDD9 an important independent predictor of survival.

The hypothesis that the positive NEDD9 expression in patients with HNSCC is indicator of the poorer survival was not confirmed.

Key words: NEDD9, squamous cell carcinomas, survival.

10. Popis literature

1. Ferreira MB, De Souza JA, Cohen EE. Role of molecular markers in the management of head and neck cancers. Curr Opin Oncol. 2011;23:259-64.

2. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Registar za rak. Incidencija raka u Hrvatskoj 2008. Bilten br. 33. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo. 2008, str.18-21.

3. Sturgis EM, Wei Q. Genetic susceptibility-molecular epidemiology of head and neck cancer. Curr Opin Oncol. 2002;14:310-7.

4. Michmerhuizen NL, Birkeland AC, Bradford CR, Brenner JC. Genetic determinants in head and neck squamous cell carcinoma and their influence on global personalized medicine. Genes Cancer. 2016;7:182-200.

5. Gingerich MA, Smith JD, Michmerhuizen NL, Ludwig M, Devenport S, Matovina C i sur. Comprehensive review of genetic factors contributing to head and neck squamous cell carcinoma development in low-risk, nontraditional patients. Head Neck. 2018;40:943-954.

6. Jethwa AR, Khariwala SS. Tobacco-related carcinogenesis in head and neck cancer. Cancer Metastasis Rev. 2017;36:411-423.

7. Krishnan AR, Zheng H, Kwok JG, Qu Y, Zou AE, Korrapati A i sur. A comprehensive study of smoking-specific microRNA alterations in head and neck squamous cell carcinoma. Oral Oncol. 2017;72:56-64.

8. Farsi NJ, Rousseau MC, Schlecht N, Castonguay G, Allison P, Nguyen-Tan PF i sur. Aetiological heterogeneity of head and neck squamous cell carcinomas: the role of human papillomavirus infections, smoking and alcohol. Carcinogenesis. 2017;38:1188-95.

9. Ragin CC, Modugno F, Gollin SM. The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus. J Dent Res. 2007;86:104-14.

10. Sano D, Oridate N. The molecular mechanism of human papillomavirus-induced carcinogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. Int J Clin Oncol. 2016;21:819-26.

11. Chaturvedi AK, Anderson WF, Lortet-Tieulent J, Curado MP, Ferlay J, Franceschi S i sur. Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. J Clin Oncol. 2013;31:4550-9.

12. Chaukar DA, Walvekar RR, Das AK, Deshpande MS, Pai PS, Chaturvedi P i sur. Quality of life in head and neck cancer survivors: a cross-sectional survey. Am J Otolaryngol. 2009;30:176-80.

13. Morton RP. Studies in the quality of life of head and neck cancer patients: results of a two-year longitudinal study and a comparative cross-sectional cross-cultural survey. Laryngoscope. 2003;113:1091-103.

14. De Boer MF, McCormick LK, Pruyn JF, Ryckman RM, van den Borne BW. Physical and psychosocial correlates of head and neck cancer: a review of the literature. Otolaryngol Head Neck Surg. 1999;120:427-36.

15. Holloway RL, Hellewell JL, Marbella AM, Layde PM, Myers KB, Campbell BH. Psychosocial effects in long-term head and neck cancer survivors. Head Neck. 2005;27:281-8.

16. Forastiere AA, Ang KK, Brizel D, Brockstein BE, Burtness BA, Cmelak AJ i sur. Head and neck cancers. J Natl Compr Canc Netw. 2008;6:646-95.

17. Forastiere AA. Chemotherapy in the treatment of locally advanced head and neck cancer. J Surg Oncol. 2008;97:701-7.

18. Bernier J. A multidisciplinary approach to squamous cell carcinomas of the head and neck: an update. Curr Opin Oncol. 2008;20:249-55.

19. Kiong KL, de Souza NN, Sultana R, Iyer NG. Meta-analysis of induction chemotherapy as selection marker for chemoradiation in the head and neck. Laryngoscope. 2017.

20. Economopoulou P, Kotsantis I, Psyrri A. The promise of immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma: combinatorial immunotherapy approaches. ESMO Open. 2017;1(6):e000122.

21. Kozakiewicz P, Grzybowska-Szatkowska L. Application of molecular targeted therapies in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma. Oncol Lett. 2018;15:7497-505.

22. Santuray RT, Johnson DE, Grandis JR. New Therapies in Head and Neck Cancer. Trends Cancer. 2018;4:385-96.

23. Schwartz LH, Ozsahin M, Zhang GN, Touboul E, De Vataire F, Andolenko P i sur. Synchronous and metachronous head and neck carcinomas. Cancer. 1994;74:1933-8.

24. Shah JP, Patel SG, Singh B. Jatin Shah´s head and neck surgery and oncology, 4th edition. 2012;290-355.

25. Alberta Health Services. Clinical practice guideline HN-004.Version 1. Oropharyngeal cancer treatment. Datum stupanja na snagu: veljača 2019. Dostupno na: https://www.albertahealthservices.ca/assets/info/hp/cancer/if-hp-cancer-guide-hn004-oropharyngeal.pdf.

26. Hypopharyngeal Cancer Treatment (Adult) (PDQ®). Health Professional Version. PDQ Adult Treatment Editorial Board. Objavljeno online: 7. veljače 2018. Dostupno na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65756/.

27. BNJ Best Practice. Laryngeal cancer. Veljača 2019. (pristupljeno u veljači 2019). Dostupno na: https://bestpractice.bmj.com/topics/en-gb/1115.

28. Cancer.Net. Doctor-Approved Patient Information from ASCO. Laryngeal and hypopharyngeal cancer: statistics. Approved by the Cancer.Net Editorial Board, 01/2020. Dostupno na: https://www.cancer.net/cancer-types/laryngeal-and-hypopharyngeal-cancer/statistics.

