

# Prognostička vrijednost molekula Hedgehoga signalnoga puta u planocelularnom karcinomu usne šupljine

---

Baranović, Sandra

Doctoral thesis / Disertacija

2023

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:104467>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Sandra Baranović**

**Prognostička vrijednost molekula  
Hedgehoga signalnoga puta u  
planocelularnom karcinomu usne  
šupljine**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2023.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Sandra Baranović**

**Prognostička vrijednost molekula  
Hedgehoga signalnoga puta u  
planocelularnom karcinomu usne  
šupljine**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2023.

Disertacija je izrađena u Klinici za kirurgiju lica, čeljusti i usta Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu Kliničke bolnice Dubrava i Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu Kliničke bolnice Dubrava.

Voditelji rada: prof. dr. sc. Ivica Lukšić, dr. med., prof. dr. sc. Spomenka Manojlović, dr. med.

Zahvaljujem prof.dr.sc. Anamariji Jazbec na statističkoj obradi podataka, strpljenju i savjetovanju u prikazu istih; inženjerkama medicinske laboratorijske dijagnostike Zavoda za patologiju i citologiju Kliničke bolnice Dubrava, bez kojih ne bih nastavila kada sam zastala, posebno nezaustavljivoj Suzani Tomas. Hvala mentorima koji su me usmjerili, te dali početni idejni i organizacijski vjetar u leđa da krenem u ovo istraživanje - to će uvijek ostati moj „prvi korak“ u područje kirurgije glave i vrata. I na kraju... „mojim ljudima“ koji su vjerovali u mene, nikad nisu pokazali kritičnost, već odlučni poticaj, simpatičnu strogost i prijateljsko razumijevanje.



## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Karcinom usne šupljine.....	1
1.1.1. Epidemiologija .....	1
1.1.2. Etiološki čimbenici .....	1
1.1.3. Klinička slika .....	2
1.1.4. Dijagnostički postupci .....	3
1.1.5. Liječenje .....	5
1.1.5.1. Kirurško liječenje .....	5
1.1.5.2. Radioterapija .....	7
1.1.5.2.1. Doze zračenja i frakcioniranje .....	8
1.1.5.2.2. Frakcioniranje kod samostalne primjene radioterapije .....	8
1.1.5.2.3. Frakcioniranje kod konkomitantne radiokemoterapije .....	9
1.1.5.2.4. Hiperfrakcioniranje .....	9
1.1.5.2.5. IMRT.....	9
1.1.5.3. Kemoterapija .....	10
1.2. Metastaziranje karcinoma usne šupljine .....	11
1.2.1. Limfni sustav glave i vrata .....	11
1.2.2. Limfogeno metastaziranje karcinoma usne šupljine .....	13
1.2.3. Hematogeno metastaziranje karcinoma usne šupljine .....	14
1.3. Prognostički čimbenici u bolesnika oboljelih od karcinoma usne šupljine .....	16
1.3.1. Prognostički čimbenici ovisni o bolesniku .....	16
1.3.1.1. Dob i spol .....	16
1.3.1.2. Opće stanje bolesnika .....	17
1.3.2. Prognostički čimbenici ovisni o tumoru .....	18
1.3.2.1. Lokalizacija tumora .....	18
1.3.2.2. Dubina invazije i debljina tumora .....	19
1.3.2.3. Volumen tumora .....	19
1.3.2.4. Stadij N .....	20
1.3.2.5. Histološka obilježja primarnog tumora .....	20
1.3.2.5.1. Stupanj diferenciranosti .....	20
1.3.2.5.2. Perineuralna i limfovaskularna invazija.....	21
1.3.2.5.3. Neoangiogeneza .....	22
1.3.2.6. Biljezi potvrđeni imunohistokemijskim postupkom .....	22
1.3.2.7. Molekulski biljezi .....	23

1.3.2.8 Molekule Hedgehoga signalnoga puta.....	24
1.3.3. Prognostički čimbenici ovisni o liječenju .....	30
<b>2. HIPOTEZA .....</b>	<b>32</b>
<b>3. CILJEVI RADA .....</b>	<b>33</b>
3.1. Opći cilj.....	33
3.2. Specifični ciljevi .....	33
<b>4. ISPITANICI I POSTUPCI .....</b>	<b>34</b>
4.1. Ispitanici.....	34
4.2. Postupci istraživanja .....	35
4.2.1. Podatci o liječenju bolesnika .....	35
4.2.2. Histološka mjerenja .....	36
4.2.3. Određivanje bjelančevina Hedgehoga signalnoga puta imunohistokemijskim postupkom .....	37
4.2.4. Dodatni podatci i definicije vezane uz istraživanje .....	38
4.2.5. Statistička obrada podataka.....	41
<b>5. REZULTATI .....</b>	<b>42</b>
<b>6. RASPRAVA .....</b>	<b>68</b>
<b>7. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>74</b>
<b>8. SAŽETAK .....</b>	<b>75</b>
<b>9. SUMMARY .....</b>	<b>76</b>
<b>10. LITERATURA .....</b>	<b>77</b>
<b>11. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>98</b>

## POPIS OZNAKA I KRATICA KORIŠTENIH U TEKSTU

ACS	Američko društvo za rak (eng. <i>American Cancer Society</i> )
AJCC	Američko udruženje za rak (eng. <i>American Joint Committee on Cancer</i> )
ART	adaptirana radioterapija (eng. <i>adaptive radiotherapy</i> )
A-ART	anatomski adaptirana radioterapija (eng. <i>anatomy-adaptive radiotherapy</i> )
BMI	indeks tjelesne mase (eng. <i>body mass index</i> )
CAF	fibroblast povezan sa rakom (eng. <i>cancer associated fibroblast</i> )
CI	raspon pouzdanosti (eng. <i>confidence interval</i> )
CT	kompjutorizirana tomografija (eng. <i>computerized tomography</i> )
DFS	doživljenje bez bolesti (eng. <i>disease-free survival</i> )
DHH	pustinjski Hedgehog (eng. <i>Desert Hedgehog</i> )
DOI	dubina invazije (eng. <i>depth of invasion</i> )
DSS	doživljenje vezano uz bolest (eng. <i>disease specific survival</i> )
ECOG	Istočna suradna skupina za onkologiju (eng. <i>Eastern Cooperative Oncology Group</i> )
EGF	epidermalni čimbenik rasta (eng. <i>epidermal growth factor</i> )
EGFR	receptor epidermalnog čimbenika rasta (eng. <i>epidermal growth factor receptor</i> )
EMT	epitelno-mezenhimni prijelaz (eng. <i>epithelial-mesenchymal transition</i> )
ENE	ekstranodalno širenje (eng. <i>extranodal extension</i> )
Gy	međunarodna jedinica za ionizirano zračenje (eng. <i>Grey</i> )
HIP	bjelančevina u međudjelovanju s Hedgehogom (eng. <i>Hedgehog-interacting protein</i> )
HPV	ljudski papilomavirus (eng. <i>human papilloma virus</i> )

HR	relativni rizik (eng. <i>hazard ratio</i> )
IHH	indijski Hedgehog (eng. <i>Indian Hedgehog</i> )
IMH	imunohistokemija
IMRT	liječenje zračenjem snopovima promjenjivog intenziteta (eng. <i>intensity-modulated radiation therapy</i> )
KIF7	član obitelji kinezina 7 (eng. <i>kinesin family member 7</i> )
MET	mezenhimno-epitelni prijelaz (eng. <i>mesenchymal-epithelial transition</i> )
MMP	metaloproteinaza matriksa (eng. <i>matrix metalloproteinases</i> )
MR	magnetska rezonancija (eng. <i>magnetic resonance</i> )
MVD	gustoća mikrovaskularne mreže (eng. <i>microvessel density</i> )
NCCN	Nacionalna sveobuhvatna mreža za rak (eng. <i>National Comprehensive Cancer Network</i> )
OS	ukupno doživljenje (eng. <i>overall survival</i> )
PD-1	programirana stanična smrti-1 (eng. <i>programmed cell death-1</i> )
PDGF	trombocitni čimbenik rasta (eng. <i>platelet-derived growth factor</i> )
PET/CT	pozitronska emisijska tomografija sa kompjutoriziranom tomografijom (eng. <i>positron emission tomography/computerized tomography</i> )
PFS	doživljenje do napredovanja bolesti (eng. <i>progression-free survival</i> )
PS	opći status bolesnika (eng. <i>performance status</i> )
R-ART	radioterapija adaptirana odgovorom (eng. <i>response adaptive radiotherapy</i> )
SAD	Sjedinjene Američke Države
SE	standardna pogreška (eng. <i>standard error</i> )
SHH	Sonic Hedgehog
STAT3	pretvarač signala i aktivator transkripcije 3 (eng. <i>signal transducer and activator of transcription 3</i> )

TGF- $\alpha$	transformirajući čimbenik rasta alfa (eng. <i>transforming growth factor alpha</i> )
TNM	klasifikacija anatomske proširenosti zloćudnih tumora (eng. <i>Tumor-Node-Metastasis</i> )
TORS	transoralna robotska kirurgija (eng. <i>transoral robotic surgery</i> )
VEGF	čimbenik rasta endotela krvnih žila (eng. <i>vascular endothelial growth factor</i> )
UZV	ultrazvuk
UICC	Savez za međunarodni nadzor raka (eng. <i>Union for International Cancer Control</i> )
WHO IARC	Međunarodna agencija za istraživanje raka Svjetske zdravstvene organizacije (eng. <i>World Health Organization International Agency for Research on Cancer</i> )
$\beta$	vrijednost regresijskog koeficijenta

## 1. UVOD

### 1.1. Karcinom usne šupljine

#### 1.1.1. Epidemiologija

Karcinomi usne šupljine čine 5 % svih karcinoma u ljudi, s planocelularnim karcinomom kao najčešćim histološkim tipom, dijagnosticiranim u više od 90 % slučajeva, što ga čini šestim najučestalijim zloćudnim tumorom uopće (1). Karcinom usne šupljine najčešći je zloćudni tumor glave i vrata. Prema podacima Međunarodne agencije za istraživanje raka Svjetske zdravstvene organizacije (WHO IARC, od eng. *World Health Organization International Agency for Research on Cancer*) u svijetu se godišnje dijagnosticira približno 202 000 novih slučajeva, od čega je najveći udio oboljelih (48,7 %) u srednje-istočnoj Aziji (2). Najveća učestalost karcinoma usne šupljine je u Indiji, gdje predstavlja najčešći zloćudni tumor u muškaraca i treći po učestalosti u žena, zbog široko rasprostranjene navike žvakanja duhana (3). Prema podacima Američkog društva za rak (ACS, od eng. *American Cancer Society*) za 2022. godinu, u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) se predviđa dijagnosticirati približno 54 000 slučajeva karcinoma usne šupljine i ždrijela te približno 11 230 smrtnih ishoda oboljelih (4).

U SAD-u je, u razdoblju od 2000. do 2010. godine, oko polovice novodijagnosticiranih tumora bilo lokalizirano (51,2 %), dok su regionalne i udaljene metastaze bile prisutne u 33 %, odnosno 7 % novooboljelih (5). Prosječna dob oboljelih bila je 60 godina, a omjer muškaraca prema ženama bio je 1,5:1 (5).

Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, u 2019. godini su od karcinoma usne šupljine i orofarinksa oboljele 224 osobe, a umrlo njih 365, zbog čega je deseti po učestalosti uzrok smrti u Hrvatskoj, u oboljelih od zloćudnih tumora (6). Prosječno petogodišnje doživljenje bolesnika je 62 %, u oboljelih od lokaliziranih tumora 83 %, a u bolesnika s tumorom koji se proširio u limfne čvorove vrata 59 % (4).

#### 1.1.2. Etiološki čimbenici

##### Pušenje i alkohol

Pušenje cigareta i konzumiranje alkoholnih pića, zasebno ali i sinergistički, imaju rizični učinak za nastanak karcinoma usne šupljine (7, 8). Epidemiološka istraživanja potvrđuju da pušači imaju 11 puta veći rizik razvoja karcinoma usne šupljine, a ako istovremeno

konzumiraju veće količine alkohola, rizik se povećava do 80 puta (9). Pušenje i alkohol, kao etiološki čimbenici, povećavaju rizik od nastanka drugog primarnog tumora aerodigestivnog sustava (10). Rizik od razvoja drugog zloćudnog tumora iznosi 3,7 % godišnje (11). Rizik je značajno povećan u onih bolesnika koji nastave pušiti više od deset cigareta dnevno, a iznosi 2,9 %, dok je u bolesnika koji nastave konzumirati alkohol nakon liječenja primarnog tumora usne šupljine taj rizik veći i iznosi 5,2 % godišnje (12).

Pušenje cigareta najvažniji je rizični čimbenik i u nastanku tzv. prekanceroznih lezija sluznice usne šupljine, prvenstveno leukoplakije (13).

Morfološke promjene sluznice usne šupljine: eritroplakija, leukoplakija, lihen planus (osobito erozivni oblik), te neke bolesti ili sindromi (Fanconijeva anemija, kseroderma pigmentosum, sideropenična anemija s disfagijom, Plummer-Vinsonov i Bloomov sindrom) povezani su s većim rizikom za nastanak karcinoma usne šupljine (14). Eritroplakija je povezana s najvećim rizikom. Histološke analize su pokazale da se u 51 % eritroplakija sluznice nalaze žarišta invazivnog karcinoma, u 40 % karcinom "*in situ*", a preostalih 9 % posjeduje stanice s blagom do umjerenom displazijom (15).

Učestalost prijelaza leukoplakije usne šupljine u displastične ili zloćudne tvorbe prema podacima nekoliko istraživanja je između 15,6 % i 39,2 % (16, 17).

### Infekcija ljudskim papilomavirusom

Infekcija ljudskim papilomavirusom (HPV, od eng. *human papilloma virus*) poznati je etiološki čimbenik u nastanku planocelularnog karcinoma orofarinksa (18-22). Za razliku od karcinoma orofarinksa, u planocelularnom karcinomu usne šupljine nije nađena značajna etiološka povezanost s prisutnosti HPV-a (23-25), iako se prisutnost tog virusa pokazala kao povoljniji prognostički čimbenik u karcinomu usne šupljine (26). Posljednjih se godina u zemljama zapadne Europe i SAD-a bilježi porast incidencije karcinoma glave i vrata u kojima se nalazi HPV (27). Tip 16 HPV-a je dokazano visoko rizični tip za etiopatogenezu u nastanku karcinoma orofarinksa i usne šupljine (28).

#### 1.1.3. Klinička slika

Anatomske granice usne šupljine čine sprijeda koža i rub crvenila gornje i donje usnice, straga papile cirkumvalate stražnje trećine jezika te prema gore spoj tvrdog i mekog nepca te prednji nepčani lukovi. Podijeljena je u sedam sastavnica: usnica, prednje dvije trećine jezika

(intraoralni - pokretljivi dio jezika), dno usne šupljine, gingiva, retromolarno područje te sluznica obraza i tvrdo nepce (29).

Najčešća podlokalizacija tumora je intraoralni dio jezika (najčešće ventralna strana i rub jezika) (35 %) i dno usne šupljine (15,3 %). Slijedeće anatomske sastavnice po učestalosti pojave tumora su gingiva mandibule i retromolarno područje (16-18 %). Znatno je rjeđi na sluznici obraza (iznimku čine Indijci, zbog prethodno opisane navike žvakanja duhana) (8-10 %) i tvrdom nepcu (3-4 %) (30-32).

Klinički se najčešće očituje kao ulcerozna, papilarna, ili rjeđe, infiltrativna lezija (33).

Najčešći znakovi bolesti su bol u ustima uz otežano i bolno gutanje, bol sa širenjem prema uhu, pečenje u ustima (osobito pri konzumiranju začinjene hrane), klimavost zubi te krvarenje iz usne šupljine (33). U približno jedne četvrtine bolesnika metastatski čvor na vratu prvi je znak karcinoma usne šupljine (33-35).

Karcinom usne šupljine ima lošu prognozu. Iako je u lako dostupnom anatomskom području te je moguće započeti dijagnostičku obradu već prilikom kliničkog pregleda (inspekcija, palpacija, biopsija), približno polovica bolesnika u trenutku postavljanja dijagnoze ima lokalno uznapredovali karcinom (stadiji T3 ili T4) (4, 5). Time predstavlja značajan klinički i javnozdravstveni problem (3).

#### 1.1.4. Dijagnostički postupci

Dijagnoza karcinoma usne šupljine postavlja se na temelju anamnestičkih podataka i fizikalnog pregleda, a potvrđuje histološkom analizom biopsijskog uzorka uzetoga iz klinički promijenjenog područja (36). Proširenost bolesti određuje se radiološkim slikovnim metodama (UZV, CT ili MR, rjeđe PET/CT). Najveća osjetljivost (80 %) postupaka otkrivanja regionalne proširenosti karcinoma u limfne čvorove vrata, postiže se kombiniranim pristupom, koji obuhvaća klinički pregled (palpaciju), UZV i CT (37). Na temelju dobivenih podataka određuje se klinički stadij bolesti, prema međunarodnoj klasifikaciji anatomske proširenosti zloćudnih tumora (TNM, od eng. *Tumor- Node - Metastasis*) (38-41). U **tablici 1.** prikazana je klasifikacija TNM iz 2017. godine.



**Tablica 1. Klasifikacija TNM karcinoma usne šupljine (40, 41)**

<b>Stadij T</b>	<b>Primarni tumor</b>	
Tx	Primarni tumor se ne može dokazati	
T0	Nema vidljivog primarnog tumora	
Tis	Karcinom <i>in situ</i>	
T1	Tumor $\leq 2$ cm i dubina invazije (DOI, od eng. <i>depth of invasion</i> ) $\leq 0,5$ cm	
T2	Tumor $> 2$ cm $\leq 4$ cm i DOI $> 0,5$ ali $\leq 1$ cm	
T3	Tumor $> 4$ cm ili DOI $> 1$ cm	
T4 Tumor se širi u okolne strukture*	T4a	* kortikalni mandibule, duboki mišići jezika (genioglosalni, hioglosalni, palatoglosalni, stiloglosalni mišić), maksilarni sinus, koža lica. Površinska erozija kosti ili alveole zuba karcinomom gingive nije dovoljan kriterij za klasificiranje kao T4
	T4b	* mastikatorni prostor, pterigoidni nastavci, baza lubanje i/ili unutarnja karotidna arterija
<b>Stadij N</b>	<b>Stanje regionalnih limfnih čvorova</b>	
Nx	Metastaza u limfnom čvoru se ne može dokazati	
N0	Nema metastaza u regionalnim limfnim čvorovima	
N1	Metastaza u ipsilateralnom limfnom čvoru $\leq 3$ cm i ektranodalno širenje - (ENE, od eng. <i>extranodal extension</i> )	
N2	N2a	Metastaza u ipsilateralnom limfnom čvoru $> 3$ cm $\leq 6$ cm i ENE -
	N2b	Dvije ili više metastaza u ipsilateralnim limfnim čvorovima $\leq 6$ cm i ENE -
	N2c	Metastaze obostrano (neovisno o veličini) ili u kontralateralnim limfnim čvorovima $\leq 6$ cm i ENE -
N3	N3a	Metastaza u limfnom čvoru $> 6$ cm i ENE -
	N3b	Metastaza u jednom ipsilateralnom limfnom čvoru s ENE+ ili multipli ipsilateralni, kontralateralni ili bilateralni limfni čvorovi s ENE+
<b>Stadij M</b>	<b>Stanje udaljenih metastaza</b>	
Mx	Udaljene metastaze se ne mogu dokazati	
M0	Nema udaljenih metastaza	
M1	Udaljene metastaze postoje	

### 1.1.5. Liječenje

Izbor liječenja ovisi o lokalizaciji tumora, njegovoj veličini i zahvaćanju okolnih struktura (stadij T), histološkom tipu, postojanju regionalnih i/ili udaljenih metastaza (stadij NM) te o općem stanju bolesnika (42). Liječenje može biti kirurško, samostalno ili u kombinaciji s radioterapijom, kemoterapijom i imunoterapijom (43).

#### 1.1.5.1. Kirurško liječenje

Početkom 20. stoljeća američki kirurg George Crile postavio je temelje kirurškog liječenja opisavši "blok disekciju", odnosno resekciju primarnog tumora u usnoj šupljini u kontinuitetu s pripadajućim limfnim čvorovima i limfnim putevima (44, 45). Za promociju te kirurške metode među kirurzima glave i vrata (operacija COMMANDO, od eng. *COMbined MAndibulectomy and Neck Dissection Operation*) zaslužan je "otac kirurgije glave i vrata" Hayes Martin. Kirurška načela disekcije vrata nisu se značajno mijenjala tijekom vremena (46).

Ovisno o lokalizaciji (najčešće u prednjim dijelovima usne šupljine) i veličini tumora (stadij T1 i T2, rjeđe T3), može se učiniti samo intraoralna ekscizija kojom se odstranjuje primarni tumor. Indikacije za navedeni zahvat nisu do kraja definirane. Ne postoje niti strogo definirane smjernice koje bi definirale terapijski postupak u bolesnika bez klinički evidentnih metastaza u limfnim čvorovima vrata. Najveće proturječnosti o opsegu kirurškog liječenja predstavlja karcinom usne šupljine kliničkog stadija T2-3N0. U bolesnika bez klinički evidentnih metastaza u limfnim čvorovima vrata navode se tri mogućnosti kirurškog liječenja: a) intraoralna ekscizija s praćenjem bolesnika do pojave klinički evidentnih regionalnih metastaza, b) intraoralna ekscizija s profilaktičkom (elektivnom) disekcijom limfnih čvorova vrata i c) intraoralna ekscizija s profilaktičkim (elektivnim) zračenjem vrata (47-49).

U brojnim je istraživanjima uspoređivan ishod bolesti u bolesnika u kojih je učinjena elektivna disekcija vrata (postupak „b“) u odnosu na bolesnike koji su podvrgnuti intraoralnoj eksciziji s praćenjem do pojave regionalnih metastaza u limfnim čvorovima vrata (postupak „a“).

O'Brien i sur. proveli su prospektivno istraživanje na 162 bolesnika s karcinomom usne šupljine i orofarinksa, stadija T1-T4 bez klinički evidentnih metastaza u limfnim čvorovima vrata (50). Odluka o opsegu liječenja određena je na temelju lokalizacije i stadija T primarnog tumora. Većina praćenih do pojave regionalnih metastaza imala je početni intraoralni karcinom. U njih se i očekuje visoka stopa doživljenja i nadzor regionalne bolesti. Autori su zaključili da pažljivi odabir načina liječenja u bolesnika bez klinički evidentnih metastaza u

limfnim čvorovima vrata, na temelju lokalizacije i stadija bolesti, omogućuje visoke stope regionalnog nadzora bolesti.

Yuen i sur. su u prospektivnom multicentričnom randomiziranom istraživanju na 71 bolesniku s početnim intraoralnim karcinomom bez metastaza u limfnim čvorovima vrata, dokazali da ne postoji statistički značajna razlika u petogodišnjem doživljenju između skupine bolesnika koji su operirani i praćeni u odnosu na bolesnike u kojih je učinjena i elektivna disekcija vrata (87 % prema 89 %) (51).

S druge strane, četiri su istraživanja identificirala više stope ukupnog doživljenja i doživljenja bez bolesti (DFS, od eng. *disease-free survival*) u skupini bolesnika koji su bili inicijalno liječeni elektivnom disekcijom vrata, uz resekciju primarnog tumora.

U retrospektivnom istraživanju na 380 bolesnika s karcinomom jezika kliničkog stadija T1-2N0, 56 bolesnika je praćeno, a u 324 je učinjena elektivna disekcija vrata (supraomohoidna disekcija u 287, a modificirana radikalna disekcija u 37 bolesnika). U drugoj su skupini bolesnika okultne metastaze dokazane za karcinome T1 u 5,2 %, a za T2 u 14,6 % ( $P=0,005$ ) oboljelih. Ukupno petogodišnje doživljenje bilo je statistički značajno dulje u drugoj skupini bolesnika, pri čemu su bolesnici u kojih je učinjena modificirana radikalna disekcija vrata imali dulje (ne i statistički značajno), petogodišnje doživljenje u odnosu na bolesnike u kojih je učinjena supraomohoidna disekcija (52).

Capote i sur. su u istraživanju na 154 bolesnika s početnim intraoralnim karcinomom, dokazali statistički značajno rjeđu pojavu regionalnog recidiva te dulje doživljenje bolesnika podvrgnutih elektivnoj disekciji vrata (53).

D'Cruz i sur. dokazali su statistički značajno dulje ukupno doživljenje te DFS u bolesnika koji su bili podvrgnuti elektivnoj disekciji vrata na 596 bolesnika s početnim karcinomom usne šupljine (54). U 245 bolesnika učinjena je elektivna disekcija vrata, dok je 255 bolesnika praćeno i podvrgnuto kurativnoj disekciji u slučaju pojave metastaza u limfnim čvorovima vrata tijekom praćenja. U prvoj je skupini 81 bolesnik razvio recidiv od kojeg je umrlo 50 bolesnika, dok je u skupini bolesnika u kojih je učinjena kurativna disekcija zabilježeno 146 recidiva i 79 smrti od bolesti. Bolesnici podvrgnuti elektivnoj disekciji vrata imali su za 12,5 % duže trogodišnje ukupno doživljenje te za 23,6 % dulji trogodišnji DFS (80 % u odnosu na 67,5 % za ukupno doživljenje, 69,5 % u odnosu na 45,9 % za DFS). Autori su stoga zaključili da provođenje elektivne disekcije vrata doprinosi duljem ukupnom doživljenju u bolesnika s početnim stadijem karcinoma usne šupljine.

Vasillou i sur. su svoj pregledni članak o objavljenim multicentričnim randomiziranim istraživanjima o elektivnoj disekciji vrata ranih stadija karcinoma usne šupljine (T1-T2, N0)

zaključili preporukom elektivne disekcije vrata u bolesnika sa navedenim stadijem bolesti (55). Razlozi za to su bili točno određivanje stadija bolesti (histološki dokaz regionalnog širenja karcinoma u limfne čvorove vrata), bolji lokoregionalni nadzor tumora (elektivna ili kurativna terapija) te bolje planiranje adjuvantne terapije. Pojava okultnih metastaza u klinički negativnim limfnim čvorovima vrata u bolesnika sa karcinomom usne šupljine je 20-30 %. Autori naglašavaju i važnost dubine invazije tumora kao prognostičkog čimbenika za pojavu regionalnih metastaza koji je uvršten u TNM klasifikaciju 2017. godine te utjecao na donošenje odluka o načinu liječenja u mnogim onkološkim središtima za tumore glave i vrata (41). Tako je prema NCCN smjernicama (od eng. *National Comprehensive Cancer Network*) preporuka učiniti elektivnu disekciju vrata svim bolesnicima s tumorom usne šupljine koji ima dubinu invazije veću od 4 mm (56).

Zagovornici elektivne disekcije vrata navode veliku učestalost okultnih regionalnih metastaza te rjeđu pojavu regionalnog recidiva i dulje doživljenje u bolesnika bez klinički evidentnih metastaza u limfnim čvorovima vrata kad se vrat operira istodobno s primarnim tumorom usne šupljine.

S druge strane, neki autori navode usporedive stope doživljenja između bolesnika kojima je učinjena intraoralna ekscizija u odnosu na bolesnike kojima je napravljena i elektivna disekcija vrata, naglašavajući nepotrebnost morbiditet i eventualne poslijeoperacijske komplikacije u slučajevima histološki negativnih limfnih čvorova vrata (50, 51).

#### 1.1.5.2. Radioterapija

Radioterapija je liječenje zračenjem koje uništava tumorske stanice ili sprječava njihovo dijeljenje. Ovisno o stadiju bolesti, u liječenju karcinoma usne šupljine najčešće se koristi kirurško liječenje ili primarno zračenje (stadij I i II), dok kod uznapredovalih tumora (stadij III i IV) združeni oblici liječenja (kirurško liječenje s radioterapijom ili radiokemoterapijom) daju najbolje izgleda za izlječenje (57). U prve skupine bolesnika izlječenje se postiže u 80-90 % bolesnika, a u bolesnika sa stadijem tumora III i IV, združenim oblicima liječenja, u 40-60 % bolesnika (58, 59).

Radioterapijom se, kao samostalnim oblikom liječenja regionalne bolesti ne može postići izlječenje, no ovisno o histološkom nalazu disektata vrata radioterapija se može primijeniti nakon operacije (poslijeoperacijsko zračenje ili adjuvantna radioterapija) (60). Indikacije za provođenje adjuvantne radioterapije su sljedeće: tumori histološkog stadija T3 i

T4 (pT3 i pT4), s pozitivnim rubom resekcije, perineuralnom/limfovaskularnom invazijom, multiplim pozitivnim limfnim čvorovima vrata te u slučaju proboja čahure limfnog čvora (61).

Ponekad se primjenjuje profilaktička (elektivna) radioterapija vrata u bolesnika s početnim intraoralnim karcinomom bez klinički evidentnih metastaza u limfnim čvorovima, kojom se smanjuje rizik razvoja regionalnog recidiva, iako ne postoje jasni dokazi da doprinosi duljem doživljenju i ne koristi se kao rutinski postupak u liječenju ovih bolesnika (61, 62).

#### 1.1.5.2.1. Doze zračenja i frakcioniranje

Odabir ukupne doze zračenja ovisi o nekoliko čimbenika: veličini tumora, broju i veličini regionalnih metastaza, načinu frakcioniranja te eventualnoj primjeni kemoterapije. U slučajevima primarne radioterapije konvencionalnim frakcioniranjem na visokorizična područja (primarni tumor i pozitivni limfni čvorovi) potrebno je primijeniti ukupno 66-70 Gy (2-2,2 Gy/dozi). Doze iznad 72 Gy nisu preporučljive obzirom na visoke stope oštećenja okolnog tkiva (62-66). Kod hiperfrakcioniranja, ukupna preporučena doza radioterapije iznosi 81,6 Gy (1,2 Gy/dozi) (63).

Radioterapija područja glave i vrata s niskim ili srednjim rizikom za širenje bolesti (neodstranjeni i histološki negativni limfni čvorovi) primjenjuje se u ukupnoj dozi od 40 (2,0 Gy/frakciji) do 63 Gy (1,6-1,8 Gy/frakciji), ovisno o načinu zračenja koji se koristi (3D konformalna radioterapija ili liječenje zračenjem snopovima promjenjivog intenziteta (IMRT, od eng. *intensity-modulated radiation therapy*) (67-69).

#### 1.1.5.2.2. Frakcioniranje kod samostalne primjene radioterapije

Prema dosadašnjim istraživanjima, ako se primjenjuje samostalno, najmanja preporučena doza iznosi 10 Gy tjedno za planocelularni karcinom glave i vrata. Adaptirana radioterapija (ART, od eng. *adaptive radiotherapy*) nedavno je opisana kao nov pristup frakcioniranju. Dijeli se u dvije kategorije: anatomske adaptirane radioterapije (A-ART, od eng. *anatomy-adaptive radiotherapy*) i radioterapije adaptirane odgovorom (R-ART, od eng. *response adaptive radiotherapy*). A-ART označava oblik liječenja radioterapijom gdje se radi re-planiranje bolesnika na temelju strukturnih i prostornih promjena tkiva koje se događaju kao terapijski odgovor tijekom vremena, s ciljem smanjivanja predoziranja zračenjem osjetljivih struktura, te točnijim zračenjem tumorskog područja. R-ART, s druge strane, je re-planiranje bolesnika na

temelju terapijskog odgovora, tako da se mijenja polje/doza zračenja, uz praćenje tumora slikovnim radiološkim metodama tijekom liječenja (70).

#### 1.1.5.2.3. Frakcioniranje kod konkomitantne radiokemoterapije

Kad je riječ o konkomitantnoj radiokemoterapiji, većina istraživanja analizirala je uspješnost konvencionalnog frakcioniranog zračenja (2 Gy/dnevno do ukupno 70 Gy kroz 7 tjedana) uz istodobnu primjenu cisplatine u visokoj dozi (100 mg/m<sup>2</sup> svaka 3 tjedna) (71).

