



Središnja medicinska knjižnica

Dediol, Emil (2013) *Učestalost visokorizičnih tipova humanoga papiloma virusa u karcinomima usne šupljine u bolesnika bez rizičnih čimbenika*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

<http://medlib.mef.hr/1886>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Emil Dediol

**Učestalost visokorizičnih tipova
humanoga papiloma virusa u
karcinomima usne šupljine u
bolesnika bez rizičnih čimbenika**

DISERTACIJA



Zagreb, 2013.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Emil Dediol

**Učestalost visokorizičnih tipova
humanoga papiloma virusa u
karcinomima usne šupljine u
bolesnika bez rizičnih čimbenika**

DISERTACIJA

Zagreb, 2013.

Disertacija je izrađena na Klinici za kirurgiju lica, čeljusti i usta te Zavodu za patologiju Kliničke bolnice Dubrava.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Spomenka Manojlović

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Spomenki Manojlović na stručnom vodstvu prilikom ovog istraživanja.

Hvala dr. sc. Danku Mülleru i osoblju Zavoda za patologiju Kliničke bolnice Dubrava za pomoć prilikom prikupljanja materijala za istraživanje.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Slavku Gašparovu i doc. dr. sc. Aniti Škrtić za pomoć prilikom izrade parafinskih kocki TMA tehnikom.

Veliko hvala dr. sc. Magdaleni Grce i njenom suradniku dr. sc. Ivanu Sabolu sa Zavoda za molekularnu medicinu Instituta „Ruđer Bošković“ za obradu materijala PCR metodom te na korisnim savjetima i stručnoj pomoći u izradi ove disertacije.

Hvala dugogodišnjem kliničkom mentoru prof. dr. sc. Miši Viragu na ideji za istraživanje i konstruktivnim kritikama prilikom izrade rada.

Zahvaljujem svojoj obitelji i roditeljima na podršci te im posvećujem ovaj rad.

POPIS KRATICA

CDK4/6	ciklin ovisne kinaze 4/6, <i>engl. cyclin dependent kinases 4/6</i>
CI	raspon pouzdanosti, <i>engl. confidence interval</i>
DNA	deoksiribonukleinska kiselina, <i>engl. deoxyribonucleic acid</i>
DPT	drugi primarni tumor
ELISA	imunoenzimska metoda, <i>engl. enzyme-linked immunosorbent assay</i>
HPV	humani papiloma virus
HR	omjer rizika, <i>engl. hazard ratio</i>
ISH	in situ hibridizacija, <i>engl. in situ hybridisation</i>
LCR	duga kontrolna regija, <i>engl. long control region</i>
N	regionalna metastaza
Nr	regionalni recidiv
NSND	bolesnici koji ne puše i ne konzumiraju alkohol, <i>engl. non smoker non drinker</i>
M	udaljena metastaza
OR	omjer vjerojatnosti, <i>engl. odds ratio</i>
Pb	parovi baza
PCR	metoda reakcije lančanom polimerazom, <i>engl. polymerase chain reaction</i>
SD	bolesnici koji puše i konzumiraju alkohol, <i>engl. smoker drinker</i>
SPT	drugi primarni tumor, <i>engl. second primary tumour</i>
T	primarni tumor
TMA	metoda tkivne mikropostrojbe, <i>engl. tissue microarray</i>
Tr	lokalni recidiv

SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
1.1	Maligni tumori glave i vrata.....	1
1.2	Karcinom usne šupljine.....	1
1.2.1	Anatomija usne šupljine.....	1
1.2.2	Epidemiologija karcinoma usne šupljine.....	3
1.2.3	Etiologija karcinoma usne šupljine.....	4
1.2.4	Premaligne lezije i stanja s povećanim rizikom nastanka karcinoma usne šupljine.....	7
1.2.5	TNM klasifikacija karcinoma usne šupljine.....	9
1.2.6	Klinička prezentacija karcinoma usne šupljine.....	10
1.2.7	Liječenje karcinoma usne šupljine.....	14
1.2.7.1	Radioterapija.....	15
1.2.7.2	Kemoterapija.....	15
1.2.8	Prognoza i preživljenje.....	16
1.3	Humani papiloma virus (HPV).....	16
1.3.1	HPV i molekularni mehanizam karcinogeneze.....	16
1.3.2	HPV i karcinom cerviksa.....	19
1.3.3	HPV i tumori glave i vrata.....	20
1.3.4	HPV i karcinom usne šupljine.....	22
1.3.5	Metode dokazivanja HPV-a kod tumora glave i vrata.....	25
1.3.5.1	Direktno dokazivanje HPV-a.....	25
1.3.5.2	Indirektno dokazivanje HPV-a.....	26
1.4	HPV i karcinom usne šupljine kod nerizične populacije.....	29
2.	HIPOTEZA.....	37