29. Zhang ZF, Morgenstern H, Spitz MR, Tashkin DP, Yu GP, Marshall JR i sur. Marijuana use and increased risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1999;8:1071-8.

30. Hashibe M, Morgenstern H, Cui Y, Tashkin DP, Zhang ZF, Cozen W i sur. Marijuana use and the risk of lung and upper aerodigestive tract cancers: results of a population-based case--control study. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2006;15:1829-34.

31. Li X, Gao L, Li H, Gao J, Yang Y, Zhou F i sur. Human papillomavirus infection and laryngeal cancer risk: a systematic review and meta-analysis. J Infect Dis. 2013;207:479-88.

32. Global Burden of Disease Cancer Collaboration: Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability--Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. JAMA Oncol. 2017;3:524-48.

33. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. CA Cancer J Clin. 2017;67:7-30.

34. Gatta G, Botta L, Sánchez MJ, Anderson LA, Pierannunzio D, Licitra L i sur. Prognoses and improvement for head and neck cancers diagnosed in Europe in early 2000s: The EUROCARE-5 population-based study. Eur J Cancer. 2015;51:2130-43.

35. Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. Int J Cancer. 2013 Mar;132:1133-45.

36. Lambert R, Sauvaget C, de Camargo Cancela M, Sankaranarayanan R. Epidemiology of cancer from the oral cavity and oropharynx. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2011 Aug;23:633--41.

37. DeSantis C, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics for African Americans, 2013. Cancer JClin. 2013 May;63:151-66.

38. Ragin CC, Modugno F, Gollin SM. The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus. J Dent Res. 2007 Feb;86:104-14.

39. Joseph AW, D'Souza G. Epidemiology of human papillomavirus-related head and neck cancer. Otolaryngol Clin North Am. 2012 Aug;45:739-64.

40. Michaud DS, Langevin SM, Eliot M, Nelson HH, Pawlita M, McClean MD i sur. High-risk HPV types and head and neck cancer. Int J Cancer. 2014;135:1653-61.

41. Chai RC, Lambie D, Verma M, Punyadeera C. Current trends in the etiology and diagnosis of HPV-related head and neck cancers. Cancer Med. 2015;4:596-607.

42. Chor JS, Vlantis AC, Chow TL, Fung SC, Ng FY, Lau CH i sur. The role of human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma: A case control study on a southern Chinese population. J Med Virol. 2016;88:877-87.

43. Nygård M1, Aagnes B, Bray F, Møller B, Mork J. Population-based evidence of increased survival in human papillomavirus-related head and neck cancer. Eur J Cancer. 2012 Jun;48:1341-6.

44. Settle K, Posner MR, Schumaker LM, Tan M, Suntharalingam M, Goloubeva O i sur. Racial survival disparity in head and neck cancer results from low prevalence of human papillomavirus infection in black oropharyngeal cancer patients. Cancer Prev Res (Phila). 2009;2:776-81.

45. León X, López M, García J, Montserrat JR, Gras JR, Kolanczak KA i sur. Epidemiologic characteristics of squamous head and neck carcinoma patients. Results of a hospital register. Acta Otorrinolaringol Esp. 2018 Aug 4. pii: S0001-6519(18)30121-3.

46. León X, Quer M, Diez S, Orús C, López-Pousa A, Burgués J. Second neoplasm in patients with head and neck cancer. Head Neck. 1999;21:204-10.

47. Strojan P, Corry J, Eisbruch A, Vermorken JB, Mendenhall WM, Lee AW i sur. Recurrent and second primary squamous cell carcinoma of the head and neck: when and how to reirradiate. Head Neck. 2015 Jan;37:134-50.

48. Wyss A, Hashibe M, Chuang SC, Lee YC, Zhang ZF, Yu GP i sur. Cigarette, cigar, and pipe smoking and the risk of head and neck cancers: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. Am J Epidemiol. 2013;178:679-90.

49. Hoffmann D, Hoffmann I, El-Bayoumy K. The less harmful cigarette: a controversial issue. Chem Res Toxicol. 2001;14:767-90.

50. Proia NK, Paszkiewicz GM, Nasca MA, Franke GE, Pauly JL. Smoking and smokeless tobacco-associated human buccal cell mutations and their association with oral cancer – a review. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2006;15:1061-77.

51. Lewin F, Norell SE, Johansson H, Gustavsson P, Wennerberg J, Biörklund A i sur. Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck: a population-based case-referent study in Sweden. Cancer. 1998;82:1367-75.

52. Andre K, Schraub S, Mercier M, Bontemps P. Role of alcohol and tobacco in the aetiology of head and neck cancer: a case-control study in the Doubs region of France. Eur J Cancer B Oral Oncol. 1995;B:301-9.

53. Wyss AB, Hashibe M, Lee YA, Chuang SC, Muscat J, Chen C i sur. Smokeless Tobacco Use and the Risk of Head and Neck Cancer: Pooled Analysis of US Studies in the INHANCE Consortium. Am J Epidemiol. 2016;184:703-16.

54. Wyss A, Hashibe M, Chuang SC, Lee YC, Zhang ZF, Yu GP i sur. Cigarette, cigar, and pipe smoking and the risk of head and neck cancers: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. Am J Epidemiol. 2013;178:679-90.

55. Tan EH, Adelstein DJ, Droughton ML, Van Kirk MA, Lavertu P. Squamous cell head and neck cancer in nonsmokers. Am J Clin Oncol. 1997;20:146-50.

56. Hashibe M, Morgenstern H, Cui Y, Tashkin DP, Zhang ZF, Cozen W i sur. Marijuana use and the risk of lung and upper aerodigestive tract cancers: results of a population-based case--control study. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2006;10:1829-34.