Brojna istraživanja pokazala su da je izmijenjeno frakcioniranje s istodobnom primjenom kemoterapije učinkovitije od izmijenjenog samostalnog frakcioniranja (72-74).

Konkomitantna radiokemoterapija ima veću akutnu toksičnost u odnosu na samo zračenje (75, 76).

#### 1.1.5.2.4. Hiperfrakcioniranje

Hiperfrakcioniranje je oblik zračenja koji koristi 2-3 frakcije na dan, u pojedinačnoj dozi 1-1,2 Gy, u najmanjem razmaku od četiri do šest sati (dnevna ukupna doza je veća od 2 Gy), u ukupnom vremenskom razdoblju od šest do osam tjedana.

Iako su kasne komplikacije slične komplikacijama koje nastaju konvencionalnim frakcioniranjem, učinak na tumorske stanice je veći.

Nedavno učinjena metaanaliza radioterapije u planocelularnim karcinomima glave i vrata uspoređivala je promjenjivo frakcioniranje u odnosu na konvencionalno frakcioniranje, te je uključila 33 istraživanja sa ukupno 11423 bolesnika (74). Promjenjivo frakcionirana radioterapija povezana je sa višom stopom ukupnog doživljenja (HR 0,94,  $P=0,0033$ ), s apsolutnom razlikom nakon pet godina od 3.1 %, a nakon deset godina 1,2 %. Nađena je značajna povezanost načina frakcioniranja i ishoda liječenja, u korist hiperfrakcioniranja.

#### 1.1.5.2.5. IMRT

IMRT je liječenje zračenjem snopovima različitih intenziteta (IMRT, od eng. *intensity-modulated radiation therapy*). Snopovi zračenja se oblikuju i usmjeravaju u nekoliko različitih smjerova, a svaki snop je podijeljen na nekoliko manjih snopova različitog intenziteta zračenja. Na taj način se na ležište tumora primijeni optimalna doza zračenja, uz istodobno minimalno oštećenje okolnog tkiva zračenjem (77, 78).

Brojna istraživanja faze III pokazala su da tehnika IMRT, primijenjena u liječenju različitih tumora, smanjuje učestalost kasnih komplikacija zračenja bez kompromitiranja lokalnog nadzora bolesti.

Klinička primjena ove terapije pokazala je prednost u liječenju planocelularnog karcinoma glave i vrata u smislu veće poštode očnog živca, parotidne žlijezde, manje učestalosti osteoradionekroze mandibule te niže stope postiradijacijske kserostomije (79-82).

#### 1.1.5.3. Kemoterapija

Lijekovi sustavne terapije koji se najčešće koriste u liječenju karcinoma usne šupljine su: cisplatina, karboplatina, 5-fluorouracil, metotreksat, paklitaksel, docetaksel, nivolumab, pembrolizumab i cetuksimab (83, 84).

Mogu se primjenjivati na nekoliko načina: a) indukcijski - prije primjene drugih oblika liječenja (radioterapije, radiokemoterapije ili kirurškog liječenja); b) adjuvantno (nakon kirurškog zahvata ili radioterapije, s ciljem eradikacije eventualno prisutnih subkliničkih metastaza) i c) palijativno, u bolesnika s neoperabilnim tumorom (84).

Samostalno primijenjena adjuvantna kemoterapija ne doprinosi duljem doživljenju, neovisno o tome je li prethodio kirurški zahvat ili radioterapija (84).

Dosadašnja istraživanja nisu pokazala dulje doživljenje ili bolji lokoregionalni nadzor bolesti u bolesnika u kojih je primijenjena indukcijska kemoterapija u odnosu na konkomitantnu radiokemoterapiju (85, 86).

Indikacije za istodobnu primjenu zračenja s kemoterapijom (konkomitantna radioterapija) su histološki pozitivni rub resekcije i/ili ekstrakapsularni proboj tumora u limfnim čvorovima vrata (59). Nekoliko istraživanja je ispitivalo učinak konkomitantne radiokemoterapije te je pokazano da ovaj oblik liječenja dovodi do više stope ukupnog doživljenja u rasponu od 1 do 8 %, u odnosu na liječenje samo radioterapijom (59, 84, 87).

Cetuksimab je lijek registriran za liječenje planocelularnog karcinoma glave i vrata. Riječ je o kimeričnom monoklonskom protutijelu IgG1, koje se veže na izvanstanični dio EGFR-a, što za posljedicu ima inhibiciju rasta, invazije i metastaziranja stanica raka.

Cetuksimab također inhibira rast stanica karcinoma usne šupljine mehanizmom inhibiranja epitelno-mezenhimnog prijelaza (EMT, od eng. *epithelial-mesenchymal transition*) te modulacijom izraženosti integrina  $\beta 5$  (88).

Pembrolizumab je humanizirano monoklonsko protutijelo koje se veže na receptor programirane stanične smrti-1 (PD-1, od eng. *programmed cell death-1*). Svojim vezivanjem

spriječava aktivaciju liganda programirane stanične smrti 1 i 2 (PD-L1/2, od eng. *programmed death ligand*) i time pokreće reakciju aktivacije T staničnog imunskog odgovora protiv tumorskih stanica (89). Pembrolizumab je registriran lijek indiciran za primarno liječenje metastatski proširenog planocelularnog karcinoma glave i vrata te za neoperabilni recidiv planocelularnog karcinoma glave i vrata.

Nedavno istraživanje faze III uspoređivalo je učinak pembrolizumaba samoga ili u kombinaciji sa kemoterapijom (platina ili 5-fluorouracil) i cetuksimaba u kombinaciji s kemoterapijom (platina ili 5-fluorouracil) u neoperabilnih bolesnika s udaljenim metastazama ili neoperabilnim lokalnim recidivom karcinoma glave i vrata. Pembrolizumab u kombinaciji s kemoterapijom pridodao je boljem ukupnom doživljenju u odnosu na terapiju cetuksimabom s kemoterapijom, uz doživljenje 13 mjeseci u prvoj skupini bolesnika prema 10,7 mjeseci u drugoj skupini,  $P=0,0034$  (90).

Bolesnici s lokaliziranim tumorom imaju bolji odgovor na kemoterapiju u odnosu na bolesnike s udaljenim metastazama. Odgovor na kemoterapiju ovisi o stadiju bolesti, općem stanju bolesnika (PS, od eng. *performance status*) i prethodnom liječenju (84).

## 1.2. Metastaziranje karcinoma usne šupljine

### 1.2.1. Limfni sustav glave i vrata

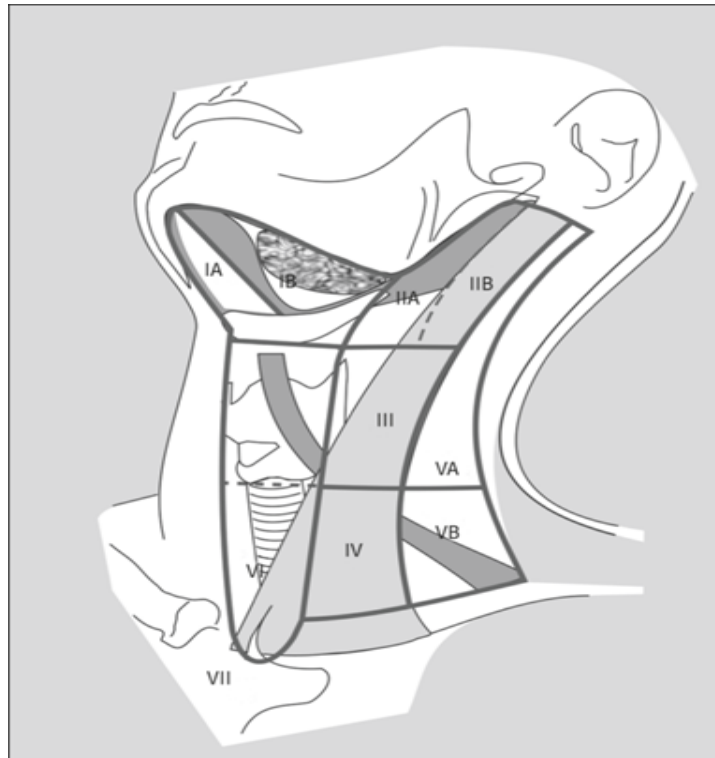
Skupine limfnih čvorova na vratu su s obzirom na topografiju podijeljene u pet područja s obje strane vrata (I - V) te područja VI i VII koja obuhvaćaju limfne čvorove središnjeg dijela vrata i gornjeg medijastinuma (**slika 1.**), prema preporuci Američkog udruženja za rak (AJCC, od eng. *American Joint Committee on Cancer*) (91). Anatomske granice područja limfnih čvorova vrata prikazane su u **tablici 2.**

Smatra se da u području vrata ima otprilike 150 do 300 limfnih čvorova. Većina struktura glave i vrata drenira se u ipsilateralne skupine limfnih čvorova, osim struktura koje su smještene u središnjoj tj. medijalnoj liniji, a to su: nazofarinks, stražnji zid ždrijela, korijen jezika, meko nepce i grkljan. Posljedično, karcinom tih anatomske struktura može se proširiti obostrano u limfne čvorove vrata (92).

Limfni sustav glave i vrata podijeljen je u dva sloja, odvojena dubokom vratnom fascijom. Površinski limfni sustav drenira se u subokcipitalne, preaurikularne i postaurikularne te vanjske jugularne limfne čvorove koji se zajedno na kraju ulijevaju u duboke jugularne limfne čvorove. Duboki limfni čvorovi lateralnog područja vrata prvenstveno dreniraju limfu iz sluznice gornjeg dijela aerodigestivnog sustava. Oni uključuju submentalne i



submandibularne topografske trokute vrata. Duboki jugularni limfni čvorovi uključuju jugulodigastrične, juguloomohoidne i supraklavikularne limfne čvorove uz unutarnju jugularnu venu (93).



**Slika 1.** Područja limfnih čvorova vrata. I-VII su anatomska područja opisana u Tablici 2. (91)

**Tablica 2. Anatomski smještaj limfnih čvorova vrata**

Anatomsko područje	Skupina limfnih čvorova	Omeđenja anatomskih područja
<b>Područje I</b>	1. Submentalni limfni čvorovi 2. Submandibularni limfni čvorovi	Područje submentalnog i submandibularnog trokuta: 1. trokut između prednjeg trbuha digastričnog mišića i jezične kosti (IA) 2. trokut omeđen prednjim i stražnjim trbuhom digastričnog mišića te donjim rubom mandibule (IB)
<b>Područje II</b>	Gornji jugularni limfni čvorovi	Područje unutarnje jugularne vene: od baze lubanje do visine račvišta karotide te jezične kosti, ispred lateralnog ruba sternokleidomastoidnog mišića, a iza lateralnog ruba sternohioidnog mišića. Akcesorni živac je razdjelnica medijalnog (IIA) i lateralnog (IIB) dijela područja II

<b>Područje III</b>	Srednji jugularni limfni čvorovi	Područje unutarnje jugularne vene: od visine hioidne kosti do omohoidnog mišića i donjeg ruba krikoidne hrskavice, straga do lateralnog ruba sternokleidomastoidnog mišića, a naprijed do lateralnog ruba sternohoidnog mišića
<b>Područje IV</b>	Donji jugularni limfni čvorovi	Područje unutarnje jugularne vene: od donjeg ruba krikoidne hrskavice do ključne kosti, straga do lateralnog ruba sternokleidomastoidnog mišića, a naprijed do lateralnog ruba sternohoidnog mišića
<b>Područje V</b>	Limfni čvorovi stražnjeg trokuta vrata	Područje stražnjeg trokuta vrata: od stražnjeg ruba sternokleidomastoidnog mišića do prednjeg ruba trapezoidnog mišića i ključne kosti. Projekcija donjeg ruba krikoidne hrskavice dijeli područje na gornje (VA) i donje (VB) podpodručje
<b>Područje VI</b>	Pretrahealni, paratrahealni, prekrikoidni i peritiroidni limfni čvorovi	Područje središnjeg dijela vrata: donji rub hioidne kosti čini gornju granicu područja, a gornji rub prsne kosti donju, dok karotidne arterije čine lateralne granice
<b>Područje VII</b>	Limfni čvorovi gornjeg medijastinuma	Područje gornjeg medijastinuma: od gornjeg ruba sternuma do arterije inoimate

### 1.2.2. Limfogeno metastaziranje karcinoma usne šupljine

Invazivni rast i metastaziranje osnovna su klinička obilježja zloćudnih tumora. Ti procesi su posljedica nekontrolirane proliferacije, koja se događa zbog: gubitka funkcije bjelančevina - supresora rasta, replikacije i besmrtnosti, indukcije upale, indukcije angiogeneze, izbjegavanja imunosnog odgovora domaćina, izbjegavanja programirane stanične smrti (apoptoze), nestabilnost genoma/mutacije i deregulacije energetskog staničnog metabolizma (94).

Zloćudni tumori oslobađaju čimbenike rasta, kao što je čimbenik rasta endotela krvnih žila C (VEGF-C, od eng. *vascular endothelial growth factor C*), koji induciraju stvaranje spleta novih limfnih žila (limfangiogeneza) u primarnim tumorima, kao i u limfnim čvorovima pripadajućeg drenažnog područja, što dovodi do pojave metastaza karcinoma u limfnim čvorovima. Zanimljivi su rezultati novijih istraživanja koji pokazuju da limfne žile ne doprinose metastatskom širenju karcinoma samo kao pasivni putevi, već aktivno doprinose prijenosu tumorskih stanica u limfni čvor, potiču preživljavanje matičnih stanica karcinoma i mijenjaju imunosni odgovor (95).

Proširenost karcinoma usne šupljine, kao i većine zloćudnih tumora glave i vrata, u regionalne limfne čvorove najvažniji je prognostički čimbenik koji često određuje odluku o načinu i opsegu liječenja (96, 97). Pokazala se i značajna povezanost veličine metastaza u limfnim čvorovima vrata s lokalizacijom primarnog karcinoma usne šupljine (98).

Postoje dvije teorije o limfogenom metastaziraju tumora glave i vrata: izravna ekstenzija (permeacija) i otkidanje dijelova tumora (embolizacija), gdje „otkinute“ stanice tumora limfom odlaze u regionalne limfne čvorove (99). Nakon toga primarno invadiran metastatski limfni čvor postaje izvorom sekundarne embolizacije za susjedni limfni čvor. Ponekad se dogodi da stanice tumora embolizacijom "preskoče" metastatski čvor (drenaža u niža područja vrata bez zahvaćenih viših područja) tzv. "skip metastaze" (99).

Otprije je poznat predviđeni put širenja karcinoma usne šupljine i zahvaćena područja limfnih čvorova vrata, što obuhvaća područja I, II i III, s područjem II kao najčešće zahvaćenim, na temelju čega se planira liječenje prvenstveno vrsta disekcije vrata (100, 101).

Ponekad dođe do aberantnog tijeka limfe, čime se objašnjava pojava neočekivanih (tzv. "nelogičnih metastaza") na suprotnoj strani vrata u odnosu na tumor u usnoj šupljini (102, 103).

### 1.2.3. Hematogeno metastaziranje karcinoma usne šupljine

U bolesnika s planocelularnim karcinomom glave i vrata udaljene metastaze rijetke su u trenutku postavljanja dijagnoze, ali su važan čimbenik za stopu doživljenja i odabir načina liječenja (104, 105).

Najčešća lokalizacija udaljenih metastaza su pluća. Ovaj organ može biti jedino mjesto udaljenih metastaza hematogenog rasapa, ili se pojavljuje kao jedan od organa zahvaćenih metastazama (jetra: 10-24 %; kosti: 7-20 %; koža: 13,3 %; mozak: 3,3 %), s time da su pluća uvijek pogođena (106, 107). Lokalizacija primarnog tumora usne šupljine koja najčešće daje udaljene metastaze je gingiva gornje čeljusti (108).

Broj pozitivnih limfnih čvorova, ekstrakapsularno širenje, stupanj diferenciranosti tumora, stadij bolesti > III te lokoregionalni recidiv bolesti prema mnogim autorima nezavisni su prognostički čimbenici za pojavu udaljenih metastaza (106, 109).

Metastaziranje počinje odvajanjem tumorskih stanica od primarnog karcinoma, širenjem kroz tkivo, udaljavanjem kroz izvanstanični matriks, invazijom krvnih žila i mikrovaskularnih struktura i, na kraju, ekstravazacijom kroz stijenku krvne žile i proliferacijom u ciljnom tkivu/organu (110). EMT potiče metastaziranje smanjujući međustaničnu adheziju i

sekrecijom matriks metaloproteinaza (MMPs, od eng. *matrix metalloproteinases*) što dovodi do smanjenja izvanstaničnog matriksa (111-113).

Rezultati istraživanja iz 2007. godine pokazali su da se udaljene metastaze u bolesnika s karcinomom usne šupljine, koje su bile dokazane u 6 % bolesnika, statistički značajno češće javljaju u osoba koje imaju bilateralne metastaze u limfnim čvorovima vrata (114).

Tomioaka i sur. su u istraživanje iz 2021. godine uključili 887 bolesnika s karcinomom usne šupljine, bez lokoregionalnih metastaza, s izoliranim udaljenim metastazama u trenutku postavljanja dijagnoze (115). Od 887 bolesnika, u njih 36 potvrđene su udaljene metastaze (4,1 %), s time da su pluća bila najčešće zahvaćeni udaljeni organ (31/36 bolesnika, 86,1 %). Multivarijatna analiza pokazala je invaziju kosti primarnim karcinomom, metastaze u limfnim čvorovima vrata područja IV i V te ektranodalno širenje kao negativne prognostičke čimbenike za nastanak udaljenih metastaza. Bolesnici sa metastazama u limfnim čvorovima vrata imali su značajno češće (12,7 %) udaljene metastaze.

Bolesnici s istodobnom pojavom lokoregionalnog recidiva i udaljenih metastaza imali su statistički značajno kraće petogodišnje doživljenje u odnosu na bolesnike s izoliranim udaljenim rasapom (0 % prema 13 %). Ovaj podatak dodatno naglašava važnost lokoregionalnog nadzora bolesti (116).

Duprez i sur. u nedavnom istraživanju s 1 022 bolesnika oboljela od planocelularnog karcinoma glave i vrata pokazali su da je najveća učestalost nastanka udaljenih metastaza u prvih 12 mjeseci nakon završetka liječenja primarnog tumora (117). Od ukupnog broja bolesnika, njih 141 (13,8 %) razvili su udaljene metastaze, od toga 70 % bolesnika u prvoj godini, a 89 % u prve dvije godine nakon liječenja. Ukupno doživljenje (OS, od eng. *overall survival*) nakon 6, 12 i 24 mjeseca od postavljanja dijagnoze udaljenih metastaza bilo je 42 %, 25 % odnosno 15 % u skupini bolesnika liječenih adjuvantnom radioterapijom, prema 37 %, 17 % i 11 % u skupini bolesnika liječenih primarnom radiokemoterapijom. OS nakon 6,12, i 24 mjeseca u bolesnika s jednom metastazom bilo je 50 %, 34 % i 22 % u odnosu na bolesnike koji su imali više organa zahvaćenih metastazama, u kojih je OS za iste vremenske intervale bio 30 %, 9 % i 4 %.

Za potvrdu dijagnoze prilikom obrade bolesnika nužna je proširena dijagnostička obrada (CT prsnog koša, scintigrafija kostiju i ultrazvuk abdomena ili PET-CT).

### *1.3. Prognostički čimbenici u bolesnika oboljelih od karcinoma usne šupljine*

Prognostički čimbenici koriste se za predviđanje ishoda bolesti. Prognostički čimbenici su podijeljeni u tri skupine:

1. čimbenici ovisni o bolesniku,
2. čimbenici ovisni o tumoru,
3. čimbenici ovisni o liječenju (118).

#### 1.3.1. Prognostički čimbenici ovisni o bolesniku

Mnogi se čimbenici, ovisni o bolesniku, smatraju kao prognostički: dob, spol, opće stanje, navike (pušenje cigareta, žvakanje duhana, konzumacija alkoholnih pića), prisutstvo drugih bolesti, socioekonomski status, rasa, genetička predispozicija (rizik za razvoj planocelularnog karcinoma glave i vrata 3,65 puta veći je ukoliko najbliži srodnik ima tumor glave i vrata) (119), imunostatus te lokalne ili sustavne komplikacije vezane uz prisustvo zloćudnog tumora (120).

##### 1.3.1.1. Dob i spol

Ishod bolesti u bolesnika s karcinomom usne šupljine pogoršava se sa starijom dobi. Bolesnici stariji od 65 godina imaju statistički značajno lošije doživljenje u usporedbi s mlađim bolesnicima, a mlađi od 40 godina imaju značajno bolju prognozu, s obzirom na uspjeh liječenja i doživljenje (121).

Prema nekim autorima iznimku predstavlja karcinom oralnog dijela jezika u bolesnika mlađih od 40 godina koji je obilježen biološki agresivnijim ponašanjem te da čak 57 % ovih bolesnika razvija recidiv, a 47 % umire od osnovne bolesti (122). Dokazali su da je u mlađih bolesnika s karcinomom jezika češći lokoregionalni recidiv te veća smrtnost u odnosu na starije bolesnike sa sličnim stadijem bolesti.

Hilly i sur. su u retrospektivnom istraživanju na 78 bolesnika (16 bolesnika mlađih od 30 godina te 62 bolesnika starija od 60 godina) dokazali statistički značajno više stope regionalnog recidiva i udaljenih metastaza u bolesnika mlađih od 30 godina (123).

Iwatsubo i sur. pokazali su povezanost mlađe dobi (< 65 godina) u bolesnika sa karcinomom glave i vrata s rizikom za istodobnu pojavu drugog primarnog tumora gornjeg aerodigestivnog sustava, što doprinosi i lošijem ishodu liječenja te ukupnom doživljenju (124). Od 1 953 bolesnika kumulativna incidencija istodobne pojavnosti karcinoma jednjaka u mlađih

bolesnika bila je značajno veća nego u bolesnika starijih od 65 godina (12,1 % prema 8,5 %). S druge strane, incidencija istodobne pojavnosti drugog primarnog karcinoma drugih sijela, bila je manja u starijih bolesnika (7,8 % prema 12,2 %).

Kao i u većine zloćudnih tumora glave i vrata, karcinom usne šupljine ima veću učestalost u muškaraca nego u žena te većina autora navodi bolju prognozu u žena (4-6). Povezanost ova dva prognostička čimbenika također vjerojatno doprinosi većoj stopi doživljenja u žena. Naime, žene su većinom mlađe dobi u trenutku postavljanja dijagnoze zloćudnog tumora (125, 126).

#### 1.3.1.2. Opće stanje bolesnika

Malnutricija u bolesnika oboljelih od karcinoma često dovodi do anemije.

Sarkopenija je negativan prognostički čimbenik u bolesnika sa karcinomom glave i vrata, bez obzira na način liječenja, iako značajniju ulogu ima u kirurški liječenih bolesnika (127).

Nekoliko je istraživanja proučavalo nutritivno stanje bolesnika i hematološke nalaze, kao odraz općeg stanja bolesnika, te njihov utjecaj na ishod liječenja.

Oya i sur. su u istraživanju na 441 bolesniku oboljelom od planocelularnog karcinoma glave i vrata pokazali važnost hematoloških parametara kao što su razina hemoglobina, broj limfocita, neutrofila, monocita i trombocita u krvi. Ista skupina autora je u drugom istraživanju uključila još i koncentraciju serumskog albumina, kao i indeksa tjelesne mase (BMI, od eng. *body mass index*) i njihov utjecaj na ishod liječenja (128, 129). Manji broj leukocita, limfocita i trombocita u krvi bili su negativni prognostički čimbenici u bolesnika sa karcinomom grkljana, povezani sa manjim OS. Utjecaj nije nađen u bolesnika sa karcinomom usne šupljine.

Moon i sur. su u prospektivnom istraživanju koje je obuhvaćalo 153 bolesnika liječenih primarnom radiokemoterapijom pokazali slične rezultate, gdje je multivarijatnom analizom dokazano da su hipoalbuminemija ( $< 3,3$  g/dl) te visoki omjer neutrofila/limfocita prije početka liječenja zasebni negativni prognostički čimbenici za doživljenje do napredovanja bolesti (PFS, od eng. *progression-free survival*) ( $P < 0,01$ ) (130). Za OS značajni su bili BMI ( $\leq 18,5$  kg/m<sup>2</sup>), status ECOG (od eng. *Eastern Cooperative Oncology Group*) i omjer neutrofila/leukocita ( $P < 0,01$ ).

Učinak liječenja anemije na ishod bolesti bio je predmet brojnih istraživanja. U dvostruko slijepom placebo kontroliranom randomiziranom istraživanju na 351 bolesniku analiziran je utjecaj eritropojetina u bolesnika koji su liječeni zračenjem. Završna točka

istraživanja bila je PFS. Relativan rizik razvoja lokoregionalnog recidiva bio je 1,62 puta veći u skupini bolesnika koji su primali eritropojetin u usporedbi s bolesnicima koji su bili liječeni samo radioterapijom. Dodatno, bolesnici koji su primili eritropojetin imali su i statistički značajno kraće doživljenje (131).

Do danas ne postoje jasni dokazi da korekcija anemije poboljšava ishod bolesti u oboljelih od karcinoma usne šupljine.

Pridružene bolesti (komorbiditeti), naprimjer - bolesti srca i perifernih krvnih žila, bubrega i pluća, mogu pogoršati tijek bolesti u bolesnika s karcinomom usne šupljine (132, 133). Bolesnici koji razviju karcinom usne šupljine, a dobivaju imunosupresivnu terapiju, imaju kraće doživljenje u odnosu na bolesnike čiji imunوسي sustav nije oslabljen (134).

U bolesnika oboljelih od karcinoma usne šupljine lošijeg socioekonomskog statusa i obrazovanja ishod bolesti je lošiji, najvjerojatnije zbog lošije higijene usne šupljine te slabije dostupnosti medicinske skrbi (135).

### 1.3.2. Prognostički čimbenici ovisni o tumoru

#### 1.3.2.1. Lokalizacija tumora

Lokalizacija tumora u bolesnika oboljelih od planocelularnog karcinoma glave i vrata utječe na prognozu, zbog različitog rizika za nastanak regionalnih metastaza u limfnim čvorovima vrata te hematogenog širenja i nastanka udaljenih metastaza, prvenstveno zbog toga što se opskrba krvlju i limfna drenaža razlikuju s obzirom na anatomsko područje. Tako karcinom jezika češće metastazira u usporedbi s karcinomima drugih područja unutar usne šupljine, iako ima izvješća koji navode da tvrdo nepce ima čak 14 puta veći rizik za nastanak metastaza u odnosu na druge podlokalizacije u usnoj šupljini (136, 137). Također, limfni putevi oralnog dijela jezika prelaze središnju liniju i izravno se dreniraju u niža područja vrata. Zbog toga ovaj tumor prate obostrane i "preskačuće" metastaze vrata (npr. metastaza u području III ili IV bez zahvaćenih viših područja vrata), u odnosu na druge podlokalizacije usne šupljine (138).

Rizik za pojavu regionalnih metastaza progresivno se povećava od naprijed prema straga (od usnice prema orofarinksu) te od medijalne linije prema lateralno, u odnosu na smještaj primarnog tumora (93, 136).

### 1.3.2.2. Dubina invazije i debljina tumora

Promjer tumora (T-stadij) smatra se prognostičkim u odnosu na pojavu regionalnih metastaza i doživljenje, no brojna istraživanja potvrdila su da dubina invazije tumora (DOI, od eng. *depth of invasion*) bolje korelira s prognozom ishoda bolesti u bolesnika s intraoralnim karcinomom, što je jedan od razloga za novim 8. izdanjem klasifikacije AJCC/UICC TNM (139). Mnogi su autori dokazali da su debljina tumora iznad 4 milimetra te invazija mišićnog sloja u ranom karcinomu usne šupljine negativni prognostički čimbenici, povezani s češćom pojavom lokalnog recidiva, regionalnih metastaza i kraćim doživljenjem (140-142).

Postoje istraživanja čiji rezultati nisu išli u prilog važnosti uloge dubine invazije tumora kao negativnog prognostičkog čimbenika ranih stadija karcinoma usne šupljine te se nije moglo odrediti graničnu vrijednost debljine tumora koja bi bila prognostička u odnosu na pojavu okultnih metastaza vrata u bolesnika s početnim karcinomom oralnog dijela jezika (143).

Mnogi autori ispituju vrijednost i pouzdanost novih kriterija klasifikacije ranih stadija tumora usne šupljine (T1-T2, N0) određenih u 8. izdanju klasifikacije TNM.

U nedavnom istraživanju Kano i sur. primijetili su da je kategorija T3 homogena, budući da se krivulje doživljenja vezanog uz bolest (DSS, od eng. *disease specific survival*) gotovo preklapaju u bolesnika sa karcinomima prethodno svrstanih u kategorije T2, T3 i T4a prema 7. izdanju, a sada klasificirani na temelju dubine invazije u T3 (144). Tumori jezika s površinskim promjerom između 2 i 4 centimetra (prije T2) često imaju DOI > 10 mm i stoga su sada klasificirani kao tumori T3. Nije nađena značajna razlika u DSS-u u bolesnika s tumorom jezika T1 ili T2, što nije u skladu sa namjenom klasifikacije TNM.

I drugi autori došli su do sličnog zaključka - da se postigla dobra stratifikacija između početnih i uznapredovalih stadija karcinoma usne šupljine, ali da je stratifikacija nezadovoljavajuća kada se diferencira T1 od stadija bolesti T2N0 (145).

### 1.3.2.3. Volumen tumora

Porastom volumena tumora raste i rizik lokalnog recidiva (146). Volumen tumora, određen s tri vrijednosti bolje korelira s prognozom bolesti u odnosu na stadij T, koji je definiran jednom dimenzijom (najveći promjer) (147).

Jang i sur. su u istraživanju koje je obuhvatilo 295 bolesnika s karcinomom usne šupljine, orofarinksa i hipofarinksa pokazali da u karcinomu usne šupljine dimenzije tumora (najveći promjer, debljina i volumen tumora) bolje koreliraju s pojavom regionalnih metastaza i doživljenjem u usporedbi s histološkim obilježjima tumora (perineuralna/limfovaskularna



invazija, stupanj diferencijacije). Ovi su čimbenici važniji za procjenu metastatskog potencijala karcinoma orofarinksa i hipofarinksa (148).

#### 1.3.2.4. Stadij N

Status limfnih čvorova je najvažniji prognostički čimbenik u oboljelih od karcinoma usne šupljine (57, 58). Unatoč negativnom nalazu kliničkog pregleda i radioloških metoda, dio bolesnika razviti će regionalne metastaze. Ne postoji pouzdan dijagnostički postupak kojim je moguće dokazati mikrometastaze (nakupine tumorskih stanica < 3mm) u regionalnim limfnim čvorovima, a histološkim pregledom pouzdanije su metode imunohistokemije i molekularna analiza od hematoksilina i eozina (149).

Prisutnost regionalnih metastaza značajno smanjuje stopu doživljenja bolesnika (približno 50 %), a uz njih se dvostruko češće javljaju i udaljene metastaze (150). Stoga je precizno određivanje statusa limfnih čvorova vrata nužno za planiranje i uspješno provođenje liječenja. Nedavno objavljena metaanaliza 19 istraživanja s ukupno 1 567 bolesnika koja su proučavala okultne metastaze ranih stadija (T1 i T2) karcinoma usne šupljine pokazala je da su metastaze prisutne u 24,4 % bolesnika (151).

Na ishod bolesti ima utjecaj i broj zahvaćenih limfnih čvorova kao i proboj čahure limfnog čvora (ekstrakapsularno širenje) (152).

#### 1.3.2.5. Histološke značajke primarnog tumora

##### 1.3.2.5.1. Stupanj diferenciranosti

Histološki stupanj diferenciranosti tumorskih stanica važan je prognostički čimbenik kliničkog i biološkog ponašanja tumora te ishoda bolesti u bolesnika s karcinomom usne šupljine. Histopatološku klasifikaciju stupnjeva diferencijacije prvi je opisao Broders na planocelularnom karcinomu usnice i temelji se na razlici u stupnju diferenciranosti tumorskih stanica (153). Kasnije su Anneroth i sur. uveli multifaktorski sustav koji uključuje i druga obilježja tumora kao što su obrasci invazije i upalni odgovor tkiva (154).