57. Aldington S, Harwood M, Cox B, Weatherall M, Beckert L, Hansell A i sur. Cannabis and Respiratory Disease Research Group. Cannabis use and cancer of the head and neck: case--control study. Otolaryngol Head Neck Surg. 2008;138:374-80.

58. La Vecchia C, Franceschi S, Favero A, Talamini R, Negri E. Alcohol intake and cancer of the upper Digestive tract. Pattern of risk in Italy is different from that in Denmark. BMJ. 1999;318:1289-90.

59. Kato I, Nomura AM. Alcohol in the aetiology of upper aerodigestive tract cancer. Eur J Cancer B Oral Oncol. 1994;30B:75-81.

60. De Stefani E, Boffetta P, Oreggia F, Fierro L, Mendilaharsu M. Hard liquor drinking is associated with higher risk of cancer of the oral cavity and pharynx than wine drinking. A case-control study in Uruguay. Oral Oncol. 1998;34:99-104.

61. Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP i sur. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. J Natl Cancer Inst. 2007;99:777-89.

62. Murata M, Takayama K, Choi BC, Pak AW. A nested case-control study on alcohol drinking, tobacco smoking, and cancer. Cancer Detect Prev. 1996;20:557-65.

63. Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, Boccia S, Castellsague X, Chen C i sur. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2009;18:541-50.

64. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. World Health Organization Classification of Tumours. IARC Press, Lyon. 2005.

65. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. Nat Rev Cancer. 2011;11:9-22.

66. Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. Lancet Oncol. 2010;11:781-9.

67. O'Sullivan B, Huang SH, Su J, Garden AS, Sturgis EM, Dahlstrom K i sur. Development and validation of a staging system for HPV-related oropharyngeal cancer by the International Collaboration on Oropharyngeal cancer Network for Staging (ICON-S): a multicentre cohort study. Lancet Oncol. 2016;17:440-51.

68. Chaturvedi AK, Anderson WF, Lortet-Tieulent J, Curado MP, Ferlay J, Franceschi S i sur. Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. J Clin Oncol. 2013;31:4550-9.

69. Goldenberg D, Begum S, Westra WH, Khan Z, Sciubba J, Pai SI i sur. Cystic lymph node metastasis in patients with head and neck cancer: an HPV-associated phenomenon. Head Neck. 2008;30:898-903.

70. Klussmann JP, Mooren JJ, Lehnen M, Claessen SMH, Stenner M, Huebbers CU i sur. Genetic signatures of HPV-related and unrelated oropharyngeal carcinoma and their prognostic implications. Clin Cancer Res. 2009;15:1779-86.

71. Mehanna H, Jones TM, Gregoire V, Ang KK. Oropharyngeal carcinoma related to human papillomavirus. BMJ. 2010;340:879-80.

72. Ndiaye C, Mena M, Alemany L, Arbyn M, CastellsaguéX, Laporte L i sur. HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis. Lancet Oncol. 2014;15:1319-31.

73. Patel P, Hanson DL, Sullivan PS, Novak RM, Moorman AC, Tong TC i sur. Adult and Adolescent Spectrum of Disease Project and HIV Outpatient Study Investigators. Incidence of types of cancer among HIV-infected persons compared with the general population in the United States, 1992-2003. Ann Intern Med. 2008;148:728-36.

74. Deeken JF, Tjen-A-Looi A, Rudek MA, Okuliar C, Young M, Little RF i sur. The rising challenge of non-AIDS-defining cancers in HIV-infected patients. Clin Infect Dis. 2012;55:1228-35.

75. Siegfried JM, Stabile LP. Estrongenic steroid hormones in lung cancer. Semin Oncol. 2014 Feb;41(1):5-16. doi: 10.1053/j.seminoncol.2013.12.009. Epub 2013 Dec 12.

76. Fucic A, Gamulin M, Ferencic Z, Katic J, Krayer von Krauss M, Bartonova A i sur. Environmental exposure to xenoestrogens and oestrogen related cancers: reproductive system, breast, lung, kidney, pancreas, and brain. Environ Health. 2012 Jun 28;11 Suppl 1:S8. doi: 10.1186/1476-069X-11-S1-S8.

77. Egloff AM, Rothstein ME, Seethala R, Siegfried JM, Grandis JR, Stabile LP. Cross-talk between estrogen receptor and epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res. 2009 Nov 1;15(21):6529-40. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0862. Epub 2009 Oct 13.

78. Yoo HJ, Sepkovic DW, Bradlow HL, Yu GP, Sirilian HV, Schantz SP. Estrogen metabolism as a risk factor for head and neck cancer. Otolaryngol Head Neck Surg. 2001 Mar;124(3):241-7.

79. Singh HP, Kumar P, Goel R, Kumar A. Sex hormones in head and neck cancer: Current knowledge and perspectives. Clin Cancer Invest J. 2012; 1(1): 2-5.

80. Etique N, Chardard D, Chesnel A, Merlin JL, Flament S, Grillier-Vuissoz I. Ethanol stimulates proliferation, ERalpha and aromatase expression in MCF-7 human breast cancer cells. Int J Mol Med. 2004 Jan;13(1):149-55.

81. Purohit V. Can alcohol promote aromatization of androgens to estrogens? A review. Alcohol. 2000 Nov;22(3):123-7.

82. Gršić K. Imunohistokemijska izraženost estrogenskih receptora beta u planocelularnim karcinomima glave i vrata. Disertacija, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. 2016.

83. Edefonti V, Hashibe M, Parpinel M, Turati F, Serraino D, Matsuo K i sur. Natural vitamin C intake and the risk of head and neck cancer: A pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. Int J Cancer. 2015 Jul 15;137(2):448-62.

84. Maasland DH, Schouten LJ, Kremer B, van den Brandt PA. Toenail selenium status and risk of subtypes of head-neck cancer: The Netherlands Cohort Study. Eur J Cancer. 2016 Jun; 60:83-92. doi: 10.1016/j.ejca.2016.03.003.

85. Maasland DH, van den Brandt PA, Kremer B, Goldbohm RA, Schouten LJ. Consumption of vegetables and fruits and risk of subtypes of head-neck cancer in the Netherlands Cohort Study. Int J Cancer. 2015 Mar 1;136(5):E396-409.

86. Nour A, Joury E, Naja F, Hatahet W, Almanadili A. Diet and the risk of head and neck squamous cell carcinomas in a Syrian population: a case-control study. East Mediterr Health J. 2015 Oct 2; 21(9):629-34.

87. Sapkota A, Hsu CC, Zaridze D, Shangina O, Szeszenia-Dabrowska N, Mates D i sur. Dietary risk factors for squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract in central and eastern Europe. Cancer Causes Control. 2008 Dec; 19(10):1161-70. doi: 10.1007/s10552-008-9183-0.

88. Peters ES, Luckett BG, Applebaum KM, Marsit CJ, McClean MD, Kelsey KT. Dairy products, leanness, and head and neck squamous cell carcinoma. Head Neck. 2008 Sep; 30(9):1193-205. doi: 10.1002/hed.20846.

89. Zhang W, Geng T, Han W, Dou H. Tea intake and risk of oral, pharyngeal, and laryngeal carcinoma: a meta-analysis. Med Sci Monit. 2014 Nov 3; 20:2142-50.

90. Guercio V, Turati F, La Vecchia C, Galeone C, Tavani A. Allium vegetables and upper aerodigestive tract cancers: a meta-analysis of observational studies. Mol Nutr Food Res. 2016 Jan;60(1):212-22. doi: 10.1002/mnfr.201500587.

91. Vlastarakos PV, Vassileiou A, Delicha E, Kikidis D, Protopapas D, Nikolopoulos TP. Dietary consumption patterns and laryngeal cancer risk. Ear Nose Throat J. 2016 Jun;95(6):E32-8.

92. Perloy A, Maasland DHE, van den Brandt PA, Kremer B, Schouten LJ. Intake of meat and fish and risk of head-neck cancer subtypes in the Netherlands Cohort Study. Cancer Causes Control. 2017 Jun;28(6):647-656. doi: 10.1007/s10552-017-0892-0.

93. Tarvainen L, Suojanen J, Kyyronen P, Lindqvist C, Martinsen JI, Kjaerheim K i sur. Occupational Risk for Oral Cancer in Nordic Countries. Anticancer Res. 2017 Jun;37(6):3221-8.

94. Bakhtiari S, Mortazavi H, Mehdipour M, Jafarian N, Ranjbari N, Rahmani S. Frequency of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas and Related Variables in Southern Iran (Ahvaz City): 10-Year Retrospective Study. Asian Pac J Cancer Prev. 2017 Feb 1;18(2):375-9.

95. Seijas-Tamayo R, Fernández-Mateos J, Adansa Klain JC, Mesía R, Pastor Borgoñón M, Pérez-Ruiz E i sur. Epidemiological characteristics of a Spanish cohort of patients diagnosed with squamous cell carcinoma of head and neck: distribution of risk factors by tumor location. Clin Transl Oncol. 2016 Nov;18(11):1114-22.

96. Carton M, Barul C, Menvielle G, Cyr D, Sanchez M, Pilorget C i sur. Occupational exposure to solvents and risk of head and neck cancer in women: a population-based case--control study in France. BMJ Open. 2017 Jan 9;7(1):e012833. doi: 10.1136/bmjopen-2016-012833.

97. Koh DH, Chung EK, Jang JK, Lee HE, Ryu HW, Yoo KM i sur. Cancer incidence and mortality among temporary maintenance workers in a refinery/petrochemical complex in Korea. Int J Occup Environ Health. 2014 Apr-Jun;20(2):141-5.

98. Carton M, Guida F, Paget-Bailly S, Cyr D, Radoi L, Sanchez M i sur. Occupation and head and neck cancer in women-Results of the ICARE study. Am J Ind Med. 2014 Dec; 57(12):1386-97.

99. Reijula J, Kjaerheim K, Lynge E, Martinsen JI, Reijula K, Sparén P i sur. Cancer incidence among waiters: 45 years of follow-up in five Nordic countries. Scand J Public Health. 2015 Mar;43(2):204-11. 100. Boffetta P, Hayes RB, Sartori S, Lee YC, Muscat J, Olshan A i sur. Mouthwash use and cancer of the head and neck: a pooled analysis from the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. Eur J Cancer Prev. 2016;25:344-8.

101. Tang L, Hu H, Liu H, Jian C, Wang H, Huang J. Association of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and aspirin use and the risk of head and neck cancers: a meta-analysis of observational studies. Oncotarget. 2016 Oct 4;7(40):65196-65207. doi: 10.18632/oncotarget.11239.

102. Papagerakis S, Bellile E, Peterson LA, Pliakas M, Balaskas K, Selman S i sur. Proton pump inhibitors and histamine 2 blockers are associated with improved overall survival in patients with head and neck squamous carcinoma. Cancer Prev Res (Phila). 2014 Dec; 7(12):1258-69.

103. Hashim D, Sartori S, Vecchia C, Serraino D, Maso LD, Negri E i sur. Hormone factors play a favorable role in female head and neck cancer risk. Cancer Med. 2017 Aug; 6(8):1998-2007. doi: 10.1002/cam4.11.

104. Rosenberg PS, Alter BP, Ebell W. Cancer risks in Fanconi anemia: findings from the German Fanconi Anemia Registry. Haematologica. 2008;93:511-7.

105. Birkeland AC, Auerbach AD, Sanborn E, Parashar B, Kuhel WI, Chandrasekharappa SC i sur. Postoperative clinical radiosensitivity in patients with Fanconi anemia and head and neck squamous cell carcinoma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2011;137:930-4.