Aurora i sur. dokazali su da je stupanj diferenciranosti planocelularnog karcinoma usne šupljine nezavisan prognostički čimbenik za nastanak metastaza limfnih čvorova vrata ( $P=0,028$ ), uz drugih šest histoloških obilježja tumora: dubinu invazije, perineuralnu invaziju, limfovaskularnu invaziju, limfocitni odgovor i tumorsko pupanje (155).

U nedavnom preglednom članku autori također naglašavaju važnost drugih histoloških obilježja tumora koji nadopunjuju prognostičku važnost stupnja diferencijacije tumorskih stanica (156).

U istraživanju koje je obuhvatilo 45 bolesnika s karcinomom jezika T1/T2N0, analizom različitih kliničkih i histoloških čimbenika Sparano i sur. su pokazali da su stadij T2, slaba diferenciranost tumora, infiltrativni način rasta s infiltracijom u mišić, perineuralna/limfovaskularna invazija prediktori za pojavu okultnih metastaza vrata (157).

#### 1.3.2.5.2. Perineuralna i limfovaskularna invazija

Perineuralna invazija definira se kao prisutnost stanica tumora u najmanje 1/3 opsega živca. Praćena je bolom, trncima, atrofijom mišića u slučaju denervacije, slabošću mišića za izražaj lica i žvakanje ako su invadirani facijalni ili trigeminalni živac te pojavom odgođenih metastaza (158). Nerijetko, bolesnici s perineuralnom invazijom mogu biti bez simptoma.

Perineuralna invazija posljedica je tropizma tumorskih stanica prema živčanim snopovima u stromi i povezana je s agresivnim biološkim ponašanjem, sklonošću recidivu i kraćim doživljenjem (159, 160).

Matsushita i sur. su pokazali da je perineuralna invazija statistički značajno povezana s većom učestalošću regionalnih metastaza te kraćim doživljenjem u bolesnika s karcinomom jezika (161). Slične rezultate za karcinom usne šupljine potvrdila su i druga izvješća (162, 163). Slične rezultate prikazali su i drugi autori u multivarijantnoj analizi te dokazali da je perineuralna invazija statistički značajan, nezavisan prognostički čimbenik doživljenja i DFS-a u 161 bolesnika s uznapredovalim karcinomom jezika i dna usne šupljine (164). Isti autori pokazali su da prisutnost perineuralne invazije u karcinomu nije povezana s podlokalizacijom tumora usne šupljine.

Međutim, postoje rezultati istraživanja koji nisu potvrdili važnost perineuralne invazije u prognozi bolesti.

Chen i sur. u retrospektivnom istraživanju koje je obuhvatilo 442 bolesnika s početnim karcinomom usne šupljine, nisu potvrdili prognostičku važnost perineuralne i limfovaskularne invazije za ishod bolesti (165).

Saidak i sur. su u nedavnom preglednom članku pokazali da je perineuralna invazija rezultat složenih molekularnih mehanizama te da je pouzdan dokaz agresivne biologije tumora (166).

Limfovaskularna invazija također je negativan prognostički čimbenik za ishod bolesti bolesnika s karcinomom usne šupljine.

To su dokazali Huang i sur. u metaanalizi koja je uključila 36 istraživanja objavljenih između 1991. i 2019. godine, s ukupno 17 109 bolesnika oboljelih od planocelularnog karcinoma usne šupljine. Dokazano je da je limfovaskularna invazija nezavisan prognostički čimbenik za nastanak metastaza u limfnim čvorovima vrata (OR=5,34; 95 % CI, 3,44-8,30;  $P<0,00001$ ), te negativno utječe na OS (HR=1,55; 95 % CI, 1,43-1,69;  $P<0,0001$ ) i na DSS (HR=1,76, 95 % CI, 1,48-2,09;  $P<0,00001$ ) (167).

#### 1.3.2.5.3. Neoangiogeneza

Neoangiogeneza je proces nastanka novih krvnih žila iz postojećih, a proces je koji se često događa u zloćudnim tumorima. Njihov se nastanak smatra ključnim za invazivan rast i metastaziranje tumora (168-170). Gustoća mikrovaskularne mreže (MVD, od eng. *microvessel density*) posredni je pokazatelj tumorske angiogeneze i može imati prognostičku vrijednost za OS i DFS u bolesnika s karcinomom usne šupljine.

Promjer novostvorenih krvnih žila određuje stupanj agresivnosti tumora; veći je promjer povezan s višim stopama metastatske bolesti (171).

Nekoliko istraživanja dokazuje značajnu povezanost između veličine planocelularnog karcinoma usne šupljine, recidiva bolesti i prisutnosti metastaza u vratu i MVD (172,173).

Međutim postoje i proturječni rezultati (174-176) koji se objašnjavaju prvenstveno nestandardiziranim načinom evaluacije neoangiogeneze kao i „bukom“ koju stvara bogata vaskularizacija sluznice usne šupljine, što dodatno otežava razlikovanje postojećih od novostvorenih krvnih žila.

Benevenuto i sur. uspoređivali su izražaj Ki-67 (indeks proliferacije) i von-Willenbrandovog čimbenika u 20 mlađih i 20 starijih bolesnika oboljelih od karcinoma jezika. Nisu dokazali povezanost stanične proliferacije i indeksa angiogeneze sa stadijem bolesti ili stupnjem diferencijacije stanica karcinoma (177).

#### 1.3.2.6. Biljezi potvrđeni imunohistokemijskim postupkom

Imunohistokemijski postupak (IMH) se u kliničkoj medicini koristi za identifikaciju i razumijevanje značaja izraženih biljega za predviđanje biološkog ponašanja karcinoma. Ovim se postupkom određuje izraženost i smještaj ciljnih bjelančevina u tkivu, koristeći specifična protutijela (178). Postupkom IMH identificiran je velik broj biljega koji su povezani s

prognozom oboljelih od karcinoma usne šupljine. Rezultati su ponekad proturječni. Razlike u rezultatima istraživanja moguće je objasniti razlikama u postupcima procjene izraženosti molekulskih biljega te ograničenjima vezanima uz primjenu postupka, kao i složenošću procesa karcinogeneze (179). Da bi se odredila prognostička snaga biljega potrebno je pažljivo osmisliti istraživanje i jasno definirati kriterije za „pozitivan“ ili „negativan“ rezultat, za svaki pojedini biljeg. S druge strane, postoji značajna heterogenost između eksperimentalnih postupaka i u literaturi se ne nalaze jedinstvene preporuke vezane za definiranje granične vrijednosti koje se smatraju pozitivnima (eng. *cut-off value*). U nedostatku jedinstvenih kriterija, procjena obojenja u reakcijama IMH-a najčešće se određuje arbitrarno. Moguće je da neusuglašeni kriteriji određivanja pozitiviteta, mijenjaju i izračune vezane uz preostale parametre, što dodatno otežava procjenu prognostičke vrijednosti biljega određenoga ovim postupkom (179, 180).

#### 1.3.2.7. Molekulski biljezi

IMH se koristio u brojnim istraživanjima za određivanje izraženosti mnogih bjelančevina. Biljezi stanične proliferacije koriste se više od desetljeća kao pokazatelji zloćudnosti, ali bez jasne poveznice sa kliničkim obilježjima bolesti. Određivanje značenja izraženosti molekulskih biljega u zloćudnim tumorima, pridonosi boljem razumijevanju biologije tumora te može pridonijeti predviđanju tijeka bolesti, a time biti važni i u odabiru načina liječenja. Također, biljezi povezani sa zloćudnom transformacijom mogu biti terapijski ciljevi davanjem genske terapije ili inhibitora tih biljega.

Neki molekulski biljezi, za sada su to tumorska bjelančevina p53, EGFR i jedan od njegovih liganada, transformirajući čimbenik rasta alfa (TGF- $\alpha$ , od eng. *transforming growth factor alpha*), Ki-67 te ciklin D1, obećavajući su prognostički biljezi za planocelularne karcinome glave i vrata (180-185). EGFR je član obitelji receptora s tirozin kinaznom aktivnošću. Ova skupina receptora nakon vezanja liganda (npr. EGF ili TGF- $\alpha$ ), započinje proces unutarstaničnog prijenos signala s posljedičnom staničnom proliferacijom.

Shah i sur. pokazali su nižu stopu OS-a za bolesnike s karcinomom usne šupljine s tumorima pozitivnima na p53 (58 %) prema onima s p53 negativnim tumorima (25 %,  $P=0,0009$ ) (186). Pretvarač signala i aktivator transkripcije 3 (STAT3, od eng. *signal transducer and activator of transcription 3*) bio je negativan prognostički čimbenik za OS za bolesnike s ranim stadijima karcinoma ( $P=0,042$ ). Kaplan-Meierova krivulja doživljenja pokazala je da 33 % bolesnika s ranim stadijem karcinoma umre od bolesti, u usporedbi s

bolesnicima bez tumorskog nuklearnog STAT3, koji su imali smrtni ishod u 9 % (log-rank=4,89;  $P=0,027$ ).

Randomizirano istraživanje faze III (RTOG51) pokazalo je da se visoka izraženost EGFR-a, kao molekuskog biljega planocelularnog karcinoma usne šupljine, mogla povezati sa značajno kraćim doživljenjem i DFS-om (187). Zna se da prijenos signala posredovan EGFR-om u konačnici potiče pokretljivost stanica, i stvaranje novih krvnih žila, a oslabljuje međustaničnu adheziju. Ovi su procesi zaslužni za invazivan rast i metastaziranje tumora. Zbog toga ne čudi da se u multivarijantnom modelu EGFR pokazao kao neovisan čimbenik doživljenja i pojave lokoregionalnog recidiva (188).

Receptori s tirozin kinaznom aktivnošću sudjeluju u koordiniranju apoptoze i angiogeneze, te reguliranju stanične proliferacije, a razumijevanje tih procesa i njihove uloge dovelo je do razvoja nekoliko načina liječenja koji djeluju na signalni put potaknut s EGFR.

Cetuksimab, kimerično monoklonsko protutijelo koje se visokim afinitetom veže za izvanstanični dio EGFR-a, sprječavajući time vezivanje liganda, dovodi do inaktivacije funkcije liganda. Primjena cetuksimaba uz radioterapiju u bolesnika s lokalno uznapredovalim planocelularnim karcinomom glave i vrata ima učinkovito djelovanje. Ono je pokazano kroz statistički značajan pozitivan učinak na lokoregionalni nadzor bolesti i produljenje ukupnog doživljenja u usporedbi sa samostalno provedenim zračenjem (189, 190). S druge strane cetuksimab uz kemoterapiju nije doveo do značajno boljeg ishoda bolesti.

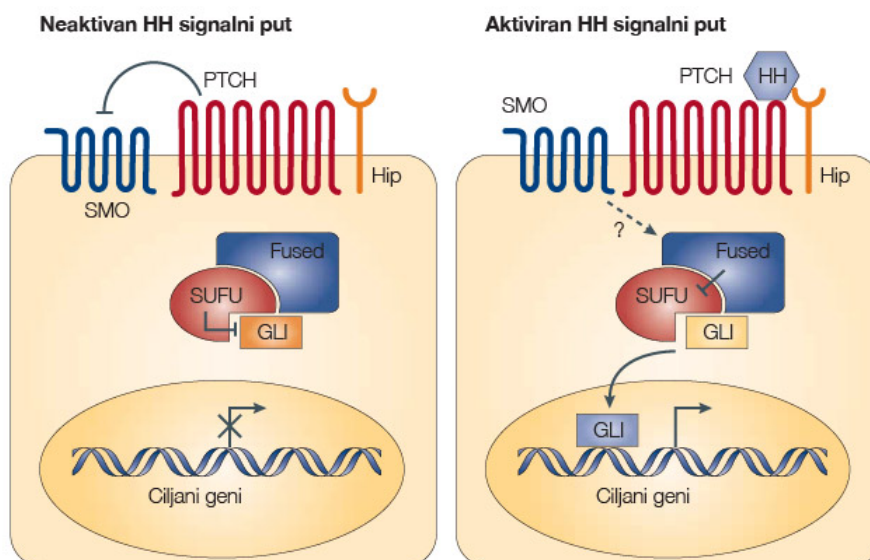
#### 1.3.2.8 Molekule Hedgehoga signalnoga puta

Hedgehog (HH) je signalni put uključen u embrionalni razvoj te proliferaciju i diferencijaciju stanica brojnih tkiva: okusnih papila jezika, sluznice usne šupljine, žlijezda slinovnica, zuba i primitivnog crijeva (191-194). Također regulira EMT stanica uz pomoć liganada HH, a za EMT je pokazano da ima ulogu u rezistenciji liječenju i lošijem ishodu bolesti u bolesnika sa karcinomom usne šupljine (195-197).

Istraživanje signalnog puta HH počelo je 1980. godine radom Nüsslein-Volharda i Wieschausa, koji su identificirali više gena u vinske mušice (lat. *Drosophila melanogaster*) (198). Jedan od gena koji svojom mutacijom utječu na poremećaj u razvoju jest HH.

Cohen je 2003. godine opisao složeno međudjelovanje niza gena i bjelančevina puta HH koji stvaraju „signalnu mrežu HH“ i tako utječu na nastanak mutacija koje dovode do raznih bolesti kao što su holoprosencefalija, Gorlin-Goltzov sindrom, Pallister-Hallov sindrom, Rubinstein-Taybijev sindrom, karcinom bazalnih stanica i meduloblastom (199).

Signalizacija HH počinje aktivacijom jednoga od tri izomera prisutna u ljudskom tkivu, SHH (od eng. *Sonic Hedgehog*), IHH (od eng. *Indian Hedgehog*), DHH (od eng. *Desert Hedgehog*), i njihovim vezivanjem na transmembranski receptor PTCH (od eng. *Patched*) (199-201). Nakon vezivanja, PTCH otpušta drugu transmembransku bjelančevinu, do tada neaktivnu, Smoothened (SMO), koja signal prenosi do stanične jezgre gdje pokreće niz intranuklearnih lančanih reakcija vezivanjem i aktivacijom GLI transkripcijskih čimbenika (GLI1, GLI2, GLI3), koji su pak regulirani od strane SUFU (od eng. *Supressor of Fused*) (**slika 2.**). Čimbenici GLI zatim započinju transkripciju ciljnih gena uključenih u procese staničnog ciklusa, staničnu proliferaciju (ciklin D1, MYC, i EGF), staničnu migraciju i invaziju, angiogenezu (VEGF i PDGF, od eng. *platelet-derived growth factor*), genomsku nestabilnost i mutacije, potiču upalu povezanu s tumorom, djeluju na supresore rasta i apoptozu (**slika 3.**). Nekoliko je istraživanja identificiralo dodatne bjelančevine uključene u GLI regulaciju signalnog puta HH (202, 203). Uz SUFU je najvažnija druga tako prepoznata bjelančevina KIF7 (od eng. *kinesin family member 7*). SUFU negativno regulira signalizaciju HH, tako što u citoplazmi zadržava sve tri GLI bjelančevine.



**Slika 2.** Hedgehog signalni put (204)



**Slika 3.** Mehanizmi djelovanja Hedgehoga signalnoga puta

Signalizacija HH prvi put je povezana s razvojem zloćudnog tumora kada je nađena mutacija u genu koji kodira bjelančevinu PTCH, u Gorlin-Goltzovom sindromu, autosomno-dominantnom genetičkom poremećaju obilježenom mnogobrojnim bazocelularnim karcinomima kože, meduloblastomom i rabdomiosarkomom (205, 206).

Neke studije već su istraživale povezanost određenih molekula/bjelančevina signalnog puta HH s planocelularnim karcinomom usne šupljine.

Wang i sur. su IMH-om pokazali jaču izraženost SHH, GLI1 i PTCH u uzorcima tkiva karcinoma usne šupljine u odnosu na zdravu sluznicu usne šupljine u 40 bolesnika uključenih u studiju (207). Jaču izraženost molekule SHH nije uvijek pratila veća izraženost PTCH i GLI1, što implicira da postoje dodatni kontrolni mehanizmi uključeni u aktivaciju signalizacije HH. Univarijatnom analizom (log-rank test) bolesnici čiji su tumori označeni kao PTCH i GLI1 pozitivni (jača obojenost IMH) imali su nižu stopu OS-a ( $P=0,02$ ,  $P=0,002$ ). U svom istraživanju nisu dobili dovoljno snažnu imunoreakciju SMO da bi je mogli nazvati pozitivnom te su zaključili da se GLI1 može aktivirati i neovisno o SMO-posredovanom signalnom putu, što odgovara nalazu studija o karcinomu jednjaka i gušterače (208, 209).

Schneider i sur. istražili su i usporedili izraženost puta SHH u planocelularnom karcinomu kože i sluznica glave i vrata u 56 bolesnika (210). Rezultati su pokazali jači izražaj

GLI1, PTCH, SMO i SHH u tkivu zahvaćenom karcinomom. PTCH i SMO pokazali su jaču izraženost u planocelularnom karcinomu kože nego u sluznici glave i vrata. Univarijatna analiza pokazala je da umjereno pojačan izražaj SHH negativno utječe na ukupno doživljenje ( $P < 0,001$ ). Multivarijatna analiza nije pokazala niti jedan prognostički čimbenik koji bi utjecao na OS. Činjenicu da bolesnici čiji tumori imaju umjereno izražen SHH u odnosu na one koji imaju jako izražen imaju kraće doživljenje, vjerojatno se može objasniti malim uzorkom bolesnika.

U nedavnoj studiji Richtig i sur. istraživali su izraženost SMO, GLI1, p53 i p16 u tumorima na imunohistokemijski obojena 98 patološka uzorka kirurški liječenih bolesnika s dijagnozom planocelularnog karcinoma glave i vrata (211). Prema jačini imunohistokemijske reakcije uzorci su bili podijeljeni u dvije skupine - pozitivnu i negativnu. Pozitivna imunoreakcija za SMO i GLI1 nađena je u 20 (20,4 %) odnosno 52 (53,1 %) uzorka. Izraženost SMO korelirala je s izraženosti GLI1 ( $P=0,01$ ) u univarijatnoj analizi kao i multivarijatnoj ( $P=0,007$ ). U univarijatnoj analizi jaka izraženost SMO bila je povezana s duljim OS-om ( $HR=0,56$ , 95 %  $CI=0,32-0,98$ ;  $P=0,044$ ) i DFS-om ( $HR=0,53$ , 95%  $CI=0,3-0,95$ ;  $P=0,034$ ) i to je bio jedini statistički značajan čimbenik od ispitivanih. U multivarijatnoj Coxovoj regresijskoj analizi izraženost SMO potvrdila se kao nezavisni pozitivni prognostički čimbenik za OS ( $HR=0,49$ , 95 %  $CI=0,24-0,98$ ;  $P=0,043$ ) i DFS ( $HR=0,45$ ; 95 %  $CI=0,22-0,96$ ;  $P=0,037$ ). Pozitivna izraženost GLI1 bila je češća u skupini bolesnika s potvrđenim metastazama u limfnim čvorovima vrata ( $P=0,089$ ), a za stadij T ta povezanost je bila statistički značajna ( $P=0,035$ ), uz češću izraženost u uznapredovalim stadijima. Bolesnike su dodatno podijelili u dvije skupine prema izraženosti p16 u uzorcima ( $N=65$ ; 66,3 % negativnih i  $N=28$ ; 28,6 % pozitivnih). U tim skupinama izraženost GLI1 nije imala nikakvog učinka na ishod bolesti, dok je slaba imunohistokemijska izraženost SMO u p16 pozitivnim karcinomima povezana sa duljim OS-om ( $P=0,019$ , log-rank test) i duljim DFS-om ( $P=0,015$ , log-rank test).

De Faro Valverde i sur. su u istraživanju 2016. godine naglasili ulogu makrofaga i endotelnih stanica u neoangiogenezi karcinoma usne šupljine, kroz aktivaciju signalnog puta HH (212). Cilj studije je bio istražiti izraženost molekula HH, prikazati ako postoji povezanost i utjecaj na klinička obilježja karcinoma usne šupljine te na angiogenezu i makrofage CD163+. Na uzorcima 28 tumora IMH-om se pratila jačina imunoreakcije bjelančevina SHH, IHH, GLI1, CD163 i CD105, s time da su radili i dvostruko imunohistokemijsko bojanje na SHH/CD163, IHH/CD163 i GLI1/CD163. SHH i IHH bili su izraženi prvenstveno u citoplazmi tumorskih stanica, dok je GLI1 bio izražen u citoplazmi i jezgri. Jačinu imunoreakcije odredili su prema ukupnom broju obojenih stanica i metodom semikvantifikacije: kao negativnu



reakciju ako nije došlo do imunohistokemijske reakcije, ako je bilo reakcije u < 5 % stanica označene su kao 1+ , s 5-25 % pozitivnih stanica označene su kao 2+, 26-50 % kao 3+, a s 51-75 % kao jačinom imunoreakcije 4+. U tumorskom tkivu bjelančevina SHH je bila izražena u citoplazmi u 89,28 % (N=25) uzorka, s jačinom imunohistokemijske reakcije 4+ kao najviše zastupljenom (N=17; 68 %), zatim redom 3+ (N=5; 20 %), 1+ (N=2; 8 %) i 2+ (N=1; 4 %). Dvadeset i dva uzorka (78,57 %) imala su pozitivnu reakciju na IHH protein, s najviše zastupljenim jačim obojenjima 4+ (N=7; 31,82 %) i 3+ (N=7; 31,82 %) potom 1+ (N=5; 22,72 %) i 2+ (N=3; 13,64 %). Iako je IHH uglavnom bio izražen u citoplazmi, u 3 (13,64 %) uzorka bio je prisutan i u membrani tumorskih stanica. GLI1 je pokazao pozitivitet u 24 (85,72 %) tumorska parenhima, s prevladavajućom jakom reakcijom 4+ (N=15; 62,5 %), potom 3+ (N=7; 29,16 %) i 1+ i 2+ pozitivitetom reakcije u po jednom uzorku (4,17 %). GLI1 je bio pozitivan i u endotelnim stanicama, što kao i dokazana prisutnost IHH u makrofazima CD163+, pridonosi tumorskoj angiogenezi (213, 214). Molekule HH pokazale su pozitivnu reakciju u devet dodatno analiziranih rubova resekcije bez tumora (SHH u 66,66 %; IHH u 88,88 %; GLI1 u 77,77 %).

Taj rezultat ide u prilog ranije izloženoj teoriji Leovića i sur. o „kancerizaciji polja“, prema kojoj određena područja planocelularnog karcinoma glave i vrata, izložena kancerogenim tvarima (alkohol i duhan) kroz dulje vremensko razdoblje postaju genetski promijenjena područja sposobna za daljnji poticaj nastanka karcinoma, stoga je i okolna „zdrava“ sluznica promijenjena i ne može se koristiti kao negativna kontrola u ovakvim istraživanjima (215).

Da je signalni put HH aktivan i u epitelnoj displaziji usne šupljine, pokazali su Borges Dias i sur. na 25 bolesnika (216). Promatrali su izraženost SHH, PTCH, HIP (od eng. *Hedgehog-interacting protein*), SUFU, GLI1 i ciklin D1, a uz displaziju kao uzorak uzeli su i dijelove sluznice s fibroznom displazijom, hiperkeratozom te zdravu sluznicu. Epitelna displazija pokazala je pozitivnu imunoreakciju na SHH u 14 (56 %) uzoraka, umjerene jačine (2+), na PTCH u 23 (92 %) uzoraka sluznice, SUFU u 11 (44 %) od kojih je 36 % imalo jako izraženu reakciju 3+, dok je HIP bio pozitivan u 68 % uzoraka, a GLI1 u 21 (84 %) uzorku epitelne displazije usne šupljine te je pozitivitet bio izražen u jezgri, što potvrđuje rezultate drugih istraživanja. Ovim istraživanjem pokazano je da signalni put HH sudjeluje u početnim stadijima razvoja karcinoma, a zanimljivo je da su većinom bile displazije blagog stupnja (N=21, 84 %).

Osim stanica karcinoma usne šupljine, stromalne stanice i fibroblasti (CAF, od eng. *cancer associated fibroblasts*) također iskazuju pozitivitet na bjelančevine HH. To je dokazalo istraživanje iz 2020. godine na 70 patohistoloških uzoraka planocelularnog karcinoma usne

šupljine (217). U citoplazmi fibroblasta dokazan je imunoreaktivni SHH (N=39; 55,72 %), iako blage reakcije 1+ te u 91,64 % (N=64) tumorskih stanica, jačine imunohistokemijskog „obojenja“ 3+, dok je za GLI1 iskazana nuklearna i citoplazmatska imunoreakcija u CAF-u (N=31; 44,29 %), u tumorskim stanicama bila je češća (N=23; 74,2 %), iako blago pozitivna.

Dourado i sur. nedavno su u svom istraživanju pokazali da je veća gustoća CAF-a negativan prognostički čimbenik povezan s uznapredovalim stadijem tumora u trenutku dijagnoze, većom stopom lokoregionalnih recidiva, većom dubinom invazije, perivaskularnom i perineuralnom invazijom, ENE te lošijim OS-om (218). Ti rezultati doprinose shvaćanju posredne uloge molekula HH u nastanku zloćudnih tumora.

Postoje istraživanja koja ciljaju molekule HH kao terapijske mogućnosti u liječenju karcinoma. Ciklopamin i GANT61 mogli bi inhibirati HH/GLI1 aktivaciju u stanicama karcinoma glave i vrata. Yan i sur. primjenili su ciklopamin, čije je glavno djelovanje antagonističko na SMO u stanicama planocelularnog karcinoma usne šupljine te je zabilježena manja stanična proliferacija (219). Autori zaključuju da je to mogućnost koju treba dodatno ispitati i za sada nema kliničku primjenu.

Vismodegib i sonidegib jedini su odobreni lijekovi od strane FDA (od eng. *Food and Drug Administration*) u SAD-u. Selektivno djeluju na signalni put SHH, kao inhibitori SMO, što kao posljedicu ima neaktivne transkripcijske čimbenike GLI, a to pak sprječava prijepis ciljnih gena aktiviranih signalizacijom HH uključenih u tumorski rast i razvoj (220, 221). Vismodegib se koristi u bolesnika s lokalno uznapredovalim bazocelularnim karcinomom (a koji nisu kandidati za kirurško ili radioterapijsko liječenje ili ako se radi o neoperabilnom recidivu nakon primarnog kirurškog liječenja) ili metastatskim bazocelularnim karcinomom.

Signalni put HH i njegova uloga u nastanku karcinoma i dalje su predmet istraživanja mnogih predkliničkih istraživanja, uz dodatni interes kao terapijske mogućnosti. Iako je dobro istražen mehanizam staničnih procesa koje SHH pokreće, njegova uloga u karcinomu usne šupljine nije dovoljno istražena.

Većina objavljenih studija koje istražuju povezanost HH molekula i planocelularnog karcinoma usne šupljine na manjem su broju bolesnika, što autori navode kao nedostatak te ne povezuju izraženost molekula signalnog puta HH s patohistološkim i kliničkim svojstvima tumora. Zbog toga je nejasna uloga tih molekula kao prognostičkih čimbenika u planocelularnom karcinomu usne šupljine. Također, uglavnom su istražene samo neke od „kaskada“ signalizacije, a ne sve četiri bjelančevine ključne za provođenje signala do stanične jezgre i početak prijepisa ciljnih gena.

### 1.3.3. Prognostički čimbenici ovisni o liječenju

Liječenje tumora glave i vrata često je klinički izazov, s obzirom da više od 60 % bolesnika ima lokalno uznapredovalu bolest u trenutku postavljanja dijagnoze. Multimodalno liječenje koje uključuje kirurško liječenje, radioterapiju i kemoterapiju općenito je preporučljivo i postalo je standard liječenja (223). Izbor načina liječenja za T1-T2N0 karcinome usne šupljine uglavnom je kirurška resekcija tumora, dok se za više stadije bolesti savjetuje spomenuti multimodalni pristup (224).

O prognostičkim čimbenicima ovisnima o liječenju (osobito kirurškom) teže je govoriti u odnosu na prethodno analizirane čimbenike, s obzirom na to da na njih utječu posebni terapijski postupci ili odstupanja u tijeku liječenja, razlike u primijenjenim tehnikama i utjecaj oblika liječenja (način frakcioniranja te ukupna doza zračenja, vrsta, doza i intenzitet kemoterapije ili vrijeme primjene) koji mogu utjecati na ishod bolesti i doživljenje bolesnika (225).

U nedavnom istraživanju Stromberger i sur. zaključili su da u bolesnika starije dobi (>75 godina) utjecaj na ishod liječenja imaju komorbiditeti bolesnika i PS. Od ukupno 271 bolesnika u istraživanju (medijan dobi 74 godine), od kojih je 90 % imalo kasni stadij bolesti III/IV, 53,1 % bolesnika primarno je zračeno, a 32,1 % je liječeno adjuvantnom radioterapijom ili radiokemoterapijom (226). Medijan ukupnog doživljenja bio je značajno veći u bolesnika koji su liječeni adjuvantnom terapijom ( $P=0,008$ ).

Kad se promatraju doze i način frakcioniranja, primjena hiperfrakcioniranja u odnosu na konvencionalni oblik frakcioniranja povezana je s duljim doživljenjem oboljelih od karcinoma usne šupljine (74).

Luryi i sur. su u retrospektivnom istraživanju na 6 830 bolesnika sa stadijem I i II, dokazali više stope doživljenja u bolesnika kojima je učinjena elektivna disekcija vrata te u liječenih u akademskim/istraživačkim institucijama. Niže stope doživljenja zabilježene su u bolesnika s pozitivnim rubom resekcije te onih koji su bili liječeni adjuvantnim zračenjem ili kemoterapijom (227). Visoka učestalost pozitivnog ruba resekcije bila je povezana s podlokalizacijom primarnog tumora, sa stadijem bolesti, stupnjem zrelosti tumora, ali i s liječenjem u neakademskim institucijama te u ustanovama u kojima se operira malen broj bolesnika s intraoralnim karcinomom. Autori su zaključili da se učestalost pozitivnog ruba resekcije može koristiti za određivanje kvalitete onkološkog liječenja zdravstvenih ustanova koje se bave liječenjem početnog karcinoma usne šupljine (228).

Kirurška tehnika važan je čimbenik za ishod liječenja, duljinu boravka bolesnika u zdravstvenoj ustanovi, manji morbiditet te posljedično bolji funkcionalni oporavak bolesnika

u smislu urednog disanja, žvakanja i gutanja te govora. U zadnje vrijeme u nekim zdravstvenim ustanovama potiču se manje invazivne metode liječenja kao što su kirurgija laserom i transoralna robotska kirurgija (TORS, od eng. *transoral robotic surgery*) koje zbog kirurškog pristupa zahtijevaju manje operativno polje i time su manje traumatske za bolesnika (229, 230). Često je prilikom resekcije tumora usne šupljine potrebna i mandibulektomija (marginalna ili segmentalna). Nakon operacije i adjuvantne radioterapije mjesto resekcije u većem je riziku za nastanak nekroze mekog tkiva i mandibule te nastanak trizmusa, a to se dogodi u 12 % bolesnika nakon liječenja karcinoma usne šupljine (231). Kao posljedica ovih komplikacija javlja se otežano žvakanje i gutanje, uz mogućnost nastanka aspiracije hrane u pluća te potreba za daljnjim hranjenjem putem nazogastrične sonde, što pak dovodi do lošijeg nutritivnog stanja bolesnika i time posredno lošijeg ishoda liječenja (232, 233).

## **2. HIPOTEZA**

Pojačana izraženost molekula Hedgehoga signalnoga puta negativan je prognostički čimbenik u bolesnika s planocelularnim karcinomom usne šupljine.

### **3. CILJEVI RADA**

#### *3.1. Opći cilj*

Cilj ovog retrospektivnog istraživanja bio je istražiti odnos izraženosti bjelančevina SHH, PTCH, SMO i GLI1 u tkivu planocelularnog karcinoma usne šupljine i pojave lokalnog i regionalnog recidiva tumora, odnosno OS-a.