106. van Monsjou HS, Wreesmann VB, van den Brekel MW, Balm AJ. Head and neck squamous cell carcinoma in young patients. Oral Oncol. 2013;49(12):1097-102.

107. Bryere J, Menvielle G, Dejardin O, Launay L, Molinie F, Stucker I i sur. ICARE group. Neighborhood deprivation and risk of head and neck cancer: a multilevel analysis from France. Oral Oncol. 2017;71:144-9.

108. Konski A, Berkey BA, Kian Ang K, Fu KK. Effect of education level on outcome of patients treated on Radiation Therapy Oncology Group Protocol 90-03. Cancer. 2003;98(7):1497-503.

109. Menvielle G, Luce D, Goldberg P, Leclerc A. Smoking, alcohol drinking, occupational exposure and social inequalities in hypopharyngeal and laryngeal cancer. Int J Epidemiol. 2004;(33/4):799-806.

110. Pinar T, Akdur R, Tuncbilek A, Altundag K, Cengiz M. The relationship between occupations and head and neck cancers. J Natl Med Assoc. 2007;99(1):68-71.

111. Johnson S, Corsten MJ, McDonald JT, Gupta M. Cancer prevalence and education by cancer site: logistic regression analysis. J Otolaryngol Head Neck Surg. 2010;39(5):555-60.

112. Chen AY, DeSantis C, Jemal A. US mortality rates for oral cavity and pharyngeal cancer by educational attainment. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2011;137(11):1094-9.

113. Santi A, Simard EP, Xu J, Ma J, Anderson RN. Selected cancers with increasing mortality rates by educational attainment in 26 states in the United States, 1993-2007. Cancer CUASES Control. 2013;24(3):559-65.

114. Olsen MH, Bøje CR, Kjaer TK, Steding-Jessen M, Johansen C, Overgaard J i sur. Socioeconomic position and stage at diagnosis of head and neck cancer-a nationwide study from DAHANCA. Acta Oncol. 2015;54(5):759-66.

115. Hagedoorn P, Vandenheede H, Vanthomme K, Willaert D, Gadeyne S. Cohort study into head and neck cancer mortality in Belgium (2001-2011): are individual socioeconomic differences conditional on area deprivation? Oral Oncol. 2016;61:76-82.

116. Baishya N, Das AK, Krishnatreya M, Das A, Das K, Kataki AC i sur. A pilot study on factors associated with presentation delay in patients affected with head and neck cancers. Asian Pac J Cancer Prev. 2015;16(11):4715-8.

117. Shin JY, Yoon JK, Shin AK, Blumenfeld P, Mai M, Diaz AZ. Association of insurance and community-level socioeconomic status with treatment and outcome of squamous cell carcinoma of the pharynx. JAMA Otolaryngol Head Neck Surg. 2017;143(9):899-907.

118. Santi I, Kroll LE, Dietz A, Becher H, Ramroth H. To what degree is the association between educational inequality and laryngeal cancer explained by smoking, alcohol consumption and occupational exposure? Scand J Work Environ health. 2014;40(3):315-22.

119. Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. Scand J Dent Res. 1987;95:229-49.

120. Jakobsson PÅ, Eneroth CM, Killander D, Moberger G, Mårtensson B. Histologic Classification and Grading of Malignancy in Carcinoma of the Larynx. Acta Radiol Ther Phys Biol. 1973;Feb;12(1):1-8.

121. Kuno H, Onaya H, Fujii S, Ojiri H, Otani K, Satake M. Primary staging of laryngeal and hypopharyngeal cancer: CT, MR imaging and dual-energy CT. Eur J Radiol. 2014;83:23-35.

122. Sakata K, Hareyama M, Tamakawa M, Oouchi A, Sido M, Nagakura H i sur. Prognostic factors of nasopharynx tumors investigated by MR imaging and the value of MR imaging in the newly published TNM staging. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1999;43:273-8.

123. Rasch C, Keus R, Pameijer FA, Koops W, de Ru V, Muller S i sur. The potential impact of CT-MRI matching on tumor volume delineation in advanced head and neck cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1997;39:841-8.

124. King AD, Yu KH, Mo FK, Law BK, Yuen TW, Bhatia KS i sur. Cervical nodal metastases from head and neck squamous cell carcinoma: MRI criteria for treatment assessment. Head Neck. 2016; 38 Suppl 1:E1598-604.

125. Anzai Y, Brunberg JA, Lufkin RB. Imaging of nodal metastases in the head and neck. J Magn Reson Imaging. 1997;7:774-83.

126. Brouwer J, de Bree R, Hoekstra OS, Golding RP, Langendijk JA, Castelijns JA i sur. Screening for distant metastases in patients with head and neck cancer: is chest computed tomography sufficient? Laryngoscope. 2005;115:1813-27.

127. Brouwer J, Senft A, de Bree R, Comans EF, Golding RP, Castelijns JA i sur. Screening for distant metastases in patients with head and neck cancer: is there a role for (18)FDG-PET? Oral Oncol. 2006; 42:275-80.

128. Dostupno na: http://www.swscn.org.uk/wp/wpcontent/uploads /2014 /08/TNM8_chang-es.pdf.

129. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene F, Trotti A, ur. AJCC Cancer Staging Manual. 7th ed. Springer, New York. 2010;29-35.

130. Wheless SA, McKinney KA, Zanation AM. A prospective study of the clinical impact of a multidisciplinary head and neck tumor board. Otolaryngol Head Neck Surg. 2010;143:650--4.

131. Corry J, Peters LJ, Rischin D. Impact of center size and experience on outcomes in head and neck cancer. J Clin Oncol. 2015 Jan;33:138-40.

132. Tribius S, Donner J, Pazdyka H, Münscher A, Gröbe A, Petersen C i sur. Survival and overall treatment time after postoperative radio(chemo)therapy in patients with head and neck cancer. Head Neck. 2016;38:1058-65.

133. Pignon JP, le Maître A, Maillard E, Bourhis J, MACH-NC Collaborative Group Meta--analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patinents. Radiother Oncol. 2009;92:4-14.

134. Furness S, Glenny AM, Worthington HV, Pavitt S, Oliver R, Clarkson JE i sur. Interventions for the treatment of oral cavity and oropharyngeal cancer: chemotherapy. Cochrane Database Syst Rev. 2010.

135. Denis F, Garaud P, Bardet E, Alfonsi M, Sire C, Germain T i sur. Final results of the 94--01 French Head and Neck Oncology and Radiotherapy Group randomized trial comparing radiotherapy alone with concomitant radiochemotherapy in advanced-stage oropharynx carcinoma. J Clin Oncol. 2004;22(1):69-76.

136. Bernier J, Domenge C, Ozsahin M, Matuszewska K, Lefèbvre JL, Greiner RH i sur. Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. N Engl J Med. 2004;350(19):1945-52.

137. Semrau R, Mueller RP, Stuetzer H, Staar S, Schroeder U, Guntinas-Lichius O i sur. Efficacy of intensified hyperfractionated and accelerated radiotherapy and concurrent chemotherapy with carboplatin and 5-fluorouracil: updated results of a randomized multicentric trial in advanced head-and-neck cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2006;64(5):1308-16.

138. Bourhis J, Sire C, Graff P, Grégoire V, Maingon P, Calais G i sur. Concomitant chemoradiotherapy versus acceleration of radiotherapy with or without concomitant chemotherapy in locally advanced head and neck carcinoma (GORTEC 99-02): an open-label phase 3 randomised trial. Lancet Oncol. 2012;13:145-53.

139. Takes RP, Strojan P, Silver CE, Bradley PJ, Haigentz M Jr, Wolf GT i sur. Current trends in initial management of hypopharyngeal cancer: the declining use of open surgery. Head Neck. 2012;34:270-81.

140. Karatzanis AD, Psychogios G, Waldfahrer F, Zenk J, Hornung J, Velegrakis GA i sur. T1 and T2 hypopharyngeal cancer treatment with laser microsurgery. J Surg Oncol. 2010 Jul;102(1):27-33.

141. Suárez C, Rodrigo JP, Silver CE, Hartl DM, Takes RP, Rinaldo A i sur. Laser surgery for early to moderately advanced glottic, supraglottic, and hypopharyngeal cancers. Head Neck. 2012 Jul;34:1028-35.

142. Tamura Y, Tanaka S, Asato R, Hirano S, Yamashita M, Tamaki H i sur. Therapeutic outcomes of laryngeal cancer at Kyoto University Hospital for 10 years. Acta Otolaryngol (Suppl.) 2007;557:62-5.

143. Chera BS, Amdur RJ, Morris CG, Kirwan JM, Mendenhall WM. T1N0 to T2N0 squamous cell carcinoma of the glottic larynx treated with definitive radiotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2010;78(2):461-6.

144. Carl J, Andersen LJ, Pedersen M, Greisen O. Prognostic factors of local control after radiotherapy in T1 glottic and supraglottic carcinoma of the larynx. Radiother Oncol. 1996;39:229-33.

145. Hinerman RW, Mendenhall WM, Amdur RJ, Stringer SP, Villaret DB, Robbins KT. Carcinoma of the supraglottic larynx: treatment results with radiotherapy alone or with planned neck dissection. Head Neck. 2002;24:456-67.

146. Groome PA, O'Sullivan B, Irish JC, Rothwell DM, Schulze K, Warde PR i sur. Management and outcome differences in supraglottic cancer between Ontario, Canada, and the Surveillance, Epidemiology, and End Results areas of the United States. J Clin Oncol. 2003;21:496-505.

147. Agrawal A, Moon J, Davis RK, Sakr WA, Giri SP, Valentino J i sur. Transoral carbon dioxide laser supraglottic laryngectomy and irradiation in stage I, II, and III squamous cell carcinoma of the supraglottic larynx: report of Southwest Oncology Group Phase 2 Trial S9709. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2007;133:1044-50.

148. Mendenhall WM, Werning JW, Hinerman RW, Amdur RJ, Villaret DB. Management of T1-T2 glottic carcinomas. Cancer. 2004;100:1786-92.

149. American Society of Clinical Oncology, Pfister DG, Laurie SA, Weinstein GS, Mendenhall WM, Adelstein DJ i sur. American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline for the use of larynx-preservation strategies in the treatment of laryngeal cancer. J Clin Oncol. 2006;24:3693-704.

150. Dahm JD, Sessions DG, Paniello RC, Harvey J. Primary subglottic cancer. Laryngoscope. 1998;108:741-6.

151. Lefebvre JL, Andry G, Chevalier D, Luboinski B, Collette L, Traissac L i sur. Laryngeal preservation with induction chemotherapy for hypopharyngeal squamous cell carcinoma: 10--year results of EORTC trial 24891. Ann Oncol. 2012;23:2708-14.

152. Forastiere AA, Zhang Q, Weber RS, Maor MH, Goepfert H, Pajak TF i sur. Long-term results of RTOG 91-11: a comparison of three nonsurgical treatment strategies to preserve the larynx in patients with locally advanced larynx cancer. J Clin Oncol. 2013;31:845-52.

153. Zhang S, Wu L. Roles of neural precursor cell expressed, developmentally downregulated 9 in tumor-aasociated cellular process. Review. Mol Med Rep. 2015;12: 6415--21.

154. Zhang W, Li S, Zhao Y, Guo N, Li Y. Knockdown of NEDD9 inhibits proliferation, invasion and migration of esophageal carcinoma EC109 cells. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi 2016;32 (12):1662-6.