#### *3.2. Specifični ciljevi*

1. Odrediti izraženost bjelančevina SHH, PTCH, SMO i GLI1 u tkivu tumora u skupini bolesnika s planocelularnim karcinomom usne šupljine.
  
2. Istražiti odnos izraženosti navedenih molekula i:
  - a) kliničkih obilježja (dob, spol, cTNM, podlokalizacija tumora)
  - b) patohistoloških obilježja tumora (pTNM, stupanj diferenciranosti, veličina, perineuralna i perivaskularna invazija, proboj čahure limfnih čvorova)
  
3. Odrediti vrijeme do recidiva (DFS), odnosno do smrti izazvane bilo kojim uzrokom (OS) u istoj skupini bolesnika.
  
4. Istražiti nezavisnu povezanost između izraženosti bilo koje od navedenih signalnih bjelančevina u tkivu tumora i kliničkog ishoda (OS, DFS).

## 4. ISPITANICI I POSTUPCI

### 4.1. Ispitanici

U ovom retrospektivnom kohortnom istraživanju koristila su se tkiva planocelularnog karcinoma usne šupljine bolesnika koji su bili liječeni primarno kirurški u razdoblju od 1. siječnja 2006. do 31. prosinca 2010. godine u Klinici za kirurgiju lica, čeljusti i usta Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kliničke bolnice Dubrava. U istraživanje je uključeno 120 bolesnika s novodijagnosticiranim i histološki potvrđenim planocelularnim karcinomom usne šupljine, kliničkog stadija bolesti T1-T3N0 (prema 8. izdanju AJCC/UICC) (40, 41). Bolesnici u kojih je radioterapija korištena kao elektivni postupak, u slučajevima kada metastaze u limfnim čvorovima vrata nisu bile klinički evidentne (cN0) nisu uključeni u ovo istraživanje.

U odnosu na izraženost ciljanih molekula signalnog puta HH (SHH, PTCH, SMO i GLI1), s obzirom da se ispituje izraženost molekula kao prognostički čimbenik, ispitivanu skupinu čine bolesnici koji su razvili recidiv bolesti (lokalni recidiv, regionalne i/ili udaljene metastaze). Broj ispitanika u ovoj skupini je 50. Kontrolnu skupinu čine bolesnici bez recidiva bolesti. Broj ispitanika u kontrolnoj skupini je 70. Uzorci tkiva obrađeni su standardnom metodom koja uključuje fiksaciju tkiva u 10 % puferiranom formalinu i uklapanje u parafinske blokove, rezanje na debljinu od 5  $\mu$ m, deparafiniranje i bojanje standardnim hemalaun eozin (HE) postupkom.

Svi su bolesnici bili praćeni najmanje pet godina. Početna točka istraživanja je datum kirurškog liječenja (ekscizija tumora +/- disekcija vrata), a ishod vrijeme do događaja (u mjesecima) – smrti izazvane bilo kojim uzrokom (OS), recidiva bolesti (DFS) ili pet godina od dana kirurškog liječenja (cenzorirano vrijeme).

Istraživanje je provedeno uz odobrenje Etičkog povjerenstva Kliničke bolnice Dubrava. Svi su uzorci prikupljeni u skladu s etičkim i bioetičkim načelima, na način da su privatnost i zaštita tajnosti podataka u potpunosti osigurani. Cjelokupni istraživački proces obavljen je u skladu s primjenjivim smjernicama, uključujući Osnove dobre kliničke prakse, Helsinškom deklaracijom, Zakonom o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske (NN121/03) i Zakonom o pravima pacijenata Republike Hrvatske (NN 169/04).

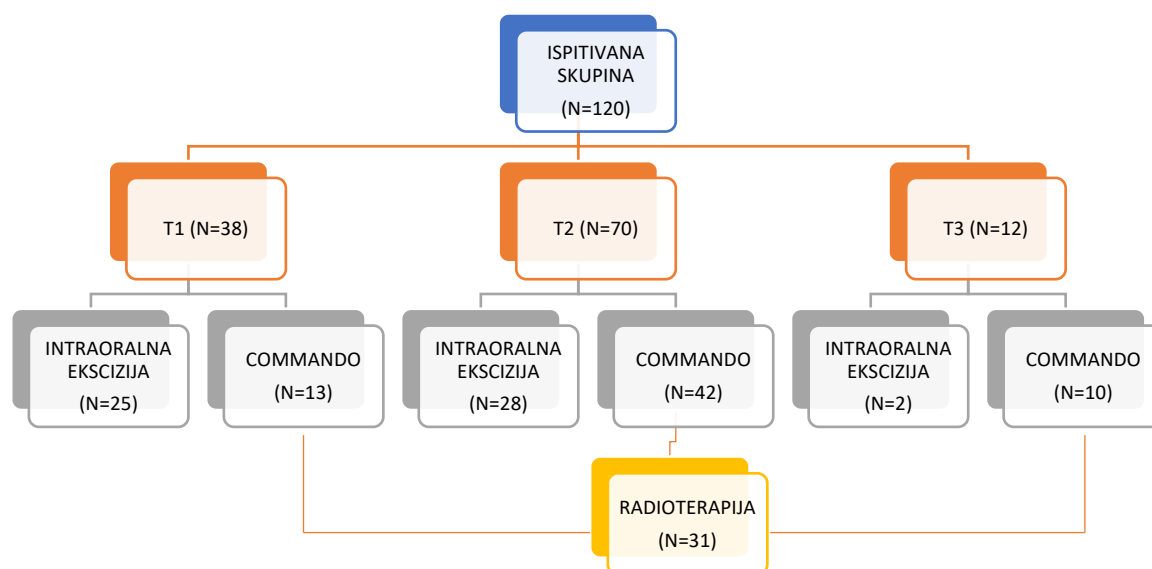
## 4.2. Postupci istraživanja

### 4.2.1. Podatci o liječenju bolesnika

Svim bolesnicima u trenutku postavljanja dijagnoze i liječenja određen je stadij bolesti prema međunarodnoj klasifikaciji TNM iz 2002. godine (234), a za potrebe ovog istraživanja učinjena je revizija stadija bolesti prema klasifikaciji TNM iz 2017. godine (40). Bolesnika sa stadijem T1 bilo je 38 (31,7 %), sa stadijem bolesti T2 70 (58,3 %) bolesnika, dok je sa stadijem T3 bilo 12 (10,0 %) bolesnika.

Kirurško liječenje provedeno je korištenjem sljedećeg algoritma liječenja: operacijom COMMANDO najčešće su operirani bolesnici sa tumorima većim od 3 cm (ukupno 65 bolesnika: 13 u stadiju T1, 42 u stadiju T2 i 10 u stadiju T3). Intraoralna ekscizija najčešće je učinjena u bolesnika s tumorima manjim od 3 centimetra (ukupno u 55 bolesnika; 25 u stadiju T1, 28 u stadiju T2 i 2 u stadiju T3). Disekcija limfnih čvorova vrata kod operacije COMMANDO učinjena je kao elektivan postupak, a kod intraoralne ekscizije tek kasnije, kao kurativni zbog pojave regionalnih metastaza u razdoblju praćenja.

Adjuvantno zračenje provedeno je u onih bolesnika za čije je tumore patolog odredio da se radi o stadijima pT3 i pT4, histološki dokazanom perineuralnom/limfovaskularnom invazijom, nalazom dva ili više pozitivnih limfnih čvorova vrata (stadij pN2/3) bez proboja čahure te uvijek u slučaju proboja čahure limfnog čvora. Na **slici 4.** prikazan je algoritam liječenja bolesnika uključenih u ovo istraživanje.



**Slika 4.** Algoritam liječenja bolesnika



Radioterapija bolesnika provedena je na Odjelu radioterapijske onkologije, Klinike za tumore u Zagrebu. Bolesnici su zračeni na linearnom akceleratoru trodimenzionalnom konformalnom tehnikom, fotonima energije 6 megavolta (mV), dnevnom dozom od 2 Gy, pet dana u tjednu, do ukupne doze zračenja od 50-66 Gy u trajanju od 5-7 tjedana. U anatomskom području visokog rizika recidiva bolesti (ležište tumora i pozitivni limfni čvorovi) isporučeno je 60 Gy, dok su područja niskog i srednje rizika recidiva bolesti (neodstranjeni i histološki negativni limfni čvorovi) profilaktički zračena ukupnom dozom od 50 Gy. Nalaz pozitivnog ruba resekcije i/ili ektranodalnog proboja čahure bili su indikacija za aplikaciju dodatne doze zračenja (tzv. *boost* doza) od 2-6 Gy, do ukupno 62-66 Gy.

Nakon kirurškog liječenja adjuvantnu radioterapiju primio je 31 bolesnik (25,8 %), dok je nakon drugog kirurškog zahvata, učinjenog zbog recidiva bolesti, zračenje primilo 19 (15,8 %) bolesnika. Podjela skupina bolesnika koji su primili radioterapiju prema kliničkom T stadiju bolesti prikazana je na **slici 4**.

U odnosu na opseg primarnog kirurškog liječenja, ispitanici su podijeljeni u dvije skupine: a) bolesnici u kojih je učinjena intraoralna ekscizija primarnog tumora (N=55) i b) bolesnici u kojih je učinjena intraoralna ekscizija i elektivna disekcija vrata - operacija COMMANDO (N=65). U slučaju pojave regionalnih metastaza u razdoblju praćenja u bolesnika u kojih je učinjena samo resekcija primarnog tumora učinjena je naknadno disekcija vrata. U odstranjenom tkivu patolog je odredio ukupan broj limfnih čvorova, broj i područja (regije vrata) metastazom zahvaćenih limfnih čvorova te prisutnost proboja čahure limfnog čvora.

#### 4.2.2. Histološka mjerenja

Za svaki tumor određeni su: a) veličina (najveći promjer izražen u centimetrima), b) stupanj diferencijacije (procjena polimorfije u najslabije diferenciranom dijelu tumora); c) resekcijski rub tumora; d) dubina invazije; e) perineuralna/perivaskularna invazija; f) zahvaćenost kosti; g) broj limfnih čvorova zahvaćenih metastazama; h) područje (regija) limfnih čvorova s metastazama; i) ekstrakapsularno širenje tumora; te je prema navedenim obilježjima određen stadij pTN. Tumori su, s obzirom na diferencijaciju, podijeljeni u tri skupine: 1. tumori s više od 75 % dobro diferenciranih stanica; 2. tumori s 25 do 75 % dobro diferenciranih stanica 3. tumori s manje od 25% dobro diferenciranih stanica i/ili jasno anaplastični tumori. Pozitivan resekcijski rub, koji se histološki analizirao zajedno sa zahvaćenošću kosti, definiran je kao: a) rub zahvaćen tumorom; b) rub nezahvaćen tumorom, pod uvjetom da je udaljenost tumora od

rubna bila  $\leq 4\text{mm}$  (tzv. "bliski rub"). U reseciranim tumorima promatrane skupine bolesnika nije pronađen niti jedan uzorak s pozitivnim rubom te se taj podatak nije uvrstio u daljnju analizu.

DOI je mjeren mikroskopskom lećom kao udaljenost od površine tumora (infiltrativne ili egzofitične) do najveće točke invazije. Kao razdjelne vrijednosti skupina koristile su se DOI prema klasifikaciji TNM:  $\leq 0,5\text{ cm}$ ;  $> 0,5\text{ cm}$  a  $\leq 1,0\text{ cm}$ ;  $> 1,0\text{ cm}$ .

Perineuralna i perivaskularna invazija određena je kao negativna ili pozitivna.

#### 4.2.3. Određivanje bjelančevina Hedgehoga signalnoga puta imunohistokemijskim postupkom

Za imunohistokemiju korištena su slijedeća protutijela: SHH (H-160) zečji poliklonski IgG, (kod sc-9024, Santa Cruz Biootechnology, Dallas, Texas, SAD; razrjeđenje 1:50); SMO (H-300) zečji poliklonski IgG (kod sc-13943, Santa Cruz Biootechnology, Dallas, Texas, SAD; razrjeđenje 1:50); GLI1 (H-300) zečji poliklonski IgG (kod sc-20687, Santa Cruz Biootechnology, Dallas, Texas, SAD; razrjeđenje 1:250) i PTCH/Anti Patched zečji poliklonski IgG (kod ab53715, Abcam, Cambridge, United Kingdom; razrjeđenje 1:100).

Iz parafinskih blokova učinjeni su rezovi od 2-3  $\mu\text{m}$ , nakon čega je uslijedila deparafinizacija u termostatu. Nakon deparafinizacije uslijedila je predigestija i bojanje u Ventana BenchMark Ultra aparatu (Roche Diagnostics) uz termo postolja i ULTRA Cell Conditioning Solution, za sva navedena protutijela.

Za imunohistokemijsku analizu korišten je optiViewUniversal DAB detekcijski kit (Ventana Medical Systems), a inkubacija s navedenim protutijelima trajala je 40 minuta na temperaturi od 37 Celzijevih stupnjeva. Nastali kompleks vizualiziran je pomoću hidrogen peroksida i DAB kromogena koji stvara smeđi precipitat vidljiv pod svjetlosnim mikroskopom. Zatim je uslijedilo kontrastiranje hemalaunom (u trajanju 1 minute) te provlačenje kroz uzlazni niz alkohola (70-100 %), ksilol i pokrivanje stakala. Kao pozitivna kontrola za protutijela SHH i SMO upotrijebljeno je tkivo mokraćovoda, za protutijelo GLI1 korišteno je tkivo bazocelularnog karcinoma, dok je za protutijelo PTCH korišteno tkivo posteljice kao pozitivna kontrola.

Jačina signala dobivenog imunohistokemijskim bojenjem izražena je semikvantitativno, određivanjem intenziteta i postotka obojenih stanica tumora u odnosu na ukupan broj stanica tumora. Postotak imunoreaktivnih stanica izražen je na sljedeći način: 0. negativna reakcija:  $< 5\%$  tumorskih stanica; 1. slabo izražena reakcija: 5-30 % pozitivnih tumorskih stanica; 2.

srednje izražena reakcija: 31-60 % pozitivnih tumorskih stanica; 3. jako izražena reakcija, >61 % pozitivnih tumorskih stanica.

Intenzitet obojenja označen je na slijedeći način: 0. negativna reakcija; 1. slabo pozitivna reakcija; 2. srednje pozitivna reakcija; 3. jako pozitivna reakcija.

Imunohistokemijski indeks bojenja dobiven je umnoškom intenziteta reakcije i postotka imunoreaktivnih stanica, a rezultati su razvrstani u tri skupine: 0 – negativna reakcija, I – umjereno izražena reakcija (umnožak 1-3), II – snažno izražena reakcija (umnožak 4, 6 ili 9).

#### 4.2.4. Dodatni podatci i definicije vezane uz istraživanje

Za potrebe statističke analize podataka bolesnici su razvrstani u dvije skupine prema medijanu dobi u vrijeme kirurškog liječenja (< 60 i ≥ 60 godina). Primarno sjelo tumora usne šupljine podijeljeno je na pet podlokalizacija: sublingvalno, jezik, retromolarno, gingiva mandibule i gingiva maksile. Klinički je određen i najveći promjer tumora (izražen u cm), određen prema promjeru izmjenom kliničkim pregledom odnosno prema nalazu CT-a.

Histološke parametre odredio je patolog. Veličina tumora definirana je najvećim promjerom, u centimetrima, mjereno mikrometrom. Promjer je iskazan kao kategorički pokazatelj, pri čemu je medijan korišten kao razdjelna vrijednost skupina (2,1 cm).

Histološke osobitosti tumora opisane su ranije. Dodatno su navedene u **tablici 3**.

Vrsta operacijskog zahvata bilježena je kao operacija COMMANDO ili intraoralna ekscizija. Resekcija mandibule praćena je kao kategorički pokazatelj: skupina bolesnika bez resekcije mandibule (uključuje i osteotomirane mandibule zbog pristupa na tumor - "swing" mandibule) te skupine s marginalnom (djelomično odstranjenje kosti koje uključuje alveolarni nastavak uz očuvani kontinuitet mandibule) i segmentalnom (odstranjenje pune debljine kosti) resekcijom mandibule.

U disektatu vrata analizirani su: a) prisutnost metastatski pozitivnih limfnih čvorova; b) proboj čahure čvora stanicama tumora. Ovi podatci iskazani su pozitivno ili negativno (**slika 1.** i **tablica 4.**).

Pokazateljima praćenja i ishoda bolesti objedinjeno je pet vrsta podataka (**tablica 3.**). Lokalni recidiv, regionalne metastaze i pojava udaljenih metastaza prikazani su u odnosu na izraženost molekula signalnog puta HH tijekom praćenja bolesnika. Recidiv je definiran je kao prvi oblik povrata bolesti u razdoblju praćenja. Lokalni recidiv je definiran kao povrat bolesti u području ili unutar 2 cm od mjesta primarnog tumora.

Regionalne metastaze su definirane kao histološki potvrđene okultne metastaze u disektatu vrata bolesnika u kojih je učinjena elektivna disekcija vrata ili pojava odgođenih regionalnih metastaza u vratu tijekom razdoblja praćenja u bolesnika primarno liječenih intraoralnom ekscizijom.

Udaljene metastaze shvaćene su kao diseminacija bolesti, ali ne isključivo izolirana, već se u analizi ubrajala i prisutnost udaljenih metastaza uz istodobno postojanje lokoregionalnog recidiva.

OS je statistički opisan mjesecima praćenja od trenutka primarnog kirurškog liječenja do zadnjega datuma praćenja u kojemu: a) bolesnik umire od osnovne bolesti ili je b) cenzoriran (zdrav u razdoblju 60 mjeseci od početka, izgubljen iz praćenja ili je umro od drugog uzroka). DFS je statistički opisan mjesecima praćenja od trenutka kirurškog liječenja do recidiva bolesti (lokalno, regionalnog u limfnim čvorovima vrata ili udaljene metastaze).

Podatci o primjeni kemoterapije nisu bili dostupni za sve bolesnike te zbog navedenog nisu uvršteni u analizu.

**Tablica 3.** Pokazatelji istraživanja

<b>Praćeni čimbenici</b>		<b>Pokazatelji (čimbenici)</b>
<b>I. Podatci o bolesniku</b>		1. dob 2. spol
<b>II. Podatci o bolesti</b>	<b>A. Klinički podatci</b>	<b>a. Tumor makroskopski</b> 3. lokalizacija tumora 4. najveći promjer tumora
	<b>B. Histološki podatci</b>	<b>b. Histologija tumora</b> 5. stupanj diferencijacije 6. dubina invazije 7. najveći promjer tumora 8. perineuralna i perivaskularna invazija 9. zahvaćenost kosti
		<b>c. Imunohistokemija tumora</b> 10. SHH 11. PTCH 12. SMO 13. GLI1
		<b>d. Disektat vrata</b> 14. prisutnost pozitivnih limfnih čvorova 15. proboj čahure
<b>III. Podatci o liječenju</b>		16. vrsta operacije 17. resekcija mandibule 18. radioterapija
<b>IV. Praćenje i ishod</b>		19. lokalni recidiv 20. regionalne metastaze 21. udaljene metastaze 22. bez recidiva u razdoblju praćenja 23. doživljenje

#### 4.2.5. Statistička obrada podataka

Za sve analizirane varijable učinjena je deskriptivna statistika. Za kontinuirane varijable iskazana je aritmetička sredina, standardna devijacija te položajne vrijednosti: srednja vrijednost, medijan i najveća vrijednost. Za kategorijske varijable napravljene su tablice frekvencija. Za sve statističke analize razina značajnosti od 5 % smatrana je statistički značajnom.

Usporedba između kategorijskih varijabli testirana je  $\chi^2$ -testom ili Fisherovim egzaktnim testom, ako je očekivana frekvencija po kućici bila manja od 5. Krivulje doživljenja procijenjene su Kaplan-Meierovim postupkom, a razlike doživljenja među skupinama uspoređene su log-rank testom. Na svim krivuljama označeni su cenzorirani ispitanici, odnosno ispitanici koji tijekom praćenja nisu ostvarili praćeni događaj: smrt od osnovne bolesti za OS, te pojavu recidiva (lokalnog, regionalnog ili udaljenih metastaza) za DFS. Podatci o doživljenju iskazani su brojem događaja koji se promatra (OS i DFS), brojem cenzoriranih te postotkom cenzoriranih.

Utjecaj molekula Hedgehoga signalnog puta na doživljenje (OS i DFS), odnosno relativni rizik (HR, od eng. *hazard ratio*) analiziran je Coxovom regresijom, gdje je negativna reakcija uzeta kao temeljna (eng. „*baseline*“) kategorija.

Coxovom regresijom procijenjen je i HR za lokalni recidiv tumora, prisutnost okultnih metastaza u limfnim čvorovima vrata, regionalne metastaze, udaljene metastaze i proboj čahure univarijatno za svaku varijablu posebno. Rezultati Coxove regresije iskazani su procijenjenim parametrima modela, njihovom standardnom pogreškom ( $\beta \pm SE(\beta)$ ),  $P$  vrijednostima testne statistike, HR-om i njegovim 95 %-im intervalom pouzdanosti (CI, od eng. *confidence interval*).

Podatci su izvorno upisani u tumorsku bazu podataka Klinike za kirurgiju lica, čeljusti i usta Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pomoću programa dBase III+ (Ashton-Tate, Torrence (CA), SAD), preneseni u program Excel (Microsoft, Seattle (WA), SAD), a sveukupna obrada podataka učinjena je pomoću programa SAS OnDemand for Academics; dostupno na: [https://www.sas.com/en\\_us/software/on-demand-for-academics.html](https://www.sas.com/en_us/software/on-demand-for-academics.html).

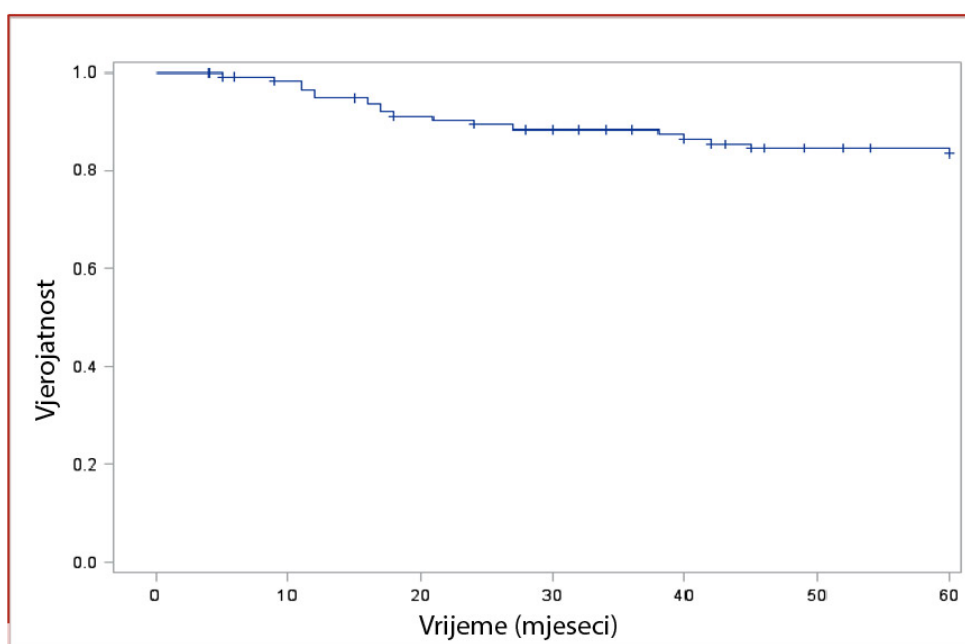
Grafički prikazi izrađeni su u programu Excel i SAS OnDemand for Academics.

## 5. REZULTATI

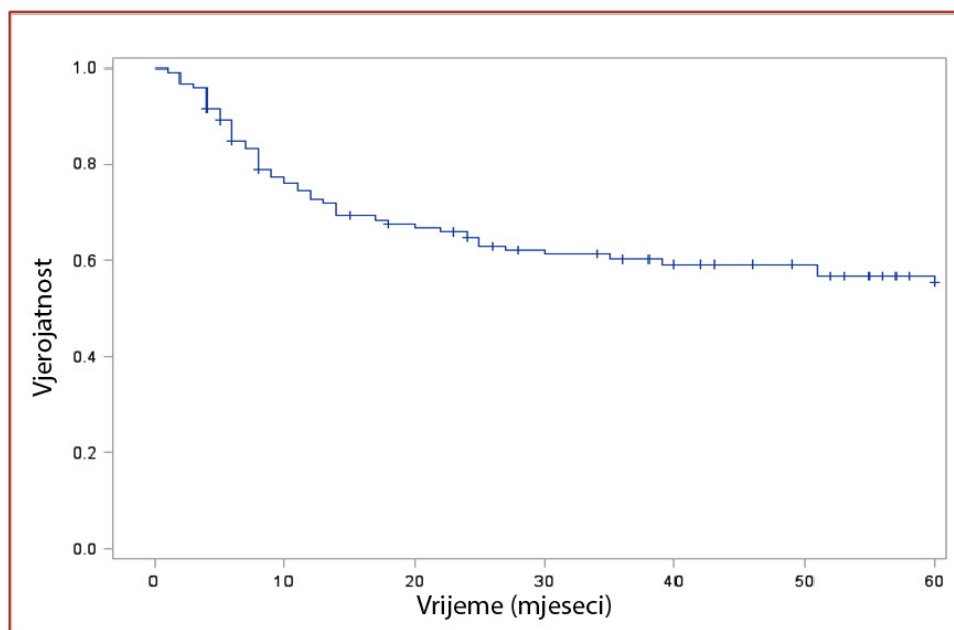
Skupinu bolesnika uključenu u ovo istraživanje (N=120) činilo je 99 (82,5 %) muškaraca i 21 (17,5 %) žena. Medijan dobi bio je 59 godina, 64 (53,3 %) bolesnika u skupini do te dobi, a 56 (46,7 %) bolesnika starijih od 60 godina.

Prema podlokalizacijama usne šupljine 44 (36,7 %) bolesnika imalo je tumor smješten sublingvalno; 44 (36,7 %) u jeziku; 11 bolesnika (9,2 %) retromolarno; 14 (11,6 %) na gingivi mandibule, a sedam bolesnika (5,8 %) tumor je razvilo na gingivi maksile.

OS iznosio je  $54,11 \pm 1,42$  mjeseci (**slika 5.**). Tijekom praćenja, od osnovne bolesti umrlo je 18 bolesnika, a 102 je cenzorirano. Procijenjeno 5-godišnje doživljenje je bilo 85 %. DFS je iznosio  $40,16 \pm 2,28$  mjeseci (**slika 6.**). Procijenjeno 5-godišnje DFS je bilo 53,33 %. U razdoblju praćenja 50 bolesnika razvilo je recidiv bolesti (lokalni, regionalne ili udaljene metastaze) u vremenskom razdoblju od najranije jednog mjeseca, a najviše nakon 58 mjeseci od kirurškog liječenja.



**Slika 5.** Kaplan-Meierova krivulja ukupnog doživljenja svih bolesnika (N=120). Cenzorirani podatci označeni su okomitim crticama na krivulji doživljenja



**Slika 6.** Kaplan-Meierova krivulja doživljenja bez bolesti svih bolesnika (N=120). Cenzorirani podatci označeni su okomitim crticama na krivulji doživljenja

Klinički promjer tumora iznosio je 0,6-5,5 cm, medijana 2,5 cm, dok je histološki izmjeren promjer iznosio 0,6-5,5 cm, medijana 2,1 cm. Histološki DOI tumora bio je 0,2-3,5 cm, medijana 0,9 cm. Prema stupnju diferencijacije tumora 65 (54,1 %) bolesnika imalo je dobro diferencirani, njih 41 (34,2 %) umjereno i 14 (11,7 %) slabo diferencirani karcinom. Perineuralna i perivaskularna invazija bila je prisutna u 45 (37,5 %) resekiranih tumora usne šupljine.

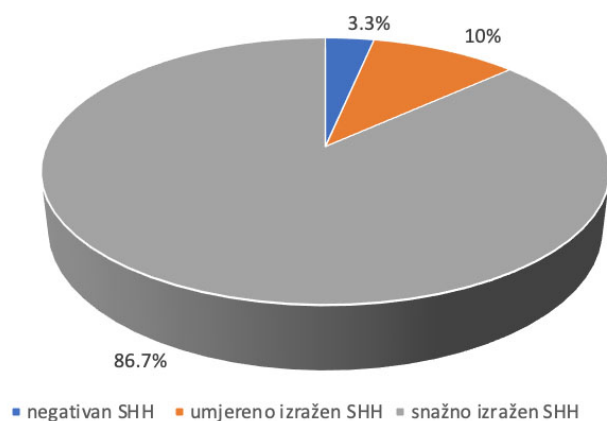
U odnosu na raspodjelu bolesnika prema kliničkom stadiju T: 38 (31,7 %) s T1; 70 (58,3 %) s T2; 12 (10,0 %) bolesnika sa stadijem T3, a nakon patohistološkog pregleda resekiranih tumora bilo je 35 (29,2 %) stadija pT1; 42 (35 %) pT2; 34 (28,3 %) pT3 i 9 (7,5 %) stadija pT4.

Elektivna disekcija vrata učinjena je u 65 (54,2 %) bolesnika, od toga je u 18 (15 %) učinjena selektivna disekcija područja I, II i III; u 23 (19,2 %) modificirana radikalna disekcija vrata, dok je u 24 (20 %) bolesnika učinjena radikalna disekcija vrata. Nakon učinjene disekcije limfnih čvorova vrata u 39 (60 %) pregledanih disektata vrata (32,5 % od ukupnog broja bolesnika) histološki su potvrđene metastaze, a u 22 (33,8 %) disektata nađen je proboj čahure limfnog čvora. Jedanaest (16,9 %) bolesnika imalo je histološki potvrđen stadij limfnih čvorova vrata N1, 6 (9,2 %) bolesnika N2, dok je 22 (33,8 %) imalo stadij N3 limfnih čvorova vrata.

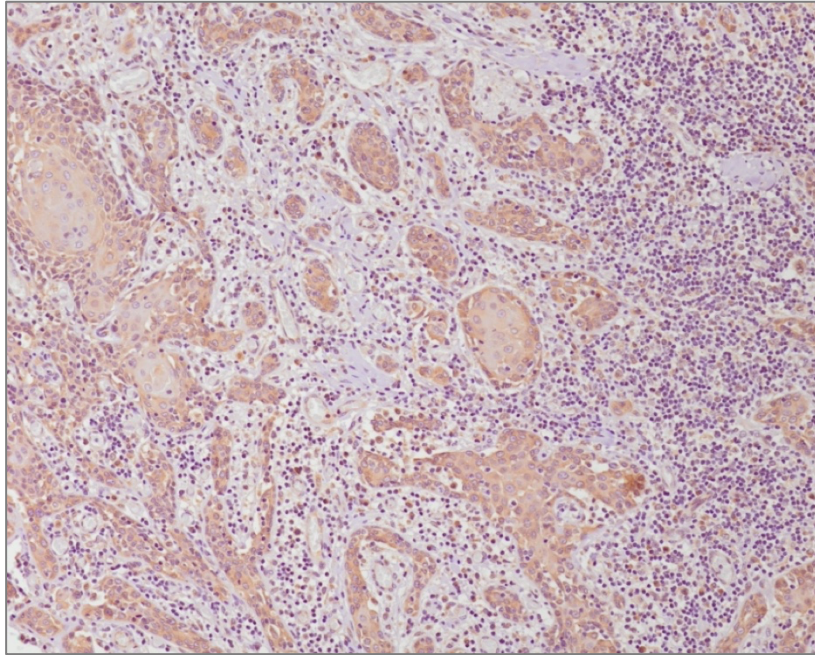


Resekcija mandibule učinjena je kao dio primarnog kirurškog liječenja u 59 (49,2 %) bolesnika, od čega je u 34 (28,3 %) učinjena marginalna mandibulektomija, a u 25 (20,8 %) bolesnika segmentalna mandibulektomija u sklopu COMMANDO operacije. Histološki je potvrđena invazija kosti tumorom u 17 (14,2 %) resekiranih mandibula.