155. Zhang Q, Wang H, Ma Y, Zhang J, He X, Ma J i sur. Overexpression of NEDD9 is a prognostic marker of human gastric cancer. Med Oncol. 2014;31(7):33.

156. Karabulut M, Alis H, Afsar CU, Karabulut S, Kocatas A, Oguz H i sur. Serum neural precursor expressed, developmentally down-regulated 9 (NEDD9) level may have a prognostic role in patients with gastric cancer. Biomed Pharmacother. 2015;73:140-6.

157. Feng J, Zhao J, Xie H, Yin Y, Luo G, Zhang J i sur. Involvement of NEDD9 in the invasion and migration of gastric cancer. Tumour Biol. 2015;36(5):3621-8.

158. Liu Y, Wang D, Zhao KL, Zhu JW, Yin HB, Wei YZ i sur. NEDD9 overexpression correlates with poor prognosis in gastric cancer. Tumour Biol 2014;35(7):6351-6.

159. Shi R, Wang L, Wang T, Xu J, Wang F, Xu M. NEDD9 overexpression correlates with the progression and prognosis in gastric carcinoma. Med Oncol. 2014;31(3):852.

160. Dai J, Van Wie PG, Fai LY, Kim D, Wang L, Poyil P i sur. Downregulation of NEDD9 by apigenin supressor migration, invasion and metastases of colorectal cancer cells. Toxicol Appl Pharmacol. 2016;311:106-12.

161. Li P, Zhou H, Zhu X, Ma G, Liu C, Lin B i sur. High expression of NEDD9 predicts adverse outcomes of colorectal cancer patients. Int J Clin Exp Pathol. 2014;7(5):2565-70.

162. Kim SH, Xia D, Kim SW, Holla V, Menter DG, Dubois RN. Human enhancer of filamentation 1 is a mediator of hypoxia-inducible factor-1-alpha-mediated migration in colorectal carcinoma cells. Cancer Res. 2010;70(10):4054-63.

163. Xia D, Holla VR, Wang D, Menter DG, DuBois RN. HEF1 is a crucial mediator of the proliferative effects of prostaglandin E(2) on colon cancer cells. Cancer Res. 2010;70(2):824--31.

164. Zhou S, Xu M, Shen J, Liu X, Chen M, Cai X. Overexpression of NEDD9 promotes cell invasion and metastases in hepatocellular carcinoma. Clin Res Hepatol Gastroenterol. 2017;41(6):677-86.

165. Wang Z, Shen M, Lu P, Li X, Zhu S, Yue S. NEDD9 may regulate hepatocellular carcinoma cell metastases by promoting epithelial-mesenchymal-transition and stemness via representing Smad 7. Oncotarget. 2017;8(1):1714-24.

166. Lu P, Wang ZP, Dang Z, Zheng ZG, Li X, Zhou L i sur. Expression of NEDD9 in hepatocellular carcinoma and its clinical significance. Oncol Rep. 2015;33(5):2375-83.

167. Wang J, Wang S, Luan Y, Zhang W, Sun C, Cheng G i sur. Overexpression of NEDD9 in renal cell carcinoma is associated with tumor migration and invasion. Oncol Lett. 2017 Dec;14:8021-7.

168. Jin Y, Li F, Zheng C, Wang Y, Fang Z, Guo C i sur. NEDD9 promotes lung cancer metastases through epithelial-mesenchymal transition. Int J Cancer. 2014; 134(10): 2294-304.

169. Okon IS, Ding Y, Coughlan KA, Wang Q, Song P, Benbrook DM i sur. Aberrant NRP-1 expression serves as predictor of metastatic endometrial and lung cancers. Oncotarget. 2016; 7(7):7970-8.

170. Miao Y, Li AL, Wang L, Fan CF, Zhang XP, Xu HT i sur. Overexpression of NEDD9 is associated with altered expression of E-cadherin, β-catenin and N-cadherin and predictive of poor prognosis in non-small cell lung cancer. Pathol Oncol Res. 2013;19(2):281-6.

171. Feng Y, Wang Y, Wang Z, Fang Z, Li F, Gao Y i sur. The CRTC1-NEDD signaling axis mediates lung cancer progression caused by LKB1 loss. Cancer Res. 2012;72(24):6502-11.

172. Kondo S, Iwata S, Yamada T, Inoue Y, Ichikara H, Kichikawa Y i sur. Impact of the integrin signaling adaptor protein NEDD9 on prognosis and metastatic behaviour of human lung cancer. Clin Cancer Res. 2012;72 (24):6326-8.

173. Loskutov YV, Kozyulina PY, Kozyreva VK, IceRJ, Jones BC, Roston TJ i sur. NEDD9/Arf6-dependent endocytic trafficking of matrix metaloproteinase 14: a novel mechanism for blocking mesenchymal cell invasion and metastases of breast cancer. Oncogene. 2015;34(28):3662-75.

174. Štajduhar E, Sedić M, Leniček T, Radulović P, Kerenji A, Krušlin B i sur. Expression of growth hormone receptor, plakoglobin and NEDD9 protein in association with tumour progression and metastases in human breast cancer. Tumour Biol. 2014;35 (7):6425-34.

175. Kong C, Wang C, Wang L, Ma M, Niu C, Sun X i sur. NEDD9 is a positive regulator of epithelial-mesenchymal transition and promotes invasion in agressive breast cancer. PLOS One. 2011;6(7):e22666.

176. Bradshaw LN, Zhong J, Bradbury P, Mahmassani M, Smith JL, Ammit AJ i sur. Estradiol stabilizes the 105-kDa phospho-form of the adhesion docking protein NEDD9 and suppresses NEDD9-dependent cell spreading in breast cancer cells. Biochim Biophys Acta. 2011;1813:340-5.