U tkivu karcinoma usne šupljine izraženost molekule SHH dokazana je IMH-om u 116 (96,7 %) bolesnika. Imunohistokemijskim indeksom bojenja uzorci su, s obzirom na izraženost SHH, razvrstani u tri skupine: negativan (4 uzoraka; 3,3 %), umjereno izražen (12 uzoraka; 10 %), snažno izražen (104 uzorka; 86,7 %), (slika 7.).



**Slika 7.** Udio tumora u odnosu na imunohistokemijski indeks bojenja SHH (N=116)



**Slika 8.** Snažno pozitivna reakcija SHH u stanicama planocelularnog karcinoma usne šupljine (SHH x200, optiViewUniversal DAB detekcijski kit, Ventana Medical Systems)

U **tablicama 4a i 4b** prikazana je izraženost SHH u odnosu na sve pokazatelje istraživanja.

**Tablica 4a.** Imunohistokemijski indeks bojenja SHH u odnosu na kliničke pokazatelje istraživanja

Čimbenici	Skupine	SHH (N)			$\chi^2$ P-vrijednost
		negativna reakcija	umjereno izražen	snažno izražen	
<b>Podatci o bolesniku</b>					
dob	< 60 god.	4	6	54	3,637 0,212*
	≥ 60 god.	0	6	50	
spol	muškarci	4	12	83	3,916 0,207*
	žene	0	0	21	
<b>Klinički podatci o bolesti</b>					
lokalizacija tumora	sublingvalno	2	7	35	5,453 0,684*
	jezik	1	3	40	
	retromolarno	0	0	11	
	gingiva mandibule	1	1	12	
	gingiva maksile	0	1	6	
stadij cT	T1	3	6	29	6,099 0,196*
	T2	1	5	64	
	T3	0	1	11	

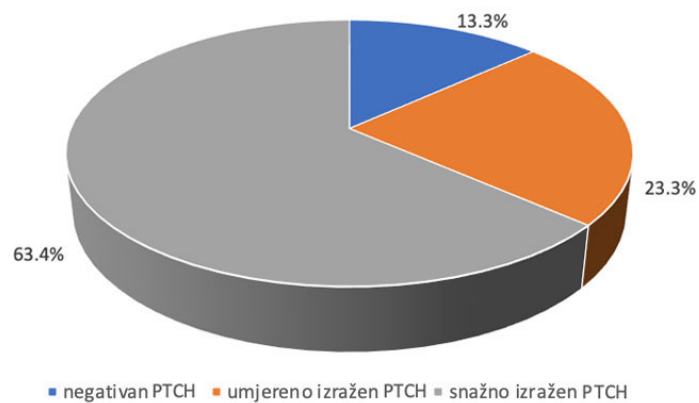
\* P-vrijednost određena Fisherovim egzaktnim testom

**Tablica 4b.** Imunohistokemijski indeks bojenja SHH u odnosu na histološke pokazatelje istraživanja

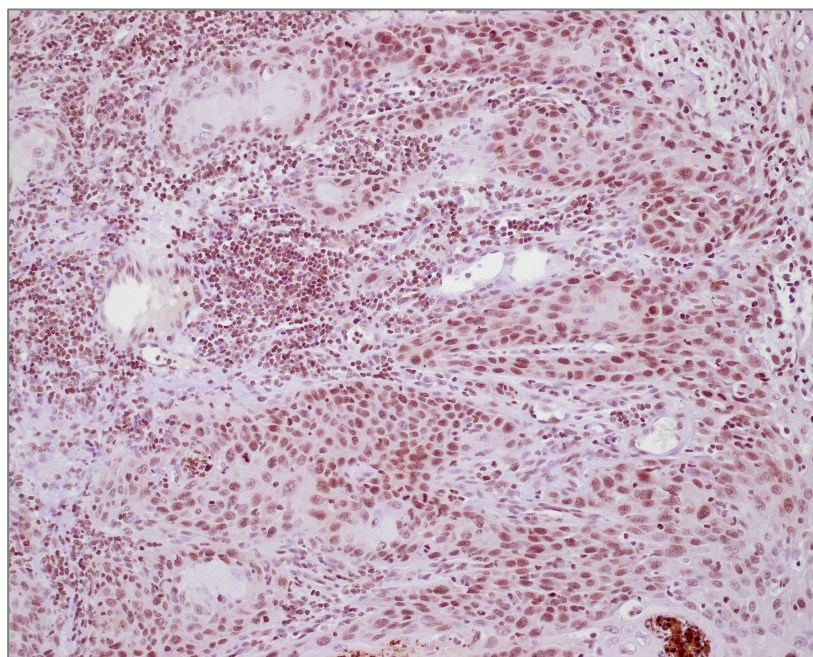
Pokazatelji	Skupine	SHH (N)			$\chi^2$ <i>P</i> -vrijednost
		negativna reakcija	umjereno izražen	snažno izražen	
najveći promjer tumora (P)	≤ 2,1 cm	4	7	49	4,679 0,112*
	> 2,1 cm	0	5	55	
stadij pT	T1	2	5	28	3,459 0,838*
	T2	1	3	38	
	T3	1	4	29	
	T4	0	0	9	
stadij pN	N0	1	2	23	2,200 1,000*
	N1	0	0	11	
	N2	0	0	6	
	N3	1	1	20	
stupanj zrelosti	> 75 %	4	8	53	5,600 0,267*
	25-75 %	0	2	39	
	< 25 %	0	2	12	
perineuralna i perivaskularna invazija	negativna	4	8	63	2,653 0,406*
	pozitivna	0	4	41	
dubina invazije	≤ 0,5 cm	2	5	32	1,236 0,860*
	0,5 < i ≤ 1,0 cm	1	3	35	
	> 1,0 cm	1	4	37	
čahura čvora	očuvana	0	0	17	1,629 1,000*
	probijena	1	1	20	

\* *P*-vrijednost određena Fisherovim egzaktnim testom

Izraženost molekule PTCH (Patched) u tumorskom tkivu dokazana je IMH-om u 104 (86,7 %) bolesnika. Imunohistokemijskim indeksom bojenja uzorci su, s obzirom na izraženost PTCH-a, razvrstani u tri skupine: negativan (16 uzoraka; 13,3 %), umjereno izražen (28 uzoraka; 23,3 %), snažno izražen (76 uzorka; 63,4 %), (slika 9.).



**Slika 9.** Udio tumora u odnosu na imunohistokemijski indeks bojenja PTCH (N=104)



**Slika 10.** Snažno pozitivna reakcija PTCH u stanicama planocelularnog karcinoma usne šupljine (PTCH x200, optiViewUniversal DAB detekcijski kit, Ventana Medical Systems)

**Tablica 5a.** Imunohistokemijski indeks bojenja PTCH u odnosu na kliničke pokazatelje istraživanja

Čimbenici	Skupine	PTCH (N)			$\chi^2$ <i>P</i> -vrijednost
		negativna reakcija	umjereno izražen	snažno izražen	
<b>Podatci o bolesniku</b>					
dob	< 60 god.	8	13	43	0,929 0,628
	≥ 60 god.	8	15	33	
spol	muškarci	14	19	66	5,428 0,088*
	žene	2	9	10	
<b>Klinički podatci o bolesti</b>					
lokalizacija tumora	sublingvalno	6	11	27	3,810 0,918*
	jezik	6	9	29	
	retromolarno	1	3	7	
	gingiva mandibule	3	2	9	
	gingiva maksile	0	3	4	
stadij cT	T1	6	8	24	3,681 0,442
	T2	7	19	44	
	T3	3	1	8	

\* *P*-vrijednost određena Fisherovim egzaktnim testom

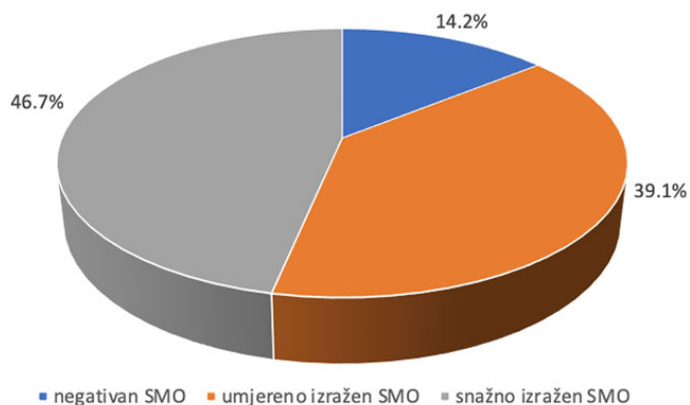
**Tablica 5b.** Imunohistokemijski indeks bojenja PTCH u odnosu na histološke pokazatelje istraživanja

\**P*-vrijednost određena Fisherovim egzaktnim testom

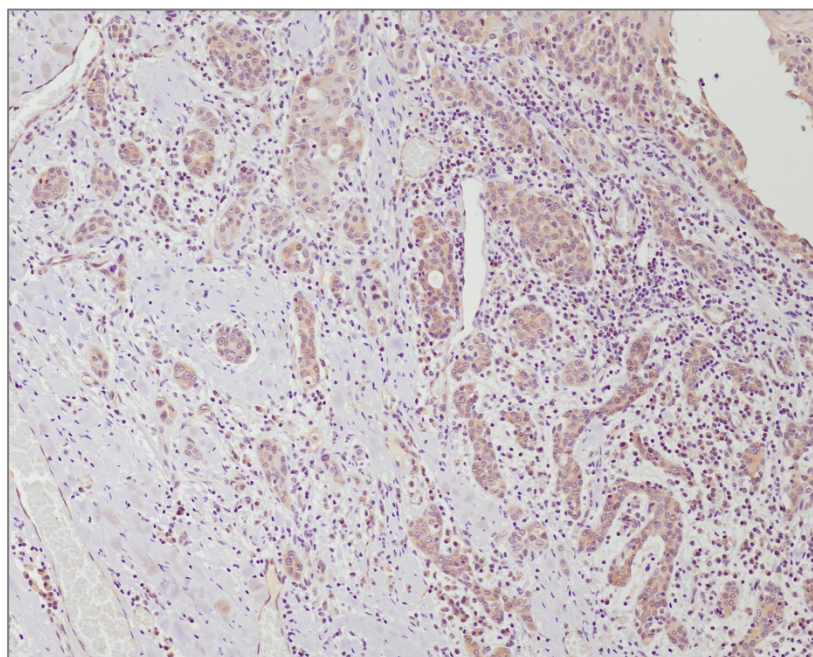
Pokazatelji	Skupine	PTCH (N)			$\chi^2$ <i>P</i> -vrijednost
		negativna reakcija	umjereno izražen	snažno izražen	
najveći promjer tumora (P)	≤ 2,1 cm	8	11	41	1,759 0,415
	> 2,1 cm	8	17	35	
stadij pT	T1	6	5	24	13,601 0,052*
	T2	2	11	29	
	T3	4	11	19	
	T4	4	1	4	
stadij pN	N0	4	4	18	6,922 0,295*
	N1	3	3	5	
	N2	1	0	5	
	N3	1	7	14	
stupanj zrelosti	> 75 %	8	17	40	2,634 0,579*
	25-75 %	5	7	29	
	< 25 %	3	4	7	
perineuralna i perivaskularna invazija	negativna	9	19	47	0,624 0,732
	pozitivna	7	9	29	
dubina invazije	≤0,5 cm	6	6	27	5,984 0,200
	0,5 < i ≤1,0 cm	2	10	27	
	>1,0 cm	8	12	22	
čahura čvora	očuvana	4	3	10	3,483 0,211*
	probijena	1	7	14	



Izraženost molekule SMO (Smotherened) u tumorskom tkivu dokazana je IMH-om u 103 (85,8 %) bolesnika. Prema imunohistokemijskom indeksu bojenja negativnih je bilo 17 uzoraka (14,2 %), umjereno izraženih 47 (39,1 %), a snažno izraženih 56 (46,7 %) uzorka tumora (**slika 11.**).



**Slika 11.** Udio tumora u odnosu na imunohistokemijski indeks bojenja SMO (N=103)



**Slika 12.** Snažno obojenje na SMO u planocelularnom karcinomu usne šupljine (SMO x200, optiViewUniversal DAB detekcijski kit, Ventana Medical Systems)



**Tablica 6a.** Imunohistokemijski indeks bojenja SMO u odnosu na kliničke pokazatelje istraživanja

Čimbenici	Skupine	SMO (N)			$\chi^2$ P-vrijednost
		negativna reakcija	umjereno izražen	snažno izražen	
<b>Podatci o bolesniku</b>					
dob	< 60 god.	7	29	28	2,582 0,275
	≥ 60 god.	10	18	28	
spol	muškarci	14	39	46	0,013 0,994
	žene	3	8	10	
<b>Klinički podatci o bolesti</b>					
lokalizacija tumora	sublingvalno	6	17	21	10,191 0,296*
	jezik	9	21	14	
	retromolarno	1	2	8	
	gingiva mandibule	1	4	9	
	gingiva maksile	0	3	4	
stadij cT	T1	6	16	16	6,019 0,198*
	T2	7	29	34	
	T3	4	2	6	

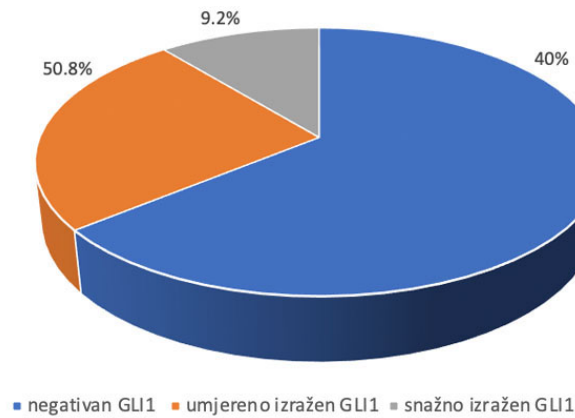
\* P-vrijednost određena Fisherovim egzaktnim testom

**Tablica 6b.** Imunohistokemijski indeks bojenja SMO u odnosu na histološke pokazatelje istraživanja

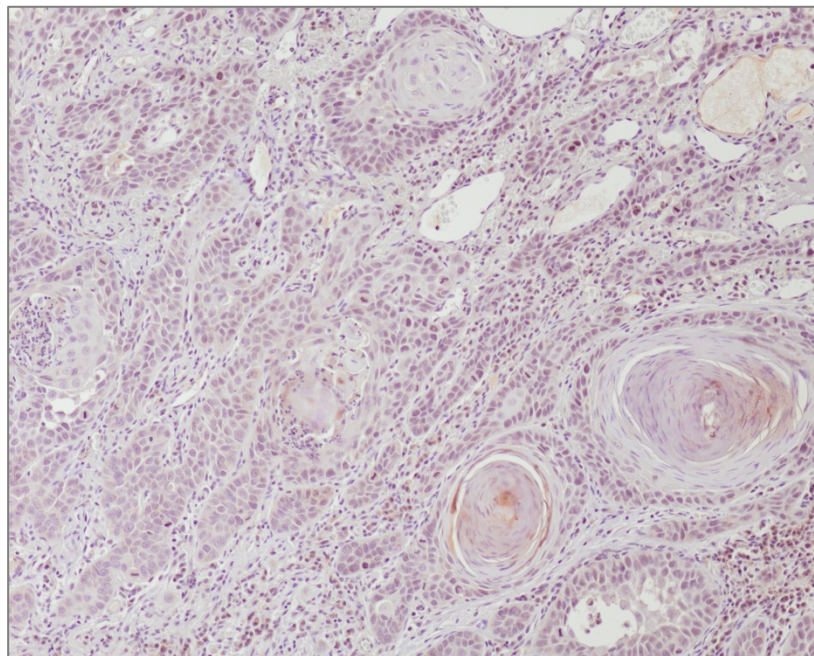
Pokazatelji	Skupine	SMO (N)			$\chi^2$ <i>P</i> -vrijednost
		negativna reakcija	umjereno izražen	snažno izražen	
najveći promjer tumora (P)	≤ 2,1 cm	7	26	27	1,133
	> 2,1 cm	10	21	29	0,568
stadij pT	T1	7	14	14	7,932 0,291*
	T2	4	13	25	
	T3	6	14	14	
	T4	0	6	3	
stadij pN	N0	2	13	11	7,827 0,351*
	N1	1	4	6	
	N2	0	3	3	
	N3	7	7	8	
stupanj zrelosti	> 75 %	6	29	30	4,027 0,402
	25-75 %	9	13	19	
	< 25 %	2	5	7	
perineuralna i perivaskularna invazija	negativna	12	33	30	3,572 0,167
	pozitivna	5	14	26	
dubina invazije	≤0,5 cm	8	15	16	6,512 0,164
	0,5 < i ≤1,0 cm	3	12	24	
	>1,0 cm	6	20	16	
čahura čvora	očuvana	1	7	9	3,983 0,153*
	probijena	7	7	8	

\* *P*-vrijednost određena Fisherovim egzaktnim testom

Izraženost molekule GLI1 u tumorskom tkivu dokazana je IMH-om u 72 (60 %) bolesnika. Prema imunohistokemijskom indeksu bojenja negativnih je bilo 48 uzoraka (40 %), umjereno izraženih 61 (50,8 %), a snažno izraženih 11 (9,2 %) tumora (**slika 13.**).



**Slika 13.** Udio tumora u odnosu na imunohistokemijski indeks bojenja GLI1 (N=72)



**Slika 14.** Snažno obojenje na GLI1 u planocelularnom karcinomu usne šupljine (GLI1 x200, optiViewUniversal DAB detekcijski kit, Ventana Medical Systems)

**Tablica 7a.** Imunohistokemijski indeks bojenja GLI1 u odnosu na kliničke pokazatelje istraživanja

Čimbenici	Skupine	GLI1 (N)			$\chi^2$ P-vrijednost
		negativna reakcija	umjereno izražen	snažno izražen	
<b>Podatci o bolesniku</b>					
dob	< 60 god.	23	33	8	2,242 0,326
	≥ 60 god.	25	28	3	
spol	muškarci	37	52	10	1,833 0,400
	žene	11	9	1	
<b>Klinički podatci o bolesti</b>					
lokalizacija tumora	sublingvalno	17	22	5	5,305 0,624*
	jezik	20	22	2	
	retromolarno	5	4	2	
	gingiva mandibule	5	8	1	
	gingiva maksile	1	5	1	
stadij cT	T1	20	16	2	4,800 0,276*
	T2	25	38	7	
	T3	3	7	2	

\* P-vrijednost određena Fisherovim egzaktnim testom

**Tablica 7b.** Imunohistokemijski indeks bojenja GLI1 u odnosu na histološke pokazatelje istraživanja

Pokazatelji	Skupine	GLI1 (N)			$\chi^2$ <i>P</i> -vrijednost
		negativna reakcija	umjereno izražen	snažno izražen	
najveći promjer tumora (P)	≤ 2,1 cm	28	26	6	2,752
	> 2,1 cm	20	35	5	0,253
stadij pT	T1	15	15	5	4,972 0,535*
	T2	17	23	2	
	T3	13	19	2	
	T4	3	4	2	
stadij pN	N0	10	13	3	3,831 0,775*
	N1	4	6	1	
	N2	1	5	0	
	N3	11	9	2	
stupanj zrelosti	> 75 %	30	30	5	5,273 0,265*
	25-75 %	13	25	3	
	< 25 %	5	6	3	
perineuralna i perivaskularna invazija	negativna	29	41	5	2,031 0,362
	pozitivna	19	20	6	
dubina invazije	≤0,5 cm	16	18	5	1,584 0,828*
	0,5 < i ≤1,0 cm	16	21	2	
	>1,0 cm	16	22	4	
čahura čvora	očuvana	5	11	1	2,178 0,383*
	probijena	11	9	2	

\* *P*-vrijednost određena Fisherovim egzaktnim testom

Izraženost molekula signalnog puta HH u odnosu na dob nije pokazala značajnije odstupanje prema vrsti promatrane molekule, ili statistički značajnu povezanost.

Imunohistokemijski indeks za SHH i PTCH bio je većinom snažno izražen, ali u podjednakom broju bolesnika mlađih i starijih od 60 godina ( $P=0,628$ ;  $P=0,212$ ). Razlika u raspodjeli prema izraženosti bojanja SMO prema dobi bila je bez značajnijih odstupanja među skupinama, a razlike su bile znatno manje i prema spolu, u usporedbi sa SHH i PTCH.

Prema spolu snažno obojenje SHH bilo je prevladavajuće u muškaraca (N=83) ali bez statističke značajnosti ( $\chi^2=3,916$ ,  $P=0,207$ ), kao i PTCH (N=66;  $\chi^2=5,428$ ,  $P=0,088$ ).

GLI1 je u najvećem broju bio umjereno izražen, u bolesnika ispod 60 godina (N=33), bez statističke značajnosti ( $\chi^2=2,242$ ,  $P=0,326$ ). U istoj skupini bilo je više muškaraca (N=52), ali i negativnu reakciju imali su njih 37.

Prema lokalizaciji tumora SHH je bio češće izražen u karcinomima jezika i sublingvalno (ukupno N=85, od toga snažna reakcija u njih 75), ali bez statističke značajnosti za rizik nastanka karcinoma na tim mjestima ( $\chi^2=5,453$ ,  $P=0,684$ ). Za ostale Hedgehog molekule raspodjela prema lokalizacijama u odnosu na izraženost imunohistokemijskog obojenja bila je ujednačena po skupinama.

Stadiji tumora T1 i T2 bili su najviše zastupljeni u skupini snažno izraženih imunohistokemijskih indeksa SHH i PTCH (N=91 i N=68 bolesnika), od kojih je više od polovice tumora (N=64) bilo stadija T2 snažno izraženog SHH imunohistokemijskog indeksa, ali bez statističke značajnosti ( $\chi^2=6,099$ ,  $P=0,196$ ). Uznapredovali stadij tumora T3 nije pokazao veću zastupljenost izraženosti za niti jednu molekulu HH signalnog puta.

Svi navedeni podaci prikazani su redom u **tablicama 4a, 5a, 6a i 7a**.

Imunohistokemijska izraženost molekula HH signalnoga puta nije imala statistički značajan utjecaj na veličinu tumora u razdjelnim skupinama prema najvećem promjeru tumora većem ili manjem od 2,1 cm.

U odnosu na stadij tumora pT najviše pozitiviteta na SHH, PTCH, SMO i GLI1 bilo je u skupini stadija karcinoma T2 (N=41; N=40; N=38; N=25), međutim niti za jednu bjelančevinu nije se pokazala statistička značajnost od 5 % u odnosu na pT.

Imunohistokemijsko bojenje na SHH u limfnim čvorovima histološki pregledanih 65 disektata vrata, najčešće je bila izražena u pN0 (N=25) te u pN3 stadiju vrata (N=21), ( $\chi^2=2,200$ ,  $P=1,00$ ). Izraženost bjelančevine PTCH pokazala je sličnu raspodjelu, s 22 pN0 disektata vrata imunohistokemijski pozitivnih te 21 pN3 stadija limfnih čvorova vrata ( $\chi^2=6,922$ ,  $P=0,295$ ). Većinska raspodjela izraženosti u pN0 (N=24) i pN3 (N=14) bila je i kod bjelančevine SMO ( $\chi^2=7,827$ ,  $P=0,351$ ), dok je GLI1 imao manje razlike među N stadijima prema izraženosti imunohistokemijske reakcije.

S obzirom na stupanj diferencijacije tumorskih stanica SHH je bio izražen u 61 dobro diferenciranom tumoru, 41 umjereno te u 14 slabo diferenciranih ( $\chi^2=5,600$ ,  $P=0,267$ ); PTCH u 57 dobro diferenciranih, 36 umjereno te 11 slabo diferenciranih ( $\chi^2=2,634$ ,  $P=0,579$ ); razlika

imunoreakcije GLI1 bila je manja među skupinama tumora prema zrelosti stanica i izražena je bila u 35 dobro diferenciranih, 28 umjereno i 10 tumora sa <25 % zrelih stanica ( $\chi^2=5,273$   $P=0,265$ ). Bjelančevina SMO pokazala je sličnu raspodjelu prema zrelosti tumorskih stanica kao i SHH i PTCH, sa 59 dobro diferenciranih uzoraka u skupini, 32 umjerene zrelosti i 12 slabo diferenciranih ( $\chi^2= 4,027$ ,  $P=0,402$ ).

Perineuralna/perivaskularna invazija bile su prisutne u 45 tumora izraženog pozitiviteta na SHH; 38 IMH-om pozitivnih tumora na PTCH; 40 IMH-om pozitivnih tumora na SMO; te 26 imunohistokemijski pozitivnih GLI1 tumora. Prema jačini imunohistokemijskog indeksa većina SHH, PTCH i SMO bili su snažno izraženi, dok je za GLI1 prevladavalo umjereno obojenje tumorskih stanica. Prisutnost perineuralne/perivaskularne invazije nije u statistički značajnoj korelaciji s izraženosti HH molekula.

DOI tumora >1,0 cm bila je u najvećem broju bolesnika (N=37) sa snažno izraženim SHH, od ukupno 41 s IMH-im pozitivitetom na SHH. DOI od 0,5 do 1,0 cm imalo je 40 bolesnika s pozitivno izraženim SHH obojenjem dok je manje od 0,5 cm dubinu invazije imalo 37 bolesnika s tumorom pozitivnog IMH obojenja na SHH ( $\chi^2=1,235$ ,  $P=0,860$ ).

Imunohistokemijski pozitivan tumor na PTCH s DOI >1,0 cm imalo je 34 (27 snažno izraženo) bolesnika, njih 37 imalo je DOI između 0,5 i 1,0 cm, dok je manje od 0,5 cm imalo 33 bolesnika. Pozitivitet bjelančevine SMO bio je u jednakom broju izražen u tumorima s DOI-om manjim i većim od 1,0 cm (N=36), dok je u 31 bolesnika bio IMH-om izražen tumor sa DOI manjim od 0,5 cm. GLI1 bio je u najvećem broju izražen u tumorima dubine invazije veće od 1,0 cm (N=26), iako razlike među skupinama nisu bile velike, pa je bilo po 23 tumora u dvije skupine DOI-a manjega od 1,0 cm. Za DOI tumora nije nađena statistički značajna izraženost bjelančevina HH signalnoga puta po skupinama indeksa IMH.

Proboj čahure metastatski zahvaćenog limfnog čvora bio je prisutan u 21 bolesnika s pozitivnom reakcijom za SHH, od toga 20 snažno izraženih ( $\chi^2=1,629$ ,  $P=1,00$ ); također u 21 bolesnika sa PTCH pozitivno IMH obojenim tumorom (od toga 14 snažno izražen indeks). Tumori imunohistokemijski pozitivni na SMO dali su metastaze s probojem čahure limfnog čvora u 15 bolesnika, dok je GLI1 bio pozitivan u samo 11 bolesnika s probojem čahure. Izraženost HH proteina nije se pokazala statistički značajna za proboj čahure limfnog čvora. Svi navedeni podatci prikazani su redom u **tablicama 4b, 5b, 6b i 7b**.

**Tablica 8.** Rezultati analize ukupnog doživljenja (OS) prema imunohistokemijskoj izraženosti bjelančevina Hedgehoga signalnoga puta

HH		broj		postotak (%)	Log-rank test	Coxova regresijska analiza			
		umrlih	cenzoriranih	cenzoriranih		Procijenjen parametar	SE	P	HR
SHH	0	2	2	50	$\chi^2=6,74$ $P=0,034$				
	1	0	12	100		-16,85	1547	0,991	0,000
	2	16	88	84,62		-1,35	0,75	0,072	0,258
PTCH	0	1	15	93,75	$\chi^2=3,04$ $P=0,219$				
	1	2	26	92,86		0,08	1,22	0,976	1,038
	2	15	61	80,26		1,08	1,03	0,297	2,934
SMO	0	2	15	88,24	$\chi^2=0,16$ $P=0,923$				
	1	8	39	82,98		0,31	0,79	0,696	1,362
	2	8	48	85,71		1,21	0,79	0,791	1,233
GLI1	0	9	39	81,25	$\chi^2=1,11$ $P=0,574$				
	1	8	53	86,89		-0,04	0,49	0,407	0,668
	2	1	10	90,91		-0,83	1,05	0,431	0,436

Od ukupnog broja bolesnika u istraživanju, 100 (83,33 %) bolesnika s pozitivno izraženim SHH u karcinomu usne šupljine bilo je živo na kraju praćenja, **tablica 8., slika 15.** Postoji statistički značajna razlika u OS između bolesnika s negativnom reakcijom SHH i onih sa snažno izraženim imunohistokemijskim indeksom, a u skupini s umjereno izraženim SHH nije bilo umrlih pa se nije mogao procijeniti relativni rizik za tu skupinu.

Izraženost SHH u tumoru pokazala se kao statistički značajan čimbenik za OS bolesnika ( $\chi^2=6,74$ ,  $P=0,034$ ). Treba naglasiti da se značajnost temelji na tome što su 2 umrla bolesnika, od kojih je jedan umro za 10 i jedan za 20 mjeseci.

Od ukupno 18 (15 %) bolesnika umrlih od karcinoma usne šupljine, njih 16 (13,3 %) imalo je snažno izražen imunohistokemijski indeks SHH, 17 (14,2 %) je imalo izraženu bjelančevinu PTCH (od toga 15 bolesnika snažno izražen), 16 (13,3 %) izražen SMO (od toga 8 snažno

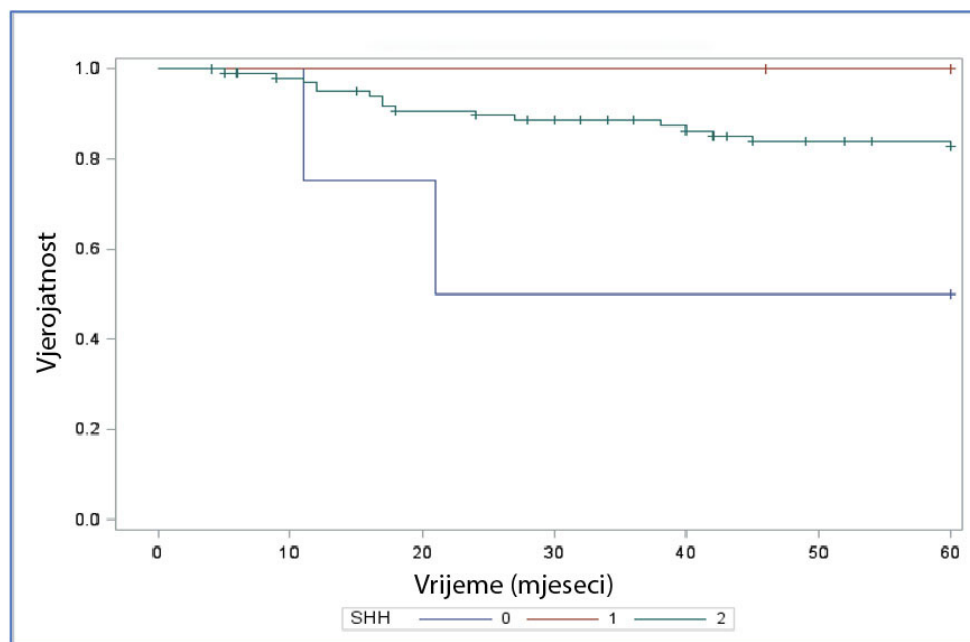


izražen) te 9 (7,5 %) bolesnika izraženu bjelančevinu GLI1 (od toga 1 bolesnik snažno izražen IMH indeks).

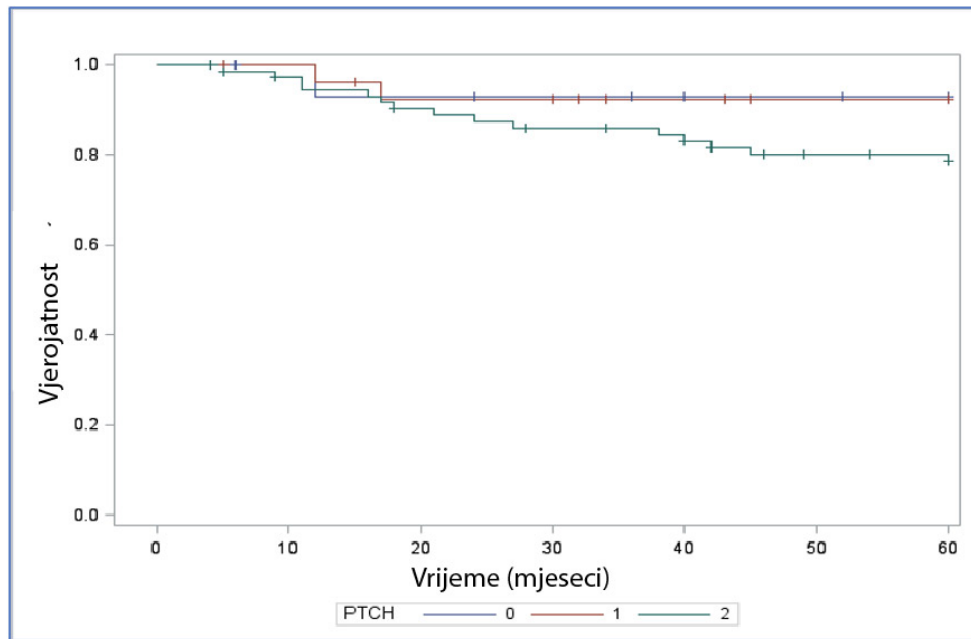
Umjereno izražen PTCH (PTCH=I) u odnosu na negativnu reakciju (PTCH=0) imao je za 3,8 % veći rizik smrtnog ishoda, dok je snažno izražen (PTCH=II) s obzirom na negativnu reakciju ima 2,9 puta veći rizik smrti, međutim, to nisu statistički značajni rezultati ( $\chi^2=3,04$ ,  $P=0,219$ ), **tablica 8., slika 16.**

Umjereno izražen SMO s obzirom na SMO=0 ima veći rizik za smrtni ishod za 36.2 %, a SMO=II s obzirom na negativnu reakciju za 23,3 % veći rizik, iako ni to nije statistički značajan rezultat ( $\chi^2=0,16$ ,  $P=0,923$ ), **tablica 8., slika 17.**

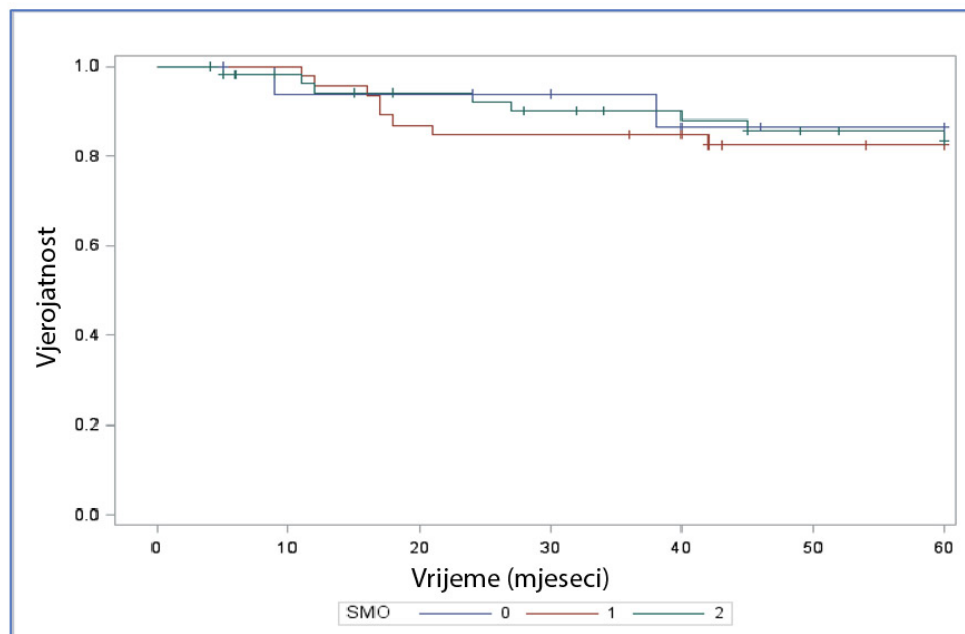
Bolesnika s umjereno i snažno izraženim GLI1-em u tumorskom tkivu, iako nije statistički značajan rezultat, bilo je manji broj umrlih od onih s negativnom reakcijom, pa je i relativni rizik (HR) manji nego kad je GLI1=0, **tablica 8., slika 18.**



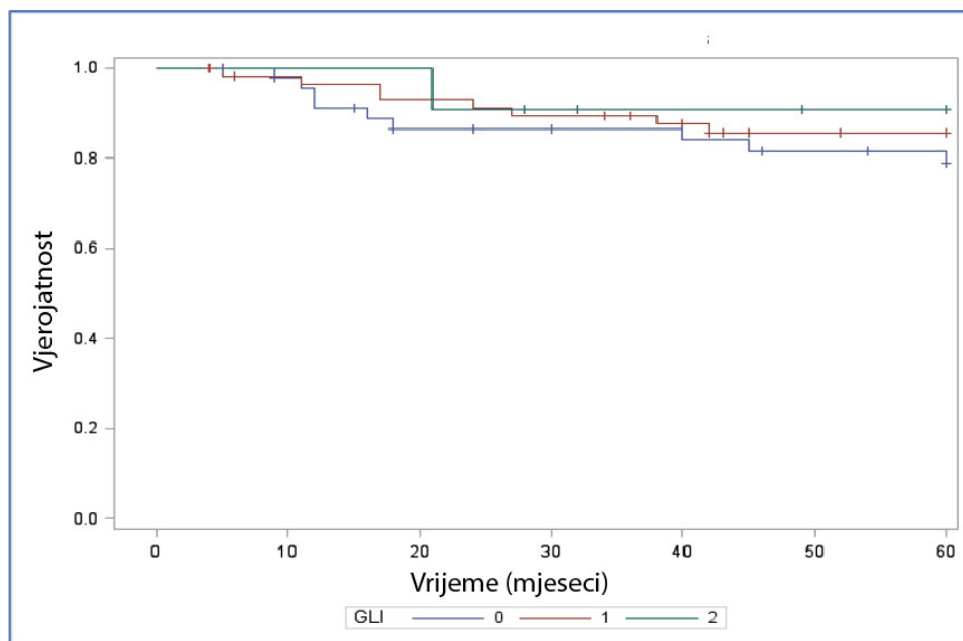
**Slika 15.** Krivulja ukupnog doživljenja prema izraženosti imunohistokemijske reakcije SHH. Cenzorirani podatci označeni su okomitim crticama na krivulji doživljenja. Log-rank test:  $\chi^2=6,74$ ;  $P=0,034$  (**tablica 8.**). Plavo je označena negativna imunoreakcija (0); crvena krivulja označava umjereno izraženu reakciju (1); zeleno je označena snažno izražena imunoreakcija (2)



**Slika 16.** Krivulja ukupnog doživljenja prema izraženosti imunohistokemijske reakcije PTCH. Cenzorirani podatci označeni su okomitim crticama na krivulji doživljenja. Log-rank test:  $\chi^2=3,04$ ;  $P=0,219$  (tablica 8.)



**Slika 17.** Krivulja ukupnog doživljenja prema izraženosti imunohistokemijske reakcije SMO. Cenzorirani podatci označeni su okomitim crticama na krivulji doživljenja. Log-rank test:  $\chi^2=0,16$ ;  $P=0,923$  (tablica 8.)

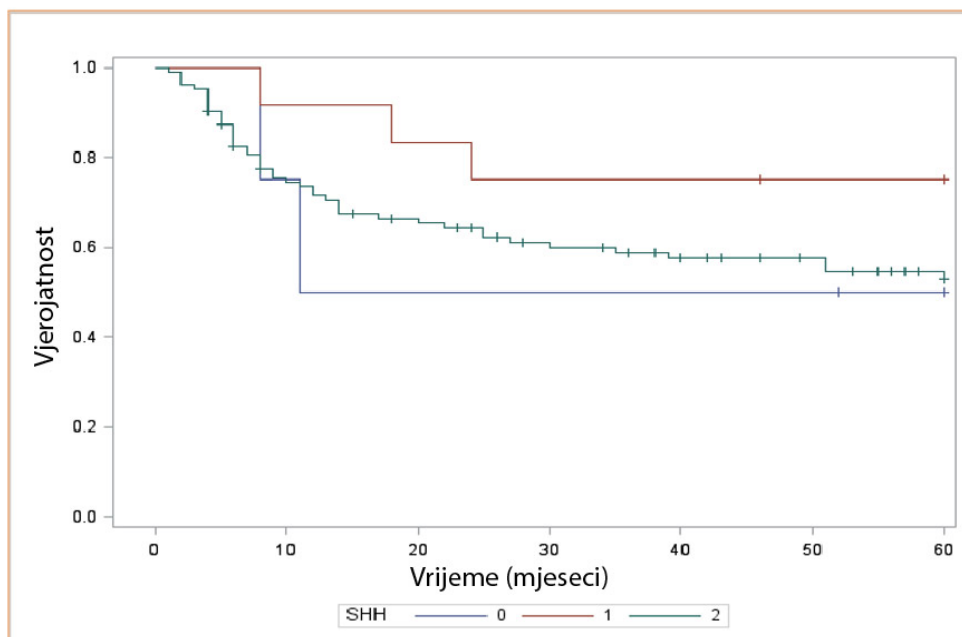


**Slika 18.** Krivulja ukupnog doživljenja prema izraženosti imunohistokemijske reakcije GLI1. Cenzorirani podatci označeni su okomitim crticama na krivulji doživljenja. Log-rank test:  $\chi^2=1,11$ ;  $P=0,574$  (**tablica 8.**)

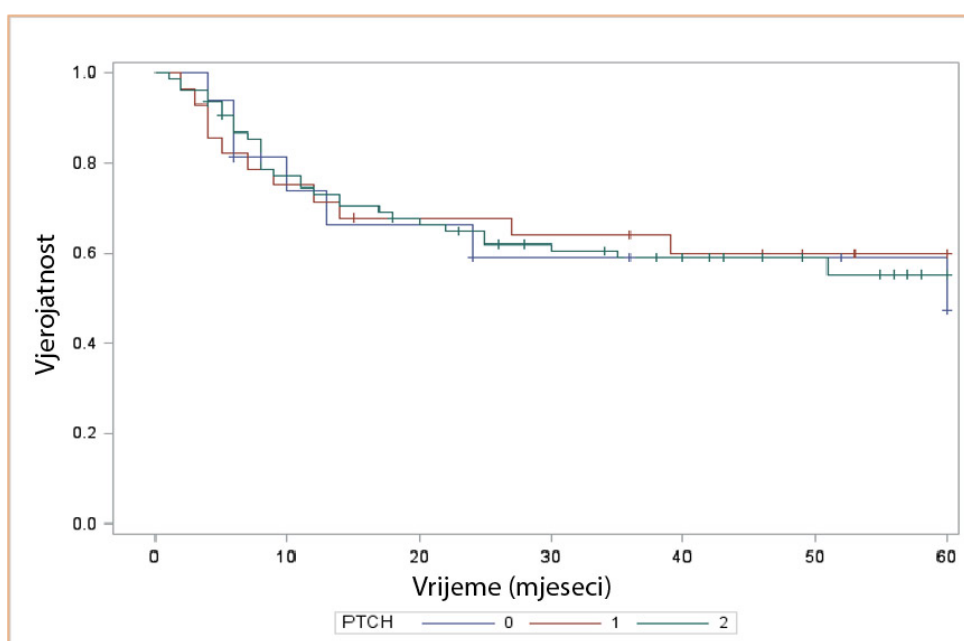
**Tablica 9.** Rezultati analize doživljenja bez bolesti (DFS) prema imunohistokemijskoj izraženosti bjelančevina Hedgehoga signalnoga puta

HH		broj		postotak (%)	Log-rank test	Coxova regresijska analiza			
		recidiv	cenzoriranih	cenzoriranih		Procijenjen parametar	SE	P	HR
SHH	0	2	2	50	$\chi^2=1,96$ $P=0,374$				
	1	3	9	75		-0,91	0,91	0,316	0,400
	2	45	59	56,73		-0,12	0,72	0,867	0,886
PTCH	0	7	9	56,25	$\chi^2=0,16$ $P=0,924$				
	1	11	17	60,71		-0,19	0,48	0,693	0,826
	2	32	44	57,89		-0,12	0,42	0,773	0,887
SMO	0	9	8	47,06	$\chi^2=0,86$ $P=0,649$				
	1	19	28	59,57		-0,04	0,40	0,365	0,693
	2	22	34	60,71		-0,29	0,39	0,461	0,747
GLI1	0	22	26	54,17	$\chi^2=0,86$ $P=0,651$				
	1	24	37	60,66		-0,24	0,29	0,410	0,784
	2	4	7	58,33		-0,33	0,54	0,538	0,715

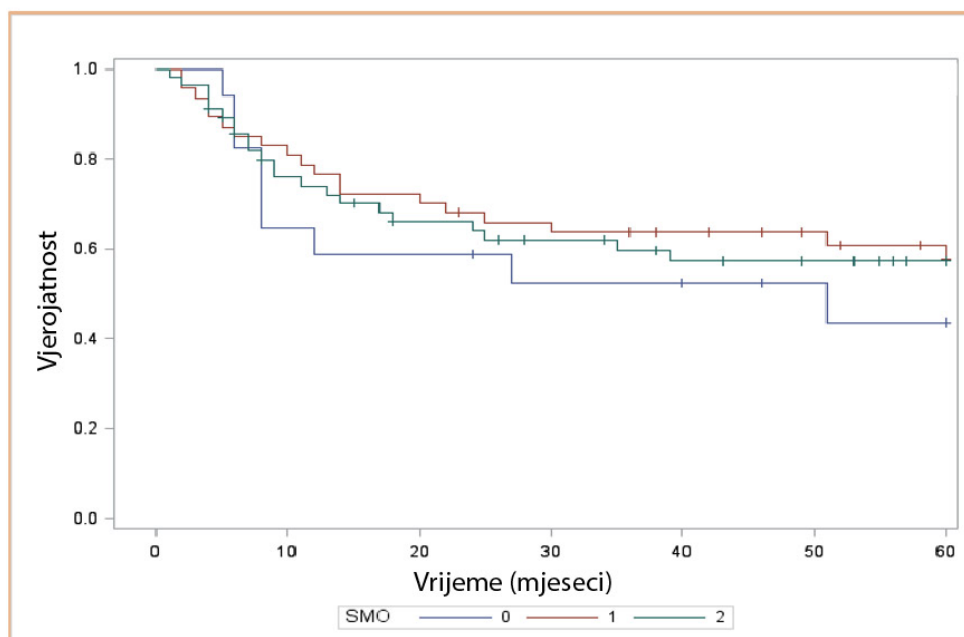
Prema Coxovoj regresijskoj analizi (**tablica 9.**) vidimo da je za sve bjelančevine HH signalnoga puta HR manji za umjereno i snažno izraženu imunoreakciju od negativne, zbog toga što je broj recidiva u relativnom odnosu na cenzorirane najveći kod negativne reakcije (SHH -50 %, PTCH -43,75 %, SMO -52,94 %, GLI1 -45,83 %), iako ti rezultati nisu statistički značajni (**slike 19-22.**)



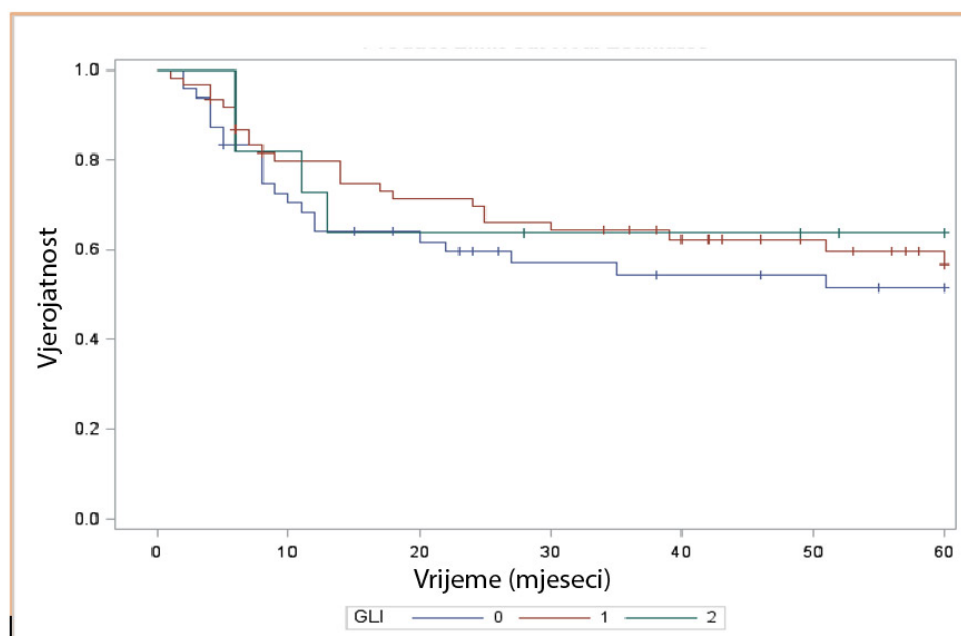
**Slika 19.** Krivulja doživljenja bez bolesti prema izraženosti imunohistokemijske reakcije SHH. Cenzorirani podatci označeni su okomitim crticama na krivulji doživljenja. Log-rank test:  $\chi^2=1,96$ ;  $P=0,374$  (tablica 9.)



**Slika 20.** Krivulja doživljenja bez bolesti prema izraženosti imunohistokemijske reakcije PTCH. Cenzorirani podatci označeni su okomitim crticama na krivulji doživljenja. Log-rank test:  $\chi^2=0,16$ ;  $P=0,924$  (tablica 9.)



**Slika 21.** Krivulja doživljenja bez bolesti prema izraženosti imunohistokemijske reakcije SMO. Cenzorirani podatci označeni su okomitim crticama na krivulji doživljenja. Log-rank test:  $\chi^2=0,86$  ;  $P=0,649$  (tablica 9.)



**Slika 22.** Krivulja doživljenja bez bolesti prema izraženosti imunohistokemijske reakcije GLI1. Cenzorirani podatci označeni su okomitim crticama na krivulji doživljenja. Log-rank test:  $\chi^2=0,86$ ;  $P=0,651$  (tablica 9.)

**Tablica 10.** Rezultati univarijatne Coxove regresije za OS i DFS prema pojavi lokalnog i regionalnog recidiva, udaljenih metastaza, prisutnosti okultnih metastaza i proboja čahure limfnog čvora.

Promatrani čimbenik	OS				DFS			
	Procijenjen parametar	SE	<i>P</i>	HR	Procijenjen parametar	SE	<i>P</i>	HR
Lokalni recidiv	2,69	0,48	<0,001	14,868	1,39	0,33	<0,001	4,016
Regionalne metastaze	1,76	0,48	<0,001	5,787	2,53	0,31	<0,001	12,549
Udaljene metastaze	2,02	0,57	<0,001	7,582	1,41	0,48	0,003	4,103
Okultne metastaze	1,76	0,53	<0,001	5,830	1,33	0,29	<0,001	3,775
Proboj čahure	0,45	0,29	0,123	1,570	1,06	0,24	<0,001	2,884

Pogledamo li varijable nastanka lokalnog i regionalnog recidiva, udaljenih metastaza, prisutnosti okultnih metastaza i proboja čahure limfnog čvora vidimo da su relativni rizici smrti za OS i pojave recidiva bolesti za DFS statistički značajni (**tablica 10.**).

Bolesnici koji su dobili lokalni recidiv imali su 14,87 puta veći rizik za smrtni ishod, dok je za bolesnike s regionalnim metastazama taj je rizik bio 5,79 puta veći ( $P < 0,001$ ). Bolesnici koji imaju okultne metastaze imaju za 5,8 puta veći rizik za smrtni ishod u OS od onih kojima je učinjena elektivna disekcija vrata te u disektatu nije bilo histološki potvrđenih metastaza, dok je rizik za nastanak recidiva bolesti u tih bolesnika bio 3,77 puta veći.

Bolesnici kod kojih nastanu udaljene metastaze imaju 7,58 puta statistički značajno veći relativni rizik za smrtni ishod OS od onih koji nemaju diseminaciju bolesti. Proboj čahure limfnog čvora metastazom povećava relativni rizik OS za 57 %, ali taj rezultat nije bio statistički značajan, dok se statistički značajno povećava rizik za nastanak recidiva i to 2,88 puta ( $P < 0,001$ ). Kad se promatra pojava recidiva, regionalne metastaze imaju najveći relativni rizik i iznosi 12,55.

Tijekom praćenja bolesnika, njih 50 (41,7 %) imalo je recidiv bolesti. Ukupno 15 (12,5 %) bolesnika imalo je lokalni recidiv karcinoma usne šupljine; 40 (33,3 %) regionalne metastaze u limfnim čvorovima vrata, a 5 (4,1 %) udaljene metastaze.

Za pojavnost okultnih metastaza histološki promjer tumora ( $>2,1$  cm) nije imao statističku značajnost ( $\chi^2=1,86$ ,  $P=0,172$ ), kao niti dubina invazije tumora, iako je najviše ( $N=16$ ) tumora bilo u skupini sa DOI  $>1,0$  cm ( $\chi^2=1,44$ ,  $P=0,485$ ).

Invazija kosti bila je prisutna u samo 4 (10,3 %) bolesnika s metastazama u limfnim čvorovima vrata i nije bila prognostički značajna ( $\chi^2=0,726$ ,  $P=0,394$ ). Zrelost tumorskih stanica bila je  $<25$  % u 4 (10,3 %) bolesnika, 25-75 % u 16 (41 %) bolesnika, i veća od 75 % u 19 (48,7 %) bolesnika s metastazama u trenutku liječenja ( $\chi^2=1,21$ ,  $P=0,549$ ). Šesnaest (41 %) bolesnika imalo je perineuralnu/perivaskularnu invaziju ( $\chi^2=0,31$ ,  $P=0,580$ ).

U bolesnika u kojih je učinjena mandibulektomija (marginalna ili segmentalna) u operaciji COMMANDO bio je statistički značajno veći rizik za metastaze u limfnim čvorovima vrata ( $\chi^2=7,95$ ,  $P=0,019$ ).



## 6. RASPRAVA

Još uvijek ne postoji potpuno pouzdana metoda otkrivanja klinički neizražene regionalne bolesti, kao niti razine rizika za nastanak metastaza karcinoma usne šupljine. Mnoga istraživanja analizirala su čimbenike koji bi ukazali na metastatski potencijal karcinoma usne šupljine kao što su veličina tumora, dubina invazije, podlokalizacija tumora unutar usne šupljine, stupanj diferencijacije, perineuralna i perivaskularna invazija, dezmozoplazija miofibroblasta u stromi, volumen tumora, itd. (136, 138, 140, 141, 155, 161, 235). Unatoč tome i dalje postoje oprečna mišljenja i stavovi vezani uz praćenje i promatranje bolesnika bez klinički evidentnih metastaza u limfnim čvorovima u odnosu na elektivnu disekciju vrata, uz resekciju primarnog tumora. Dokazano je da prisutnost regionalnih metastaza na vratu smanjuje doživljenje bolesnika s tumorima glave i vrata za približno 50 %, što naglašava važnost predikcije pojavnosti istih prilikom odabira načina liječenja (150). Dijagnostički i terapijski cilj u oboljelih od karcinoma usne šupljine jest, osim radiološkim metodama, dobiti više prognostičkih informacija iz molekulskih biljega uzorka tumorskog tkiva uzetih biopsijom.

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti prognostičku vrijednost molekula signalnoga puta HH (SHH, PTCH, SMO i GLI1) u planocelularnom karcinomu usne šupljine. Rezultati ovog istraživanja potvrdili su neke zaključke prethodnih izvješća, prvenstveno vezane uz izraženost molekula signalnoga puta HH u planocelularnom karcinomu usne šupljine (207). Međutim, povezanost pojedinih kliničkih i histoloških obilježja s imunohistokemijskom izraženosti SHH, PTCH, SMO i GLI1 nije bila dovoljno istražena i do sada uglavnom na manjem broju bolesnika.

Prosječna dob bolesnika s planocelularnim karcinomom usne šupljine prema literaturi je 60 godina, što se podudara i sa skupinom bolesnika uključenih u ovo istraživanje, čiji je medijan dobi bio 59 godina. Omjer muškaraca i žena je 4,7:1, što je 3 puta veći omjer u korist muškaraca prema podacima za SAD (5), dok je taj omjer sličan kao u Indiji, što se može objasniti učestalijom konzumacijom duhanskih proizvoda u populaciji (236). Procijenjeno 5-godišnje doživljenje (OS) je bilo 85 %, što je sukladno podacima iz literature (4, 237).

Prema lokalizaciji tumora jednak broj bolesnika (N=44, 36,7 %) imalo je tumor smješten sublingvalno (dno usne šupljine) i na oralnom dijelu jezika, što odgovara podacima o najčešćim podlokalizacijama intraoralnih karcinoma (31, 32). Statistički značajni čimbenici koji su utjecali na prognozu i ishod bolesti, odnosno OS i DFS, bili su lokalni i regionalni

recidiv karcinoma, udaljene metastaze, prisutnost okultnih metastaza u trenutku primarnog liječenja i proboj čahure limfnog čvora s potvrđenom metastazom. Bolesnici koji su dobili lokalni recidiv imali su 14,87 puta veći rizik za smrtni ishod, dok je za bolesnike s regionalnim metastazama taj je rizik bio značajno, odnosno 5,79 puta veći ( $P < 0,001$ ). Prema većini izvješća recidiv u regionalnim limfnim čvorovima najvažniji je prognostički čimbenik za OS (96, 97, 238) te se podatak da je u skupini bolesnika uključenih u ovo istraživanje veći utjecaj imao lokalni recidiv može objasniti prisutnošću lokoregionalnog recidiva, ali su regionalne metastaze imale najveći relativni rizik za DFS (HR=12,55,  $P < 0,001$ ). Ekstranodalno širenje značajno je povećalo rizik za nastanak recidiva i to 2,88 puta ( $P < 0,001$ ). Nešto manji rizik zabilježili su Myers i sur. - OS 51 % za bolesnike s pozitivnim limfnim čvorovima vrata bez proboja čahure i 29 % za bolesnike sa probojem čahure limfnog čvora (152).

Elektivna disekcija vrata učinjena je u 65 (54,2 %) naših bolesnika te su u 39 pregledanih disektata vrata (32,5 % od ukupnog broja bolesnika) histološki potvrđene metastaze, a u 22 (18,3 %) bolesnika (33,8 % učinjenih elektivnih disekcija) potvrđen je proboj čahure limfnog čvora. Ovi rezultati idu u prilog argumentima za elektivnu disekciju vrata u bolesnika s intraoralnim karcinomima ranog stadija, što preporučaju Vasillou i sur. u preglednom članku (55), iako je ekstrakapsularni proboj nađen u nešto manjem postotku od onih u prethodno objavljenim istraživanjima (239).

U bolesnika u kojih je učinjena resekcija mandibule (marginalna ili segmentalna) u operaciji COMMANDO bio je statistički značajno veći rizik za metastaze u limfnim čvorovima vrata ( $\chi^2=7,95$ ,  $P=0,019$ ). To zapravo ne iznenađuje, jer se za taj opseg kirurškog liječenja odabiru bolesnici koji prema kliničkim čimbenicima imaju veći rizik za regionalno širenje bolesti i nastanak recidiva i obuhvaćao je cT2 odnosno većinom stadij tumora cT3.

U ovom istraživanju ispitali smo izraženost molekula signalnoga puta HH (SHH, PTCH, SMO i GLI1) imunohistokemijskim postupkom u planocelularnom karcinomu usne šupljine, kliničkog stadija T1-T3N0 u 120 bolesnika primarno kirurški liječenih u istoj ustanovi, s dodatnim ciljem pokušaja povezivanja izraženosti HH molekula s kliničkim i histološkim čimbenicima koji su dokazano važni za prognozu bolesti te tako određivanju prognostičke uloge molekula HH u karcinomu usne šupljine.

Rezultati su pokazali pozitivnu reakciju za SHH u 96,7 % bolesnika: od toga imunohistokemijski indeks negativan u 4 uzorka (3,3 %), umjereno izražen u 12 (10 %) a snažno izražen u 104 uzorka (86,7 %); PTCH u 86,7 % bolesnika: od toga negativna reakcija u 16 (13,3 %) tumorska uzorka, umjereno izražena u 28 (23,3 %), snažno izražena u 76 (63,4

%) tumora; SMO je dokazan u 85,8 % bolesnika: negativnih je bilo 17 uzoraka (14,2 %), umjereno izraženih 47 (39,1 %), a snažno izraženih 56 (46,7 %); GLI1 imunohistokemijski je dokazan u 60 % bolesnika: od toga prema imunohistokemijskom indeksu bojanja negativnih je bilo 48 (40 %), umjereno izraženih 61 (50,8 %), a snažno izraženih 11 (9,2 %) uzoraka tumora. Imunohistokemijsko obojenje je bilo većinom citoplazmatsko, jedino je za GLI1 bilo nuklearno i citoplazmatsko, što su našli i drugi autori (212). Više bolesnika imalo je izražene GLI1 i SMO nego što su 2019. godine Richtig i sur. našli u bolesnika sa karcinomima glave i vrata, gdje su ispitivali prognostičku vrijednost te dvije bjelančevine, ali su podijelili uzorke tumora prema jačini imunohistokemijske reakcije u samo dvije skupine - pozitivnu i negativnu (211). Prikazali su rezultate više stope doživljenja bolesnika sa snažno izraženim SMO u tumorskom tkivu.

Leović i sur. našli su jaču imunohistokemijsku izraženost za PTCH i SMO u tumorima usne šupljine i orofarinksa te su našli povezanost između IMH izraženosti SHH i SMO, koju mi nismo ispitivali u našem istraživanju (215).

U našoj skupini bolesnika SHH i PTCH bili su većinom snažno izraženi (IMH indeks=II), SMO u nešto manjem postotku (46,7 %), dok je GLI1 imao većinom umjereno izraženu imunohistokemijsku reakciju (GLI=I), u 50,8 % tumora.

Coxova regresijska analiza nije pokazala statistički značajni utjecaj izraženosti pojedinih molekula PTCH, SMO i GLI1 molekula signalnoga puta HH na OS bolesnika, dok je SHH imao statistički značajan utjecaj na OS ( $\chi^2=6,74$ ,  $P=0,034$ ). Postoji statistički značajna razlika između bolesnika s negativnom reakcijom SHH i onih sa snažno izraženim imunohistokemijskim indeksom, a u skupini s umjereno izraženim SHH nije bilo umrlih pa se nije mogao procijeniti HR za tu skupinu. Treba naglasiti da se ta značajnost temelji na tome što su 2 bolesnika sa smrtnim ishodom, od kojih je jedan umro za 10 i jedan za 20 mjeseci. Dakle u toj skupini je mali broj bolesnika, 2 umrla i 2 cenzorirana. S druge strane, ostali autori u svojim istraživanjima često imaju male skupine bolesnika ( $N=20-40$ ), pa su podjelom imunohistokemijske reakcije na samo pozitivnu/negativnu za pojedinu HH molekulu, smanjili mogućnost za manju raspodjelu po skupinama kod statistički značajnih rezultata. Kad promatramo molekulu PTCH također se vidi gradacijski rast rizika za OS prema jačini imunohistokemijskog indeksa. Tako je umjereno izražen PTCH (PTCH=I) u odnosu na negativnu reakciju (PTCH=0) imao za 3,8 % veći rizik smrtnog ishoda, dok je snažno izražen (PTCH=II) s obzirom na negativnu reakciju, imao 2,9 puta veći rizik smrti, međutim to nisu bili statistički značajni rezultati ( $\chi^2=3,04$ ,  $P=0,219$ ). Zanimljiv je rezultat da su bolesnici s umjereno izraženim SMO u tumorskom tkivu imali veći rizik za OS od onih sa snažno

izraženim u odnosu na tumore s negativnom reakcijom (36,2 % i 23,3 % veći HR), iako ni to nije bilo statistički značajno. Bolesnika s umjereno i snažno izraženim GLI1 u tumorskom tkivu ima manji broj umrlih od onih s negativnom reakcijom pa je i HR manji nego kad je GLI1=0, no sve bez statističkog značaja. Ti podatci vode upravo suprotnom zaključku od onog koje pokazuju Yang i sur., kojima se snažno izražen GLI1 pokazao kao negativan prognostički čimbenik za ishod bolesti, doduše ispitivali su prognostičku vrijednost za planocelularni karcinom jednjaka (240), dok je za planocelularni karcinom usne šupljine snažno izražen GLI1 kao rizični čimbenik za nastanak metastaza u limfnim čvorovima vrata zabilježen u drugom istraživanju (241).