177. Izumchenko E, Singh MK, Plotnikova OV, Tikhmyanova N, Little JL, Serebriiskii IG i sur. NEDD9 promotes oncogenic signaling in mammary tumour development. Cancer Res. 2009;69(18):7198-206.

178. Rambow F, Bechadergue A, Luciani F, Gros G, Domingues M, Bonaventure J i sur. Regulation of melanoma progression through the TCF/miR-125b/NEDD9 cascade. J Invest Dermatol. 2016;136(6):1229-37.

179. Kim M, Gans JD, Nogueira C, Wang A, Paik JH, Feng B i sur. Comparative oncogenomics identifies NEDD9 as melanoma metastasis gene. Cell. 2006;125 (7):1269-81.

180. Sima N, Cheng X, Ye F, Ma D, Xie X, Lü W. The overexpression of scaffolding protein NEDD9 promotes migration and invasion in cervical cancer via tyrosine phosphorylated FAK and SRC. PLOS One. 2013;8(9):e74594.

181. Morimoto K, Tanaka T, Nitta Y, Ohnishi K, Kawashima H, Nakatani T. NEDD9 crucially regulates TGF-β-triggered epithelial-mesenchymal transition and cell invasion in prostate cancer cells: involvement in cancer progressiveness. Prostate. 2014;74(8):901-10.

182. Natarajan M, Stewart JE, Golemis EA, Pugacheva EN, Alexandropoulos K, Cox BD i sur. HEF1 is necessary and specific downstream effector of FAK that promotes the migration of glioblastoma cells. Oncogene. 2006;25(12):1721-32.

183. Zhong J, Bach CT, Shum MSY, O'Neill GM. NEDD9 regulates 3D migratory activity independent of the Rac1 morphology switch in glioma and neuroblastoma. Mol Cancer Res. 2014;12(2):264-73.

184. Speranza MC, Frattini V, Pisati F, Kapetis D, Porrati P, Eoli M i sur. NEDD9, a novel target of miR-145, increases the invasiveness of glioblastoma. Oncotarget. 2012;3(7):723-34.

185. Syed P, Gupta S, Choudhary S, Pandala NG, Atak A, Richharia A, et al. Autoantibody profiling of glioma serum samples to identify biomarkers using human proteome arrays. Sci Rep. 2015;5:13895.

186. Seo S, Nakamoto T, Takeshita M, Lu J, Sato T, Suzuki T i sur. Crk-associated substrate lymphocyte type regulates myeloid cell motility and suppresses the progression of leukemia induced by p210Bcr/Abl. Cancer Sci. 2011;102(12):2109-17.

187. Izumchenko E, Singh MK, Golemis EA. NEDD9 promotes oncogenic signaling in mammary tumour development. Cancer Res. 2009;69(18):7198-206.

188. Iwata S, Souta-Kuribara A, Yamakawa A, Sasaki T, Shimizu T, Hosono O i sur. HTLV--1 Tax induces and associates with Crk-associated substrate lymphocyte type (Cas-L). Oncogene. 2005;24(7):1262-71.

189. Xue YZ, Sheng YY, Liu ZL, Wei ZQ, Cao HY, Wu YM i sur. Expression of NEDD9 in pancreatic ductal adenocarcinoma and its clinical significance. Tumour Biol. 2013 Apr;34(2):895-9. doi: 10.1007/s13277-012-0624-8. Epub 2012 Dec 18.

190. Radulović P, Krušlin B. Immunohistochemical expression of NEDD9, E-cadherin and γ--catenin and their prognostic significance in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). Bosn J Basic Med Sci. 2018 Aug 1;18(3):246-51.

191. Li Y, Fu L, Wong AM, Fan YH, Li MX, Bei JX i sur. Identification of genes with allelic imbalance on 6p associated with nasopharyngeal carcinoma in southern Chinese. PLoS One. 2011 Jan 20;6(1):e14562.

192. Ostojić J, Brčić L, Hrabač P, Seiwerth S. Expression of NEDD9 in transbronchial biopsies of lung adenocarcinoma. Acta Clinic Croat. 2018 Jun;57(2):251-6.

193. Pugacheva EN, Golemis EA. HEF1-aurora A interactions: points of dialog between the cell cycle and cell attachment signaling networks. Cell Cycle. 2006 Feb;5(4):384-91.

194. Pallares V, Hoyos M, Chillom MC i sur. NEDD9, an independent good prognostic factor in intermediate-risk acute myeloid leukemia. Patients. Oncotarget. 2017 Jun 16;8(44):76003--14.

11. Kratka biografija

Iva Ledinsky Opačić rođena je 1984. godine u Zagrebu, gdje je završila osnovnu školu i II. gimnaziju. U srpnju 2010. godine diplomirala je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Za vrijeme studija, tijekom tri godine, bila je demonstrator na Katedri iz anatomije i Katedri iz prve pomoći.

Nakon što je u razdoblju od listopada 2010. do listopada 2011. godine odradila obvezni pripravnički staž, u studenom 2011. godine položila je stručni ispit za doktora medicine.

Od studenoga 2011. do ožujka 2012. godine volontirala je na Odjelu kirurgije glave i vrata Klinike za tumore Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice, gdje, nakon šestomjesečnog probnog roka, u listopadu 2012. godine započinje specijalizaciju iz otorinolaringologije.

U razdoblju od 2011. do 2014. godine pohađala je poslijediplomski studij Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu „Biomedicina i zdravstvo“. U sklopu specijalizacije, od 2014. do 2015. godine, završila je specijalistički poslijediplomski studij „Otorinolaringologija“. Specijalistički ispit položila je u studenom 2019. godine.

Sudjelovala je na više znanstvenih skupova u Hrvatskoj i inozemstvu. Pohađala je stručne tečajeve iz područja otorinolaringologije i kirurgije glave i vrata te objavila nekoliko znanstvenih radova iz navedenog područja/područja specijalizacije.