Za DFS nije bilo statistički značajne povezanosti s imunohistokemijskom izraženosti molekula signalnog puta HH. Prema Coxovoj univarijatnoj regresijskoj analizi za sve je bjelančevine HH signalnog puta HR bio manji za umjereno i snažno izraženu imunoreakciju od negativne, zbog toga što je broj recidiva u relativnom odnosu na cenzorirane najveći kod negativne reakcije (SHH -50 %, PTCH -43,75 %, SMO -52,94 %, GLI1 -45,83 %). Richtig i sur. u univarijatnoj i multivarijatnoj analizi dobili su rezultat prema kojem je jaka izraženost SMO značajno povezana s duljim DFS-om, odnosno jaka izraženost SMO daje skoro dvostruko veće izgleda za dulji DFS, i to je jedini statistički značajan čimbenik (211).

Analizirana povezanost imunohistokemijske izraženosti sve četiri molekule signalnog puta HH (SHH, PTCH, SMO i GLI1) i antropometrijskih i kliničkih čimbenika bolesnika s planocelularnim karcinomom usne šupljine promatranih u ovom istraživanju (dob, spol, lokalizacija tumora, klinički T stadij) nije pokazala statističku značajnost.

Snažno izražena reakcija bila je za molekulu SHH, češća u muškaraca, ali kao ni dob nije bilo statistički značajne povezanosti. Prema lokalizaciji jedino je snažno izražena reakcija SHH bila u najvećem broju tumora jezika i sublingvalno, međutim, to se podudara sa činjenicom da se radi o dva čimbenika najčešća u promatranim skupinama, iako bez značajnog međusobnog utjecaja ( $\chi^2= 5,453$ ,  $P=0,684$ ). U literaturi nema podataka za usporedbu rezultata za ova tri čimbenika, jer ih drugi autori nisu ispitivali u odnosu na izraženost molekula HH. Jedno od prvih istraživanja koje je ispitivalo molekule stanične signalizacije HH potvrdilo je da nema značajne povezanosti između četiri promatrane molekule i spola, ali je uzorak bio malen (242).

U odnosu na klinički stadij tumora T jedino odstupanje vidi se u skupini tumora T2 sa snažno izraženom reakcijom na bjelančevinu SHH (N=64) ali nije bilo statistički značajno ( $\chi^2= 6,099$ ,  $P=0,196$ ). Spomenuto istraživanje našlo je povezanost izraženosti SMO u tumorskom

tkivu s kliničkim stadijem bolesti, međutim, autori nisu objasnili način povezanosti (241). Druga istraživanja uspoređivala su povezanost sa stadijem pT.

Kada gledamo rezultate povezanosti promatranih histoloških osobina tumora i IMH izraženosti bjelančevina HH, iako bez statističke značajnosti, vidi se prevladavajući udio stadija tumora pT2 u odnosu na pozitivnu IMH reakciju za SHH, PTCH, SMO i GLI1. Prema literaturi također nema dokazanog utjecaja molekula HH na stadij oralnih karcinoma, ali su Wang i sur. u svojim rezultatima pokazali statistički značajnu povezanost jače nuklearne izraženosti GLI1 i veličine primarnog tumora (s razdjelnim skupinama  $< 4 \text{ cm}$ ) (207).

S obzirom na stupanj diferencijacije tumorskih stanica SHH, PTCH i SMO imali su najčešće pozitivnu imunohistokemijsku reakciju u dobro diferenciranim tumorima (više od 50 % tumorskih uzoraka s pozitivnim reakcijama). U istraživanju sa 43 bolesnika s planocelularnim karcinomom usne šupljine Leović i sur. dokazali su da dobro diferencirani tumori imaju jače izraženu reakciju GLI1 od slabo diferenciranih tumora ( $P=0,022$ ), ali je izraženost PTCH-a bila jača u slabo diferenciranim tumorima ( $P=0,034$ ) (215), dok u ovom istraživanju ta razlika nije bila izražena u tumorskom tkivu.

Obzirom na stadij pN u 65 bolesnika u kojih je učinjena elektivna disekcija vrata prevladavao je pozitivitet SHH, PTCH i SMO u limfnim čvorovima vrata pN0 (N=25; N=22; N=24) i pN3 (N=21; N=21; N=14). Nedostatak gradacijskog porasta u izraženosti molekula HH prema stadiju pN vjerojatno možemo objasniti ekstranodalnim probojem kao kriterijem za stadij pN3. Vidimo da se gotovo jednaka raspodjela pozitivnih reakcija za SHH, PTCH i SMO zabilježila i kad se promatrao proboj čahure metastatskog limfnog čvora, međutim ni ti podaci nisu bili statistički značajni.

Prisutnost perineuralne/perivaskularne invazije i DOI tumora, kao važnog prognostičkog čimbenika za nastanak regionalnih metastaza, nisu pokazali statistički značajnu povezanost s izraženosti molekula signalnog puta HH. Podjela prema razdjelnim vrijednostima klasifikacije TNM s obzirom na DOI (na 3 stupnja) smanjuje mogućnost izražavanja povezanosti s pojedinim molekulama jer se smanjuje broj uzoraka po skupini, međutim, primjetna je veća izraženost za sve četiri molekule puta HH u karcinomima dubine invazije veće od 0,5 cm, pa je tako SHH pozitivan u 81 tumoru, PTCH u 71, SMO u 72, a GLI1 u 49 tumora prognostički značajnog DOI-a. Prema mnogim autorima DOI veća od 0,4 cm ima prognostički značajnu vrijednost u smislu predviđanja lokoregionalnog recidiva bolesti (141, 142), pa bi stoga veći broj bolesnika i drukčiji razdjelni kriteriji mogli pridonijeti statistički značajnom rezultatu za ovu kategoriju.

Glavne prednosti ovog istraživanja su broj uključenih bolesnika s planocelularnim karcinomom usne šupljine (N=120) koji je veći no u većine objavljenih istraživanja te ispitivanje povezanosti izraženosti sve četiri molekule signalnoga puta HH (SHH, PTCH, SMO i GLI1) zasebno s kliničkim i histološkim obilježjima koji se dokazano smatraju važnima za prognozu ishoda bolesti ovih bolesnika. Također, način određivanja imunohistokemijskog indeksa, odnosno "cut-off" kriteriji prema imunohistokemijskom bojenju tumorskog tkiva i metoda semikvantifikacije daje detaljniju i jasniju stratifikaciju ispitivanog uzorka od većine metoda korištenih u ostalim objavljenim istraživanjima. Svi bolesnici liječeni su u istoj ustanovi, što doprinosi univerzalnom pristupu pri odabiru načina liječenja, odnosno ujednačenosti kohorte. Postoji značajna izraženost molekula signalnoga puta HH u planocelularnom karcinomu usne šupljine (SHH u čak 96,7 % tumora i jedina se pokazala kao statistički značajna za ishod bolesti) međutim našim rezultatima pokazali smo da prognostička vrijednost u odnosu na pojedine kliničke i histološke prediktivne čimbenike nije značajna, iako postoje objavljena istraživanja koja za neke čimbenike dokazuju suprotno.

## 7. ZAKLJUČAK

1. Imunohistokemijskim indeksom bojenja određena izraženost bjelančevina signalnog puta HH (SHH, PTCH, SMO i GLI1) u oboljelih od karcinoma usne šupljine nije bila povezana s recidivom bolesti. Coxovom univarijantnom regresijskom analizom dokazano je za sve istraživane molekule signalnog puta HH manji HR za umjereno i snažno izraženu imunoreakciju od negativne, ali bez statističke značajnosti.
2. Imunohistokemijskim indeksom bojenja pozitivna izraženost SHH u tumoru pokazala se kao statistički značajan čimbenik za ukupno doživljenje bolesnika ( $\chi^2=6,74$ ,  $P=0,034$ ).
3. Biološko ponašanje tumora nije bilo povezano s izraženosti bjelančevina HH u tkivu karcinoma usne šupljine pa stoga njegovo rutinsko određivanje u ovim tumorima nije opravdano.
4. Imunohistokemijska izraženost molekula Hedgehoga signalnoga puta nije bila povezana s ispitivanim kliničkim i histološkim prognostičkim čimbenicima u planocelularnom karcinomu usne šupljine.
5. Čimbenici koji su utjecali na prognozu i ishod bolesti, odnosno OS i DFS, bili su lokalni i regionalni recidiv karcinoma, udaljene metastaze, prisutnost okultnih metastaza u trenutku primarnog liječenja i proboj čahure limfnog čvora.
6. Bolesnici koji su dobili lokalni recidiv imali su 14,8 puta veći rizik za smrtni ishod, dok je za bolesnike s regionalnim metastazama taj je rizik bio 5,8 puta veći, a regionalne metastaze imale su najveći relativni rizik za DFS (HR=12,55).
7. Ekstranodalno širenje značajno je povećavalo rizik za nastanak recidiva i to 2,88 puta.
8. U bolesnika u kojih je učinjena resekcija mandibule u operaciji COMMANDO bio je statistički značajno veći rizik za metastaze u limfnim čvorovima vrata ( $\chi^2=7,95$ ;  $P=0,019$ ), što povezujemo uz stadij cT bolesti bolesnika.

## 8. SAŽETAK

**Uvod:** Hedgehog (HH) signalni put uključen je u embrionalni razvoj, proliferaciju i diferencijaciju stanica brojnih tkiva, te regulira epitelno-mezenhimni prijelaz (EMT) stanica uz pomoć liganada HH (SHH, PTCH, SMO i GLI1). Iako su molekule HH pojačano izražene u različitim zloćudnim tumorima, nije dovoljno poznata prognostička vrijednost njihove izraženosti u planocelularnom karcinomu usne šupljine.

**Ispitanici i metode:** Istraživanje je uključilo 120 bolesnika s karcinomom usne šupljine kliničkog stadija T1-T3N0 koji su primarno kirurški liječeni u razdoblju od 1. siječnja 2006. do 31. prosinca 2010. godine. Ovim istraživanjem određena je izraženost molekula Hedgehoga signalnoga puta u planocelularnom karcinomu usne šupljine imunohistokemijskim postupkom i semikvantitativnom analizom. Dobiveni rezultati korelirani su s kliničkim i histološkim prognostičkim obilježjima, pojavom recidiva bolesti i doživljenjem bolesnika.

**Rezultati:** Ispitivana skupina brojala je 99 (82,5 %) muškaraca i 21 (17,5 %) ženu, prosječne dobi 59 godina. Procijenjeno 5-godišnje doživljenje je bilo 85 %. Tijekom praćenja, umrlo je 18 bolesnika, a 102 je cenzorirano. Procijenjeno 5-godišnje doživljenje bez bolesti jest 53,33 %. U razdoblju praćenja 50 bolesnika razvilo je recidiv bolesti. SHH je dokazan u uzorcima 116 (96,7 %) bolesnika, PTCH u 104 (86,7 %), SMO u 103 (85,8 %), GLI1 u 72 (60 %) bolesnika. Stupanj izraženost HH proteina nije bio značajno povezan s ispitivanim kliničkim ili histološkim obilježjima. Jednako tako, izraženost molekula Hedgehoga signalnoga puta nije povezana s pojavom recidiva bolesti i s duljinom doživljenja, osim SHH za koji se izraženost u tumoru pokazala kao statistički značajan čimbenik za ukupno doživljenje bolesnika ( $\chi^2=6,74$ ,  $P=0,034$ ).

**Zaključci:** S obzirom na to da biološko ponašanje tumora ne ovisi o jačini izraženosti molekula signalnog puta HH, rutinsko određivanje njihove izraženosti u karcinomu usne šupljine, metodom imunohistokemije, nije opravdano. Čimbenici koji su utjecali na prognozu i ishod bolesti, odnosno OS i DFS, su lokalni i regionalni recidiv karcinoma, udaljene metastaze, prisutnost okultnih metastaza u trenutku primarnog liječenja i proboj čahure limfnog čvora.



## 9. SUMMARY

### **Title: Prognostic value of Hedgehog signaling pathway molecules in squamous cell carcinoma of the oral cavity**

Sandra Baranović

Year 2023

**Introduction:** Hedgehog signaling pathway is involved in embryonic development, proliferation and differentiation of cells and tissues. It also regulates epithelial-mesenchymal transition (EMT) through activation of SHH, PTCH, SMO and GLI1. Overexpression of Hedgehog signaling pathway proteins has been shown in various malignant tumors. However, the prognostic significance of its expression in oral squamous cell carcinoma (OSCC) is still not known enough.

**Patients and methods:** The study included 120 patients with clinically T1-3N0 OSCC, who were treated primarily with surgery, between January 1, 2006 and December 31, 2010. Immunohistochemistry and semiquantitative analyses were performed in order to determine the level of Hedgehog molecules in OSCC, thus correlating it with clinical and histological prognostic parameters, disease recurrence and survival.

**Results:** There were 99 (82.5 %) males and 21 (17.5 %) females, with an average age of 59 years. Five-year overall survival rate for the whole cohort was 85 %. Eighteen patients had died during the follow-up, while 102 patients were censored. Five-year disease free survival was 53.33 %. Fifty patients had recurrence during follow-up. SHH was expressed in 116 (96.7 %) patients, PTCH in 104 (86.7 %), SMO in 103 (85.8 %), GLI1 in 72 (60 %) patients. We found no correlation of HH molecules expression and clinical or histological prognostic parameters. Also, there was no correlation with DFS and OS except for SHH, whose expression was a statistical relevant factor in accordance to OS ( $\chi^2=6.74$ ,  $P=0.034$ ).

**Conclusions:** Accordingly, routine analysis of Hedgehog signaling molecules expression for predicting the biological behaviour of OSCC is not justified. Recurrence, distant metastases, occult metastases and extranodal extension for positive lymph nodes are factors that had an impact on the prognosis and outcome, OS and DFS.

## 10. LITERATURA:

1. Johnson N, Franceschi S, Ferlay J, Ramadas K, Schmid S, MacDonald Dg i sur. Squamous cell carcinoma. U: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, ur. Pathology and genetics of head and neck tumours. Lyon: IARC Press; 2005. Str. 168-75.
2. Shield KD, Ferlay J, Jemal A, Sankaranarayanan R, Chaturvedi AK, Bray F i sur. The global incidence of lip, oral cavity, and pharyngeal cancers by subsite in 2012. CA Cancer J Clin. 2017;67:51-64.
3. Rastogi T, Devesa S, Mangtani P, Mathew A, Cooper N, Kao R i sur. Cancer incidence rates among South Asians in four geographic regions: India, Singapore, UK and US. Int J Epidemiol. 2008;37:147-60.
4. Siegel, RL, Miller, KD, Fuchs, HE, Jemal, A. Cancer statistics, 2022. CA Cancer J Clin. 2022;72:7-33.
5. Weatherspoon DJ, Chattopadhyay A, Boroumand S, Garcia I. Oral cavity and oropharyngeal cancer incidence trends and disparities in the United States: 2000-2010. Cancer Epidemiol. 2015;39:497-504.
6. Erceg M, Miler Knežević A. Izvješće o umrlim osobama u Hrvatskoj u 2019. godini. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2020.
7. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S i sur. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. Cancer Res. 1988;48:3282-7.
8. Mayne ST, Morse DE, Winn DM. Cancers of the oral cavity and pharynx. U: Schottenfeld D, Fraumeni JF Jr. ur. Cancer epidemiology and prevention. New York: Oxford University Press; 2006. Str. 674–696.
9. Franceschi S, Talamini R, Barra S, Barón AE, Negri E, Bidoli E i sur. Smoking and drinking in relation to cancers of the oral cavity, pharynx, larynx, and esophagus in northern Italy. Cancer Res. 1990;50:6502-7.
10. Day GL, Blot WJ. Second primary tumors in patients with oral cancer. Cancer 1992;70:14-9.
11. Day GL, Blot WJ, Shore RE, McLaughlin JK, Austin DF, Greenberg RS i sur. Second cancers following oral and pharyngeal cancers: role of tobacco and alcohol. J Natl Cancer Inst. 1994;86:131-7.

12. León X, del Prado Venegas M, Orús C, López M, García J, Quer M. Influence of the persistence of tobacco and alcohol use in the appearance of second neoplasm in patients with a head and neck cancer. A case-control study. *Cancer Causes Control*. 2009;20:645-52.
13. Schepman KP, Bezemer PD, van der Meij EH, Smeele LE, van der Waal I. Tobacco usage in relation to the anatomical site of oral leukoplakia. *Oral Dis*. 2001;7:25-7.
14. Prime SS, Thakker NS, Pring M, Guest PG, Paterson IC. A review of inherited cancer syndromes and their relevance to oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2001;37:1-16.
15. Reichart PA, Philipsen HP. Oral erythroplakia - a review. *Oral Oncol*. 2005;41:551-61.
16. Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin*. 2002;52:195-215.
17. Waldron CA, Shafer WG. Leukoplakia revisited. A clinicopathologic study 3256 oral leukoplakias. *Cancer*. 1975;36:1386-92.
18. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L i sur. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92:709-20.
19. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM i sur. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*. 2007;356:1944-56.
20. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14:467-75.
21. Psyrri A, Cohen E. Oropharyngeal cancer: clinical implications of the HPV connection. *Ann Oncol*. 2011;22:997-9.
22. Li G, Sturgis EM. The role of human papillomavirus in squamous carcinoma of the head and neck. *Curr Oncol Rep*. 2006;8:130-9.
23. Machado J, Reis PP, Zhang T, Simpson C, Xu W, Perez-Ordóñez B i sur. Low prevalence of human papillomavirus in oral cavity carcinomas. *Head Neck Oncol*. 2010;2:6.
24. De Petrini M, Rittà M, Schena M, Chiusa L, Campisi P, Giordano C i sur. Head and neck squamous cell carcinoma: role of the human papillomavirus in tumour progression. *New Microbiol*. 2006;29:25-33.

25. Götz C, Bischof C, Wolff KD, Kolk A. Detection of HPV infection in head and neck cancers: Promise and pitfalls in the last ten years: A meta-analysis. *Mol Clin Oncol.* 2019;10:17-28.
26. Zhao D, Xu QG, Chen XM, Fan MW. Human papillomavirus as an independent predictor in oral squamous cell cancer. *Int J Oral Sci.* 2009;1:119-25.
27. Gillison ML, Chaturvedi AK, Anderson WF, Fakhry C. Epidemiology of Human Papillomavirus-Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Oncol.* 2015;33:3235-42.
28. Gillison ML, Alemany L, Snijders PJ, Chaturvedi A, Steinberg BM, Schwartz S i sur. Human papillomavirus and diseases of the upper airway: head and neck cancer and respiratory papillomatosis. *Vaccine.* 2012;30:34-54.
29. Boyle JO, Strong EW. Oral Cavity Cancer. U: Shah JP, ur. American Cancer Society Atlas of Clinical Oncology: Cancer of the Head and Neck. Hamilton, London: BC Decker Inc.; 2001, str. 100-26.
30. Troeltzch M, Knösel T, Eichinger C, Probst F, Troeltzsch M, Woodlock T i sur. Clinicopathologic features of oral squamous cell carcinoma: do they vary in different age groups? *J Oral Maxillofac Surg.* 2014;72:1291-300.
31. Sundermann BV, Uhlmann L, Hoffmann J, Freier K, Thiele OC. The localization and risk factors of squamous cell carcinoma in the oral cavity: A retrospective study of 1501 cases. *J Craniomaxillofac Surg.* 2018;46:177-182.
32. Bell RB, Kademani D, Homer L, Dierks EJ, Potter BE. Tongue cancer: Is there a difference in survival compared with other subsites in the oral cavity? *J Oral Maxillofac Surg.* 2007;65:229-36.
33. Manon RR, Myers JN, Khuntia D, Harari PM. Oral Cavity Cancer. U: Halperin EC, Perez CA, Brady LW, ur. Principles and Practice of Radiation Oncology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2008, str. 891-912.
34. Barnes L. Metastases to the head and neck: an overview. *Head Neck Pathol.* 2009;3:217-24.
35. Disibio G, French SW. Metastatic patterns of cancers: results from a large autopsy study. *Arch Pathol Lab Med.* 2008;132:931-9.
36. Myers E. Cancer of the head and neck. 4 izd. Philadelphia: WB Saunders; 2003.

37. Kähling C, Langguth T, Roller F, Kroll T, Krombach G, Knitschke M i sur. A retrospective analysis of preoperative staging modalities for oral squamous cell carcinoma. *J Craniomaxillofac Surg.* 2016;44:1952-6.
38. Arya S, Rane P, Deshmukh A. Oral cavity squamous cell carcinoma: role of pretreatment imaging and its influence on management. *Clin Radiol.* 2014;69:916-30.
39. Huang SH, O'Sullivan B. Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer. *Curr Treat Options Oncol.* 2017;18:40.
40. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C, ur. *TNM Classification of Malignant Tumours*, 8. izd. New York: Wiley-Blackwell; 2017.
41. Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK i sur., ur. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8. izd. New York: Springer International Publishing; 2017.
42. Boyle JO, Strong EW. Oral Cavity Cancer. U: Shah JP, ur. *American Cancer Society Atlas of Clinical Oncology: Cancer of the Head and Neck*. Hamilton, London: BC Decker Inc.; 2001, str. 100-26.
43. Chinn SB, Myers JN. Oral cavity carcinoma: current management, controversies, and future directions. *J Clin Oncol.* 2015;33:3269-76.
44. Crile G. On the surgical treatment of cancer of the head and neck with a summary of one hundred and twenty-one operations performed upon one hundred and five patients. *Trans South Surg Gynecol Assoc.* 1905;18:108-27.
45. Crile G. Excision of cancer of the head and neck with special reference to the plan of dissection based on one hundred and thirty-two operations. *JAMA* 1906;47:1780-6.
46. Hayes M. *The surgery of head and neck tumors*. 1 izd. New York: Paul B. Hoeber, Inc. 1957.
47. Chicarilli ZN, Ariyan S. *Cancer of the oral cavity. Surgical management*. U: Ariyan S, ur. *Cancer of the head and neck*. St. Louis: C.V. Mosby; 1987, str. 209-22.
48. Joo YH, Cho JK, Koo BS, Kwon M, Kwon SK, Kwon SY i sur. Guidelines for the Surgical Management of Oral Cancer: Korean Society of Thyroid-Head and Neck Surgery. *Clin Exp Otorhinolaryngol.* 2019;12:107-144.
49. Ord RA. Surgical management of the N0 neck in early stage T1-2 oral cancer; a personal perspective of early and late impalpable disease. *Oral Maxillofac Surg.* 2012;16:181-8.
50. O'Brien CJ, Traynor SJ, McNeil E, McMahon JD, Chaplin JM. The use of clinical criteria alone in the management of the clinically negative neck among patients with

- squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2000;126:360-5.
51. Yuen AP, Ho CM, Chow TL, Tang LC, Cheung WY, Ng RW i sur. Prospective randomized study of selective neck dissection versus observation for N0 neck of early tongue carcinoma. *Head Neck.* 2009;31:765-72.
  52. Huang SF, Kang CJ, Lin CY, Kang-Hsing F, Tzu-Chen Y, Hung-Ming W i sur. Neck treatment of patients with early stage oral tongue cancer: comparison between observation, supraomohyoid dissection, and extended dissection. *Cancer.* 2008;112:1066-75.
  53. Capote A, Escorial V, Muñoz-Guerra MF, Rodríguez-Campo FJ, Gamallo C, Naval L. Elective neck dissection in early-stage oral squamous cell carcinoma-does it influence recurrence and survival? *Head Neck.* 2007;29:3-11.
  54. D'Cruz AK, Vaish R, Kapre N, Dandekar M, Gupta S, Hawaldar R i sur. Elective versus therapeutic neck dissection in node-negative oral cancer. *N Engl J Med.* 2015;373:521-9.
  55. Vassiliou LV, Acero J, Gulati A, Hölzle F, Hutchison IL, Prabhu S i sur. Management of the clinically N0neck in early-stage oral squamous cell carcinoma (OSCC). An EACMFS position paper. *J Craniomaxillofac Surg.* 2020;48:711-18.
  56. N.C.C.N., NCCN clinical practice Guidelines in oncology (NCCN guidelines): Head and neck cancers. NCCN guidelines. 2019; Verzija 3.2019.
  57. Shah JP, Lydiatt W. Treatment of cancer of the head and neck. *CA Cancer J Clin.* 1995;45:352-68.
  58. Mendenhall WM, Foote LR, Sandow PR, Fernandes RP. Oral cavity cancer. U: Gunderson LL, Tepper JE, ur. *Clinical radiation oncology.* 3. izd. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2012 , str. 553-83.
  59. Bernier J, Cooper JS, Pajak TF, van Glabbeke M, Bourhis J, Forastiere A i sur. Defining risk levels in locally advanced head and neck cancers: a comparative analysis of concurrent postoperative radiation plus chemotherapy trials of the EORTC (#22931) and RTOG (# 9501). *Head Neck.* 2005;27:843-50.
  60. Lavaf A, Genden EM, Cesaretti JA, Packer S, Kao J. Adjuvant radiotherapy improves overall survival for patients with lymph node-positive head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer.* 2008;112:535-43.
  61. Leborge. Elective neck irradiation in the treatment of cancer of the oral tongue. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1987;13:1149-53.

62. Ito Y, Fuwa N, Kikuchi Y, Yokoi N, Hamajima N, Morita K. Elective neck irradiation on ipsilateral side in patients with early tongue cancer for high-risk group with late cervical lymph node metastasis. *Nagoya J Med Sci.* 2006;68:53-62.
63. Fu KK, Pajak TF, Trotti A, Jones CU, Spencer SA, Phillips TL i sur. A Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) phase III randomized study to compare hyperfractionation and two variants of accelerated fractionation to standard fractionation radiotherapy for head and neck squamous cell carcinomas: first report of RTOG 9003. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2000;48:7-16.
64. Fletcher GH. *Textbook of Radiotherapy.* 3 izd. Philadelphia: Lea & Febiger; 1980, str. 194-219.
65. Northrop M, Fletcher GH, Jesse RH, Lindberg RD. Evolution of neck disease in patients with primary squamous cell carcinoma of the oral tongue, floor of mouth, and palatine arch, and clinically positive neck nodes neither fixed nor bilateral. *Cancer.* 1972;29:23-30.
66. Arcangeli G, Friedman M, Paoluzi R. A quantitative study of late radiation effect on normal skin and subcutaneous tissues in human beings. *Br J Radiol.* 1974;47:44-50.
67. ICRU Report 62. Prescribing, Recording and Reporting Photon Beam Therapy (Supplement to ICRU Report 50). *Journal of the ICRU.* 1999.
68. ICRU Report 83: Prescribing, Recording, and Reporting Intensity Modulated Photon Beam Therapy (IMRT). *Journal of the ICRU.* 2010;10.
69. Garden AS, Dong L, Morrison WH, Stugis EM, Glisson BS, Frank SJ i sur. Patterns of disease recurrence following treatment of oropharyngeal cancer with intensity modulated radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2013;85:941-47.
70. Morgan HE, Sher DJ. Adaptive radiotherapy for head and neck cancer. *Cancers Head Neck.* 2020;5:1.
71. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF i sur. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med.* 2010;363:24-35.
72. Budach W, Hehr T, Budach V, Belka C, Dietz K. A meta-analysis of hyperfractionated and accelerated radiotherapy and combined chemotherapy and radiotherapy regimens in unresected locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *BMC Cancer.* 2006;6:28.
73. Bensadoun R-J, Benezery K, Dassonville O, Magné N, Poissonnet G, Ramaïoli A i sur. French multicenter phase III randomized study testing concurrent twice-a-day

- radiotherapy and cisplatin/5-fluorouracil chemotherapy (BiRCF) in unresectable pharyngeal carcinoma: Results at 2 years (FNCLCC- GORTEC). *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006;64:983-94.
74. Lacas B, Bourhis J, Overgaard J, Zhang Q, Grégoire V, Nankivell M i sur. Role of radiotherapy fractionation in head and neck cancers (MARCH): an updated meta-analysis. *The Lancet. Oncology.* 2017;18:1221–37.
  75. 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;22:69-76.
  76. Bourhis J, Calais G, Lapeyre M, Tortochaux J, Alfonsi M, Sire C i sur. Concomitant radiochemotherapy or accelerated radiotherapy: analysis of two randomized trials of the French Head and Neck Cancer Group (GORTEC). *Semin Oncol.* 2004;31:822-6.
  77. Gutiontov SI, Shin EJ, Lok B, Lee NY, Cabanillas R. Intensity-modulated radiotherapy for head and neck surgeons. *Head Neck.* 2016;38:2368-73.
  78. Mendenhall WM, Amdur RJ, Palta JR. Intensity-modulated radiotherapy in the standard management of head and neck cancer: promises and pitfalls. *J Clin Oncol.* 2006;24:2618-23.
  79. Nutting CM, Morden JP, Harrington KJ, Urbano TG, Bhide SA, Clark C i sur. Parotid-sparing intensity modulated versus conventional radiotherapy in head and neck cancer (PARSPORT): a phase 3 multicentre randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2011;12:127–36.
  80. Nguyen NP, Vock J, Chi A, Ewell L, Vos P, Mills M i sur. Effectiveness of intensity-modulated and image-guided radiotherapy to spare the mandible from excessive radiation. *Oral Oncol.* 2012;48:653–7.
  81. Pow EHN, Kwong DLW, McMillan AS, Wong MC, Sham JS, Leung LH i sur. Xerostomia and quality of life after intensity-modulated radiotherapy vs. conventional radiotherapy for early-stage nasopharyngeal carcinoma: initial report on a randomized controlled clinical trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006;66:981-91.
  82. Chi A, Nguyen NP, Tse W, Sobremonte G, Concannon P, Zhu A. Intensity modulated radiotherapy for sinonasal malignancies with a focus on optic pathway preservation. *J Hematol Oncol.* 2013;6:4.
  83. Sindhu SK, Bauman JE. Current Concepts in Chemotherapy for Head and Neck Cancer. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2019;31:145-54.



84. Murphy BA. Carcinomas of the head and neck. U: Skeel, ur. Handbook of the cancer chemotherapy. 8. izd. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011, str. 69-94.
85. Ma J, Liu Y, Huang XL, Zhang ZY, Myers JN, Neskey DM i sur. Induction chemotherapy decreases the rate of distant metastasis in patients with head and neck squamous cell carcinoma but does not improve survival or locoregional control: a meta-analysis. *Oral Oncol.* 2012;48:1076-84.
86. Haddad R, O'Neill A, Rabinowits G, Tishler R, Khuri F, Adkins D i sur. Induction chemotherapy followed by concurrent chemoradiotherapy (sequential chemoradiotherapy) versus concurrent chemoradiotherapy alone in locally advanced head and neck cancer (PARADIGM): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2013;14:257-64.
87. Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, Jacobs J, Campbell BH, Saxman SB i sur. Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 2004;350:1937-44.
88. Dai W, Li Y, Zhou Q, Xu Z, Sun C, Tan X i sur. Cetuximab inhibits oral squamous cell carcinoma invasion and metastasis via degradation of epidermal growth factor receptor. *J Oral Pathol Med.* 2014;43:250-7.
89. Peters S, Kerr KM, Stahel R. PD-1 blockade in advanced NSCLC: A focus on pembrolizumab. *Cancer Treat Rev.* 2018;62:39-49.
90. Burtneß B, Harrington KJ, Greil R, Soulières D, Tahara M, de Castro G Jr i sur. KEYNOTE-048 Investigators. Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet.* 2019;394:1915-28.
91. Robbins KT, Shaha AR, Medina JE, Califano JA, Wolf GT, Ferlito A i sur. Consensus Statement on the Classification and Terminology of Neck Dissection. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008;134:536-8.
92. Grégoire V, Ang K, Budach W, Grau C, Hamoir M, Langendijk JA i sur. Delineation of the neck node levels for head and neck tumors: a 2013 update. DAHANCA, EORTC, HKNPCSG, NCIC CTG, NCRI, RTOG, TROG consensus guidelines. *Radiother Oncol.* 2014;110:172-81.
93. Shah JP, Patel SG, Singh B. Jatin Shah's Head and Neck surgery and oncology: Cervical lymph nodes. 4. izd. Philadelphia: Elsevier Mosby; 2012.

94. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144:646-74.
95. Karaman S, Detmar M. Mechanisms of lymphatic metastasis. *J Clin Invest*. 2014;124:922-928.
96. Xing Y, Zhang J, Lin H, Gold KA, Sturgis EM, Garden AS i sur. Relation between the level of lymph node metastasis and survival in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2016;122:534-45.
97. Suresh GM, Koppad R, Prakash BV, Sabitha KS, Dhara PS. Prognostic Indicators of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Ann Maxillofac Surg*. 2019;9:364-370.
98. Burusapat C, Jarungroongruangchai W, Charoenpitakchai M. Prognostic factors of cervical node status in head and neck squamous cell carcinoma. *World J Surg Oncol*. 2015;13:51.
99. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidranski D. *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. 1. izd. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2005, str. 164-75.
100. Nikolarakos, D. & Bell, R. B. Management of the node-positive neck in oral cancer. *Oral Maxillofac Surg Clin*. 2008;20:499–511.
101. Shah JP, Candela FC, Poddar AK. The patterns of cervical lymph node metastases from squamous carcinoma of the oral cavity. *Cancer*. 1990;66:109-13.
102. Ossoff RH, Sisson GA. Lymphatics of the floor of the mouth and neck: anatomical studies related to contralateral drainage pathways. *Laryngoscope*. 1981;91:1847-50.
103. Woolgar JA: The topography of cervical lymph node metastases revisited: the histological findings in 526 sides of neck dissection from 439 previously un- treated patients. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2007; 36: 219-25.
104. Takes RP, Rinaldo A, Silver CE, Haigentz M Jr, Woolgar JA, Triantafyllou A i sur. Distant metastases from head and neck squamous cell carcinoma. Part I. Basic aspects. *Oral Oncol*. 2012;48:775-9.
105. Kuperman D, Auethavekiat V, Adkins DR, Nussenbaum B, Collins S, Boonchalermvichian C i sur. Squamous cell cancer of the head and neck with distant metastasis at presentation. *Head Neck*. 2011;33:714-8.
106. Hasegawa T, Tanakura M, Takeda D, Sakakibara A, Akashi M, Minamikawa T i sur. Risk factors associated with distant metastasis in patients with oral squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2015;152:1053-60.

107. Ferlito A, Shaha AR, Silver CE, Rinaldo A, Mondin V. Incidence and sites of distant metastases from head and neck cancer. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2001;63:202-7.
108. Osaki T, Yoneda K, Yamamoto T, Kimura T, Matuoka H, Sakai H i sur. Clinical investigation on pulmonary metastasis of head and neck carcinomas. *Oncology.* 2000;59:196–203.
109. Liao CT, Wang HM, Chang JT, Ng SH, Hsueh C, Lee LY i sur. Analysis of risk factors for distant metastases in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer.* 2007;110:1501-8.
110. Spano D, Heck C, De Antonellis P, Christofori G, Zollo M. Molecular networks that regulate cancer metastasis. *Semin Cancer Biol.* 2012;22:234–49.
111. Irani S, Salajegheh A, Smith RA, Lam AK. A review of the profile of endothelin axis in cancer and its management. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2014;89:314–21.
112. Jechlinger M, Grunert S, Tamir IH, Janda E, Ludemann S, Waerner T i sur. Expression profiling of epithelial plasticity in tumor progression. *Oncogene.* 2003;22:7155–69.
113. Irani S. Distant metastasis from oral cancer: A review and molecular biologic aspects. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2016;6:265-71.
114. Lim YC, Koo BS, Choi EC. Bilateral neck node metastasis: a predictor of isolated distant metastasis in patients with oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma after primary curative surgery. *Laryngoscope.* 2007;117:1576-80.
115. Tomioka H, Yamagata Y, Oikawa Y, Ohsako T, Kugimoto T, Kuroshima T i sur. Risk factors for distant metastasis in locoregionally controlled oral squamous cell carcinoma: a retrospective study. *Sci Rep.* 2021;11:5213.
116. Sumioka S, Sawai NY, Kishino M, Ishihama K, Minami M, Okura M. Risk factors for distant metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *J Oral Maxillofac Surg.* 2013;71:1291-7.
117. Duprez F, Berwouts D, De Neve W, Bonte K, Boterberg T, Deron P i sur. Distant metastases in head and neck cancer. *Head Neck.* 2017;39:1733-43.
118. Gospodarowicz M, O'Sullivan B. Prognostic factors in cancer. *Semin Surg Oncol.* 2003;21:13-8.
119. Foulkes WD, Brunet JS, Kowalski LP, Narod SA, Franco EL. Family history of cancer is a risk factor for squamous cell carcinoma of the head and neck in Brazil: a case-control study. *Int J Cancer.* 1995;63:769-73.

120. Hermanek P, Gospodarowicz MK, Henson DE, Hutter RVP, Sobin LH, ur. International Union Against Cancer (UICC). Prognostic factors in cancer. 1 izd. Berlin, Heidelberg: Springer; 1995, str. 1-11.
121. Chang TS, Chang CM, Ho HC, Su YC, Chen LF, Chou P i sur. Impact of young age on the prognosis for oral cancer: a population-based study in Taiwan. *PLoS One* 2013;8:e75855.
122. Sarkaria JN, Harari PM. Oral tongue cancer in young adults less than 40 years of age: rationale for aggressive therapy. *Head Neck*. 1994;16:107-11.
123. Hilly O, Shkedy Y, Hod R, Soudry E, Mizrachi A, Hamzany Y i sur. Carcinoma of the oral tongue in patients younger than 30 years: comparison with patients older than 60 years. *Oral Oncol*. 2013;49:987-90.
124. Iwatsubo T, Ishihara R, Morishima T, Maekawa A, Nakagawa K, Arao M i sur. Impact of age at diagnosis of head and neck cancer on incidence of metachronous cancer. *BMC Cancer*. 2019;19:3.
125. Dittberner A, Friedl B, Wittig A, Buentzel J, Kaftan H, Boeger D i sur. Gender Disparities in Epidemiology, Treatment, and Outcome for Head and Neck Cancer in Germany: A Population-Based Long-Term Analysis from 1996 to 2016 of the Thuringian Cancer Registry. *Cancers (Basel)*. 2020;12:3418.
126. Micheli A, Ciampichini R, Oberaigner W, Ciccolallo L, De Vries E, Izarzugaza I i sur, EURO CARE Working Group: The advantage of women in cancer survival: An analysis of EURO CARE-4 data. *Eur. J. Cancer*. 2009;45:1017–27.
127. Takenaka Y, Takemoto N, Oya R, Inohara H. Prognostic impact of sarcopenia in patients with head and neck cancer treated with surgery or radiation: A meta-analysis. *PLoS ONE*. 2021;16: e0259288.
128. Takenaka Y, Kitamura T, Aoki K, Hamaguchi H, Takemura K, Nozawa M i sur. Prognostic significance of nutritional parameters in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery (Japan)*. 2018;90: 385–9.
129. Oya R, Takenaka Y, Kengo A, Hamaguchi H, Takemura K, Nozawa M i sur. Prognostic Significance of Hematologic Markers in Patients with Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *International Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery*. 2018;7:55-65.

130. Moon H, Roh JL, Lee SW, Kim SB, Choi SH, Nam SY i sur. Prognostic value of nutritional and hematologic markers in head and neck squamous cell carcinoma treated by chemoradiotherapy. *Radiother Oncol.* 2016;118:330-4.
131. Henke M, Laszig R, Rube C, Schäfer U, Haase KD, Schilcher B i sur. Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy: randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2003;362:1255-60.
132. Ribeiro KCB, Kowalski LP, Latorre MRDO. Perioperative complications, comorbidities, and survival in oral or oropharyngeal cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003;129:219-28.
133. Ribeiro KCB, Kowalski LP, Latorre MRDO. Impact of comorbidity, symptoms, and patients characteristics on the prognosis of oral carcinomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2000;126:1079-85.
134. Preciado DA, Matas A, Adams GL. Squamous cell carcinoma of the head and neck in solid organ transplant recipients. *Head Neck.* 2002;24:319-25.
135. Johnson S, McDonald JT, Corsten M. Oral cancer screening and socioeconomic status. *J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2012;41:102-7.
136. Genden EM, Ferlito A, Bradley PJ, Rinaldo A, Scully C. Neck disease and distant metastases. *Oral Oncol.* 2003;39:207-12.
137. Siriwardena BS, Rasnayaka RM, Masood Y, Masood M, Kumarasiri PV, Tilakaratne WM. Predictive model of oral cancer metastasis for different cancer sites and age groups. *J Investig Clin Dent.* 2016;7:127-31.
138. Byers RM, Weber RS, Andrews T, McGill D, Kare R, Wolf P. Frequency and therapeutic implications of "skip metastases" in the neck from squamous carcinoma of the oral tongue. *Head Neck.* 1997;19:14-9.
139. Chang B, He W, Ouyang H, Peng J, Shen L, Wang A i sur. A prognostic nomogram incorporating depth of tumor invasion to predict long-term overall survival for tongue squamous cell carcinoma with R0 resection. *J Cancer.* 2018;9:2107-15.
140. Piazza C, Bresciani L, Giannini L. Depth of invasion for prognostic stratification in oral cavity cancer: do we need further validation?. *Ann Transl Med.* 2019;7:84.
141. Shinn JR, Wood CB, Colazo JM, Harrell FE Jr, Rohde SL, Mannion K. Cumulative incidence of neck recurrence with increasing depth of invasion. *Oral Oncol.* 2018;87:36-42.
142. Faisal M, Abu Bakar M, Sarwar A, Adeel M, Batool F, Malik KI i sur. Depth of invasion (DOI) as a predictor of cervical nodal metastasis and local recurrence in early

- stage squamous cell carcinoma of oral tongue (ESSCOT). *PLoS One*. 2018;13:e0202632.
143. Keski-Säntti H, Atula T, Tikka J, Hollmén J, Mäkitie AA, Leivo I. Predictive value of histopathologic parameters in early squamous cell carcinoma of oral tongue. *Oral Oncol*. 2007;43:1007-13.
  144. Kano S, Sakashita T, Tsushima N, Mizumachi T, Nakazono A, Suzuki T i sur. Validation of the 8th edition of the AJCC/UICC TNM staging system for tongue squamous cell carcinoma. *Int J Clin Oncol*. 2018;23:844-50.
  145. Amit M, Tam S, Takahashi H, Choi KY, Zafereo M, Bell D i sur. Prognostic performance of the American Joint Committee on Cancer 8th edition of the TNM staging system in patients with early oral tongue cancer. *Head Neck*. 2019;41:1270-6.
  146. Knejiens JL, Hauptmann M, Pameijer FA, Balm AJ, Hoebbers FJ, de Bois JA i sur. Tumor volume as prognostic factor in chemoradiation for advanced head and neck cancer. *Head Neck*. 2011;33:375-82.
  147. Mücke T, Mitchell DA, Ritschl LM, Tannapfel A, Wolff KD, Kesting MR i sur. Influence of tumor volume on survival in patients with oral squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2015;141:1007-11.
  148. Jang JY, Kim MJ, Ryu G, Choi N, Ko YH, Jeong HS. Prediction of lymph node metastasis by tumor dimension versus tumor biological properties in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Res Treat*. 2016; 2016;48:54-62.
  149. Arain AA, Rajput MSA, Ansari SA, Mahmood Z, Ahmad AN, Dogar MR i sur. Occult Nodal Metastasis in Oral Cavity Cancers. *Cureus*. 2020;12:e11640.
  150. Leemans CR, Tiwari R, Nauta JJ, van der Waal I, Snow GB. Regional lymph node involvement and its significance in the development of distant metastases in head and neck carcinoma. *Cancer*. 1993;71:452-6.
  151. Choi KY, Park SC, Kim JH, Lee DJ. The occult nodal metastasis rate of early tongue cancer (T1-T2): A protocol for a systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2021;100:e24327.
  152. Myers JN, Greenberg JS, Mo V, Roberts D. Extracapsular spread. A significant predictor of treatment failure in patients with squamous cell carcinoma of the tongue. *Cancer* 2001;92:3030-6.
  153. Broders AC. Squamous cell cancer of the lip: a study of five hundred and thirty-seven cases. *JAMA*. 1920; 74: 656-64.

154. 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.
155. Arora A, Husain N, Bansal A, Neyaz A, Jaiswal R, Jain K i sur. Development of a New Outcome Prediction Model in Early-stage Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity Based on Histopathologic Parameters With Multivariate Analysis: The Aditi-Nuzhat Lymph-node Prediction Score (ANLPS) System. *Am J Surg Pathol.* 2017;41:950-960.
156. Almangush A, Mäkitie AA, Triantafyllou A, de Bree R, Strojan P, Rinaldo A i sur. Staging and grading of oral squamous cell carcinoma: An update. *Oral Oncol.* 2020;107:104799.
157. Sparano A, Weinstein G, Chalian A, Yodul M, Weber R. Multivariate predictors of occult neck metastasis in early oral tongue cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004;131:472-6.
158. Frunza A, Slavescu D, Lascar I. Perineural invasion in head and neck cancers - a review. *J Med Life.* 2014;7:121-3.
159. Binmadi NO, Basile JR. Perineural invasion in oral squamous cell carcinoma: a discussion of significance and review of the literature. *Oral Oncol.* 2011;47:1005-10.
160. 159. Haddad RI, Shin DM. Recent advances in head and neck cancer. *N Engl J Med.* 2008 11;359:1143-54.
161. Matsushita Y, Yanamoto S, Takahashi H, Yamada S, Naruse T, Sakamoto Y i sur. A clinicopathological study of perineural invasion and vascular invasion in oral tongue squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2015;44:543-8.
162. Chatzistefanou I, Lubek J, Markou K, Ord RA. 2014. The role of neck dissection and postoperative adjuvant radiotherapy in cN0 patients with PNI-positive squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oral Oncol.* 2014;50:753–8.
163. Chinn SB, Spector ME, Bellile EL, McHugh JB, Gernon TJ, Bradford CR i sur. 2013. Impact of perineural invasion in the pathologically N0 neck in oral cavity squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2013;149:893–9.
164. Jardim JF, Francisco AL, Gondak R, Damascena A, Kowalski LP. Prognostic impact of perineural invasion and lymphovascular invasion in advanced stage oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2015;44:23-8.
165. Chen TC, Wang CP, Ko JY, Yang TL, Hsu CW, Yeh KA i sur. The impact of perineural invasion and/or lymphovascular invasion on the survival of early-stage oral squamous cell carcinoma patients. *Ann Surg Oncol.* 2013;20:2388-95.

166. Saidak Z, Lailler C, Clatot F, Galmiche A. Perineural invasion in head and neck squamous cell carcinoma: background, mechanisms, and prognostic implications. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2020;28:90-95.
167. Huang S, Zhu Y, Cai H, Zhang Y, Hou J. Impact of lymphovascular invasion in oral squamous cell carcinoma: A meta-analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2021;131:319-28.
168. Miyahara M, Tanuma J, Sugihara K, Semba I. Tumor lymphangiogenesis correlates with lymph node metastasis and clinicopathologic parameters in oral squamous cell carcinoma. *Cancer.* 2007;110:1287-94.
169. Shieh YS, Lee HS, Shiah SG, Chu YW, Wu CW, Chang LC. Role of angiogenic and non-angiogenic mechanisms in oral squamous cell carcinoma: correlation with histologic differentiation and tumor progression. *J Oral Pathol Med.* 2004;33:601-6.
170. Pazouki S, Chisholm DM, Adi MM, Carmichael G, Farquharson M, Ogden GR i sur. The association between tumour progression and vascularity in the oral mucosa. *J Pathol.* 1997;183:39-43.
171. Hannen EJ, Van Der Laak JA, Manni JJ, Freihofer HP, Slootweg PJ, Koole R i sur. Computer assisted analysis of the microvasculature in metastasised and nonmetastasised squamous cell carcinoma of the tongue. *Head Neck.* 2002;24:643-50.
172. Lopez-Graniel CM, Tamez de Leon D, Meneses-Garcia A, Gómez-Ruiz C, Frias-Mendivil M, Granados-García M i sur. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in oral cavity carcinomas. *J Exp Clin Cancer Res.* 2001;20:463-8.
173. Ascani G, Balercia P, Messi M, Lupi L, Goteri G, Filosa A i sur. Angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2005;25:13-7.
174. Gleich LL, Biddinger PW, Duperier FD, Gluckman JL. Tumor angiogenesis as a prognostic indicator in T2-T4 oral cavity squamous cell carcinoma: a clinical-pathologic correlation. *Head Neck.* 1997;19:276-80.
175. Gleich LL, Biddinger PW, Pavelic ZP, Gluckman JL. Tumor angiogenesis in T1 oral cavity squamous cell carcinoma: role in predicting tumor aggressiveness. *Head Neck.* 1996;18:343-6.
176. Leedy DA, Trune DR, Kronz JD, Weidner N, Cohen JI. Tumor angiogenesis, the p53 antigen, and cervical metastasis in squamous carcinoma of the tongue. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1994;111:417-22.
177. Benevenuto TG, Nonaka CF, Pinto LP, de Souza LB. Immunohistochemical comparative analysis of cell proliferation and angiogenic index in squamous cell



- carcinomas of the tongue between young and older patients. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2012;20:291-7.
178. Matos LL, Trufelli DC, de Matos MG, da Silva Pinhal MA. Immunohistochemistry as an important tool in biomarkers detection and clinical practice. *Biomark Insights*. 2010;5:9-20.
  179. Oliveira LR, Ribeiro-Silva A. Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2011;40:298-307.
  180. Schliephake H. Prognostic relevance of molecular markers of oral cancer--a review. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2003;32:233-45.
  181. Takkem A, Barakat C, Zakaraia S, Zaid K, Najmeh J, Ayoub M i sur. Ki-67 Prognostic Value in Different Histological Grades of Oral Epithelial Dysplasia and Oral Squamous Cell Carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2018;19:3279-86.
  182. Rivera C, Venegas B. Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma. *Oncol Lett*. 2014;8:7-11.
  183. Smith BD, Haffty BG. Molecular markers as prognostic factors for local recurrence and radioresistance in head and neck squamous cell carcinoma. *Radiat Oncol Invest*. 1999;7:125-44.
  184. Salesiotis AN, Cullen KJ. Molecular markers predictive of response and prognosis in the patient with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. Evolution of a model beyond TNM staging. *Curr Opin Oncol*. 2000;12:229-39.
  185. Quon H, Liu FF, Cummings BJ. Potential molecular prognostic markers in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck*. 2001;23:147-59.
  186. Shah NG, Trivedi TI, Tankshali RA, Goswami JV, Jetly DH, Shukla SN i sur. Prognostic significance of molecular markers in oral squamous cell carcinoma: a multivariate analysis. *Head Neck*. 2009;31:1544-56.
  187. Ang KK, Berkey BA, Tu X, Zhang HZ, Katz R, Hammond EH i sur. Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res*. 2002;62:7350-6.
  188. Hartmann S, Seher A, Brands RC, Linz C, Lessner G, Böhm H i sur. Influence of epidermal growth factor receptor expression on the cetuximab and panitumumab response rates of head and neck carcinoma cells. *J Craniomaxillofac Surg*. 2014;42:1322-8.

189. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Cohen RB, Jones CU, Sur RK i sur. Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer. 5-year survival data from a phase 3 randomised trial and relation between cetuximab-induced rash and survival. *Lancet Oncol.* 2010;11:21-8.
190. Specenier P, Vermorken JB. Cetuximab: its unique place in head and neck cancer treatment. *Biologics.* 2013;7:77-90.
191. Hall JM, Hooper JE, Finger TE. Expression of sonic hedgehog, patched, and Gli1 in developing taste papillae of the mouse. *Comp Neurol.* 1999;406:143-55.
192. Jaskoll T, Leo T, Witcher D, Ormestad D, Astorga J, Bringas P Jr. i sur. Sonic hedgehog signaling plays an essential role during embryonic salivary gland epithelial branching morphogenesis. *Dev Dyn.* 2004;229:722-32.
193. Gritli-Linde A, Bei M, Maas R, Zhang XM, Linde A, McMahon AP. Shh signaling within the dental epithelium is necessary for cell proliferation, growth and polarization. *Development.* 2002;129:5323-37.
194. Merchant J.L. Hedgehog signalling in gut development, physiology and cancer. *J Physiol.* 2012;590:421–32.
195. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009;119:1420-8.
196. Prince ME, Ailles LE. Cancer stem cells in head and neck squamous cell cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26:2871-5.
197. Pectasides E, Rampias T, Sasaki C, Perisanidis C, Kouloulias V, Burtness B i sur. Markers of epithelial to mesenchymal transition in association with survival in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *PLoS One.* 2014;9:e94273.
198. Nusslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature.* 1980;287:795–801.
199. Cohen MM Jr. The hedgehog signaling network. *Am J Med Genet A.* 2003;123:5-28.
200. Ruiz i Altaba A, Sánchez P, Dahmane N. Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:361-72.
201. Merchant JL. Hedgehog signalling in gut development, physiology and cancer. *J Physiol.* 2012;590:421-32.
202. Han Y, Shi Q, Jiang J. Multisite interaction with Sufu regulates Ci/Gli activity through distinct mechanisms in Hh signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112:6383-8.

203. Wu F, Zhang Y, Sun B, McMahon AP, Wang Y. Hedgehog Signaling: From Basic Biology to Cancer Therapy. *Cell Chem Biol.* 2017;24:252-280.
204. Pasca di Magliano M, Hebrok M. Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. *Nat Rev Cancer.* 2003;3:903-11
205. Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulos PG, Gailani MR, Shanley S, Chidambaram A i sur. Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell.* 1996;85:841-51
206. Gailani MR, Bale AE. Developmental genes and cancer: role of patched in basal cell carcinoma of the skin. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89:1103-9.
207. Wang YF, Chang CJ, Lin CP, Chang SY, Chu PY, Tai SK i sur. Expression of hedgehog signaling molecules as a prognostic indicator of oral squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2012;34:1556-61.
208. Mori Y, Okumura T, Tsunoda S, Sakai Y, Shimada Y. Gli-1 expression is associated with lymph node metastasis and tumor progression in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology.* 2006;70:378-89.
209. Sims-Mourtada J, Izzo JG, Apisarnthanarax S, Wu TT, Malhotra U, Luthra R i sur. Hedgehog: an attribute to tumor regrowth after chemoradiotherapy and a target to improve radiation response. *Clin Cancer Res.* 2006;12:6565-72.
210. Schneider S, Thurnher D, Kloimstein P, Leitner V, Petzelbauer P, Pammer J i sur. Expression of the Sonic hedgehog pathway in squamous cell carcinoma of the skin and the mucosa of the head and neck. *Head Neck.* 2011;33:244-50.
211. Richtig G, Aigelsreiter AM, Asslaber M, Weiland T, Pichler M, Eberhard K i sur. Hedgehog pathway proteins SMO and GLI expression as prognostic markers in head and neck squamous cell carcinoma. *Histopathology.* 2019;75:118-27.
212. Valverde Lde F, Pereira Tde A, Dias RB, Guimarães VS, Ramos EA, Santos JN i sur. Macrophages and endothelial cells orchestrate tumor-associated angiogenesis in oral cancer via hedgehog pathway activation. *Tumour Biol.* 2016;37:9233-41.
213. Obeid E, Nanda R, Fu YX, Olopade OI. The role of tumor-associated macrophages in breast cancer progression (review). *Int J Oncol.* 2013;43:5-12.
214. Pedersen MB, Danielsen AV, Hamilton-Dutoit SJ, Bendix K, Nørgaard P, Møller MB i sur. High intratumoral macrophage content is an adverse prognostic feature in anaplastic large cell lymphoma. *Histopathology.* 2014;65:490-500.

215. Leovic D, Sabol M, Ozretic P, Musani V, Car D, Marjanovic K i sur. Hh-Gli signaling pathway activity in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2012;34:104-12.
216. Dias RB, Valverde Lde F, Sales CB, Guimarães VS, Cabral MG, de Aquino Xavier FC i sur. Enhanced Expression of Hedgehog Pathway Proteins in Oral Epithelial Dysplasia. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2016;24:595-602.
217. Guimaraes VSN, Vidal MTA, de Faro Valverde L, de Oliveira MG, de Oliveira Siquara da Rocha L, Coelho PLC i sur. Hedgehog pathway activation in oral squamous cell carcinoma: cancer-associated fibroblasts exhibit nuclear GLI-1 localization. *J Mol Histol*. 2020;51:675-84.
218. Dourado MR, Korvala J, Åström P, De Oliveira CE, Cervigne NK, Mofatto LS i sur. Extracellular vesicles derived from cancer-associated fibroblasts induce the migration and invasion of oral squamous cell carcinoma. *J Extracell Vesicles*. 2019;8:1578525.
219. Yan M, Wang L, Zuo H, Zhang Z, Chen W, Mao L, Zhang P. HH/GLI signalling as a new therapeutic target for patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2011;47:504-9.
220. Girardi D, Barrichello A, Fernandes G, Pereira A. Targeting the Hedgehog Pathway in Cancer: Current Evidence and Future Perspectives. *Cells*. 2019;8:153.
221. Frampton JE, Basset-Séguin N. Vismodegib: A Review in Advanced Basal Cell Carcinoma. *Drugs*. 2018;78:1145-56.
222. Cierpikowski P, Lis-Nawara A, Bar J. Sonic Hedgehog is a novel prognostic biomarker in patients with oral squamous cell carcinoma. *Neoplasma*. 2021;68:867-874.
223. Berneir J, Domenge C, Ozsahin M, Matuszewska K, Lefèbvre JL, Greiner RH i sur. European organization for research and treatment of cancer trial 22931. Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med*. 2004;350:1945–52.
224. Cadoni G, Giraldi L, Petrelli L, Pandolfini M, Giuliani M, Paludetti G i sur. Prognostic factors in head and neck cancer: a 10-year retrospective analysis in a single-institution in Italy. *Acta Otorhinolaryngol Ital*. 2017;37:458-66.
225. Sanabria A, Carvalho AL, Vartanian JG, Magrin J, Ikeda MK, Kowalski LP. Comorbidity is a prognostic factor in elderly patients with head and neck cancer. *Ann Surg Oncol*. 2007;14:1449-57.

226. Stromberger C, Yedikat B, Coordes A, Tinhofer I, Kalinauskaite G, Budach V i sur. Prognostic Factors Predict Oncological Outcome in Older Patients With Head and Neck Cancer Undergoing Chemoradiation Treatment. *Front Oncol.* 2021;10:566318.
227. Luryi AL, Chen MM, Mehra S, Roman SA, Sosa JA, Judson BL. Treatment factors associated with survival in early-stage oral cavity cancer: Analysis of 6830 cases from the National Cancer Data Base. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.* 2015;141:593-8.
228. Luryi AL, Chen MM, Mehra S, Roman SA, Sosa JA, Judson BL. Positive surgical margins in early stage oral cavity cancer: an analysis of 20,602 cases. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2014;151:984-90.
229. de Almeida JR, Genden EM. Robotic surgery for oropharynx cancer: promise, challenges, and future directions. *Curr Oncol Rep.* 2012;14:148–57.
230. Hartl DM, Ferlito A, Silver CE, Takes RP, Stoeckli SJ, Suárez C i sur. Minimally invasive techniques for head and neck malignancies: current indications, outcomes and future directions. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2011;268:1249–57.
231. Huang CJ, Chao KS, Tsai J, Simpson JR, Haughey B, Spector GJ i sur. Cancer of retromolar trigone: long-term radiation therapy outcome. *Head Neck.* 2001;23:758–63.
232. Dijkstra PU, Kalk WW, Roodenburg JL. Trismus in head and neck oncology: a systematic review. *Oral Oncol.* 2004;40:879-89.
233. Hooley R, Levin H, Flores TC, Wheeler T, Steigeo E: Predicting Postoperative Head and Neck Complications Using Nutritional Assessment. *Arch Otolaryngol* 1983;109:83-5.
234. Sobin LH, Wittekind Ch, ur. *TNM classification of malignant tumors.* 6. izd. New York: Wiley-Liss, 2002.
235. Luksic I, Suton P. Predictive markers for delayed lymph node metastases and survival in early-stage oral squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2017;39:694-701.
236. Malik A, Mishra A, Garg A, Shetty R, Mair M, Chakrabarti S i sur. Trends of oral cancer with regard to age, gender, and subsite over 16 years at a tertiary cancer center in India. *Indian J Med Paediatr Oncol.* 2018;39:297-300.
237. Geum DH, Roh YC, Yoon SY, Kim HG, Lee JH, Song JM i sur. The impact factors on 5-year survival rate in patients operated with oral cancer. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg.* 2013;39:207-16.

238. Liu CH, Chen HJ, Wang PC, Chen HS, Chang YL. Patterns of recurrence and second primary tumors in oral squamous cell carcinoma treated with surgery alone. *Kaohsiung J Med Sci.* 2013;29:554-9.
239. Mamic M, Lucijanic M, Manojlovic L, Muller D, Suton P, Luksic I. Prognostic significance of extranodal extension in oral cavity squamous cell carcinoma with occult neck metastases. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2021;50:309-15.
240. Yang Z, Cui Y, Ni W, Kim S, Xuan Y. Gli1, a potential regulator of esophageal cancer stem cell, is identified as an independent adverse prognostic factor in esophageal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2017;143:243-54.
241. Riquelme I, Roa JC. Activated status of Hedgehog pathway in oral squamous cell carcinoma (OSCC): the door is still open. *Transl Cancer Res.* 2016; 5:14-16.
242. Cavicchioli Buim ME, Gurgel CA, Gonçalves Ramos EA, Lourenço SV, Soares FA. Activation of sonic hedgehog signaling in oral squamous cell carcinomas: a preliminary study. *Hum Pathol.* 2011;42:1484-90.

## 11. ŽIVOTOPIS

Sandra Baranović, dr.med., rođena je 7. listopada 1984. godine u Zagrebu. Osnovnu školu i XV. gimnaziju završila je u Zagrebu. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2003. godine te diplomirala 2009. godine. Pripravnički staž odradila je u KBC Sestre milosrdnice 2010.-2011. godine. Od 2011. do 2014. godine radila je u hitnoj medicinskoj pomoći Bjelovarsko-bilogorske županije, u ispostavi Bjelovar, tijekom čega je položila ALS (Advanced Life Support) i ETC (European Trauma Course). 2014.-2020. godine specijalizirala je Otorinolaringologiju u KBC Sestre milosrdnice, te nakon položenog specijalističkog ispita, nastavlja sa radom na Odjelu kirurgije glave i vrata u Klinici za tumore. Primarno područje interesa su joj tumori glave i vrata, kirurgija štitnjače i doštitnih žlijezda, kožni tumori te žlijezde slinovnice. Kirurški interes i napredak nadopunjuje edukacijom i radom u području rekonstruktivne i mikrovaskularne kirurgije. Od 2019. godine je Nacionalni predstavnik EYSAC-a (ESSO Young Surgeons Alumni Club). Od 2020. godine suradnik je u nastavi predmeta „Temelji liječničkog umijeća“ Medicinskog fakulteta. 2021. godine počinje subspecijalizaciju iz Plastične kirurgije glave i vrata. Članica je Hrvatskog društva za otorinolaringologiju i kirurgiju glave i vrata i EAFPS-a (European Academy of Facial Plastic Surgery).