3.	CILJEVI RADA.....	38
4.	ISPITANICI I METODE.....	39
4.1	Ispitanici.....	39
4.2	Metode.....	40
4.2.1	p16INK4a imunohistokemijsko ispitivanje.....	40
4.2.2	Izolacija DNA.....	42
4.2.3	Detekcija i tipizacija papiloma virusa čovjeka.....	43
4.2.4	Statističke metode.....	45
5.	REZULTATI.....	46
5.1	Rezultati ovisno o rizičnim navikama.....	47
5.2	Rezultati ovisno o HPV PCR statusu.....	58
5.3	Rezultati ovisno o p16INK4a ekspresiji.....	66
6.	RASPRAVA.....	77
6.1	Demografske karakteristike ispitanika i kontrolne skupine.....	77
6.2	Anatomske lokalizacije tumora u usnoj šupljini i biološko ponašanje tumora.....	79
6.3	HPV PCR status.....	83
6.4	p16INK4a status.....	91
7.	ZAKLJUČCI.....	98
8.	SAŽETAK.....	101
9.	SUMMARY.....	104
10.	POPIS LITERATURE.....	107
11.	ŽIVOTOPIS.....	126

1. UVOD

1.1 Maligni tumori glave i vrata

Kada govorimo o tumorima glave i vrata prema Međunarodnoj klasifikaciji bolesti odnosno tumora (ICD-10), govorimo o heterogenoj skupini tumora koji zahvaćaju kožu glave i vrata (C43, C44), usnice, usnu šupljinu, orofarinks, epi- i hipofarinks, žlijezde slinovnice (C0 - C14), larinks, paranazalne sinuse (C30 - C32) te štitnjaču i paratireoidne žlijezde (C73, C75.0).¹ U užem smislu, pod karcinomom glave i vrata (u engleskoj literaturi *head & neck cancer*), mislimo histološki na planocelularni karcinom koji se razvija iz višeslojnog pločastog epitela sluznice gornjeg aerodigestivnog trakta, odnosno usne šupljine, cijelog farinksa i larinksa te će se dalje u tekstu pod tim pojmom misliti na tumore koji se razvijaju na maloprije spomenutim lokalizacijama.

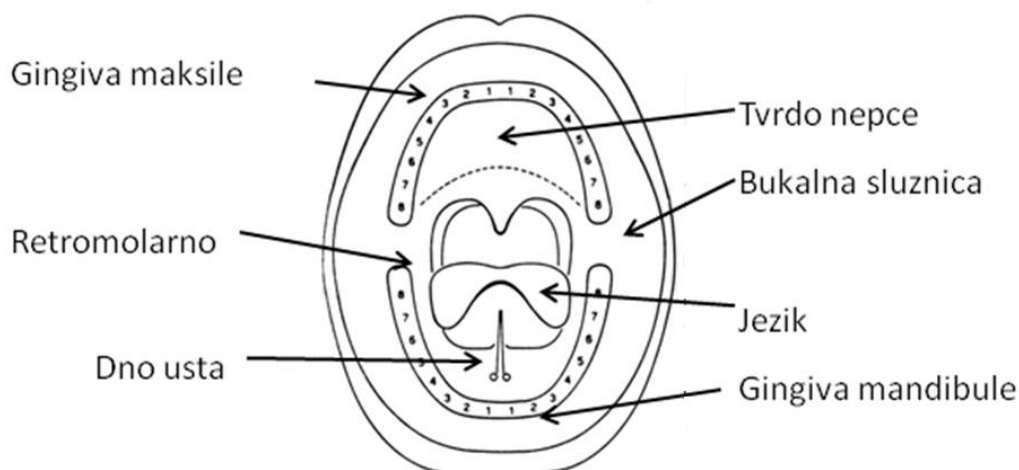
U okviru maksilofacijalne kirurgije rijetko se operiraju tumori štitne žlijezde, paratireoidnih žlijezda i larinksa dok je među najčešćim tumorima kojima se svakodnevno bavimo karcinom usne šupljine i on će biti predmet ovog istraživanja.

Karcinom glave i vrata čini samo 6% svih zloćudnih tumora i prema tome nije među češćim tumorima barem ne u SAD-u i Europi. U nekim drugim dijelovima svijeta poput Indije, Pakistana, Bangladeša, karcinom glave i vrata je među najzastupljenijim zloćudnim oboljenjima.

1.2 Karcinom usne šupljine

1.2.1 Anatomija usne šupljine

Usna šupljina anatomski obuhvaća područje od granice vermilion usana pa sve do prednjih nepčanih lukova, odnosno granice tvrdog i mekog nepca gore i dolje na jeziku, papila circumvalata. Sastoji se od više podjedinica: usnica, obraznih sluznica, jezika do papila circumvalata, sublingvalnog područja, retromolarnog područja, tvrdog nepca, gingiva maksile i mandibule (Slika 1).



Slika 1. Anatomski prikaz usne šupljine

Usnice počinju na spoju vermiliona i kože i čine prednju granicu vestibuluma usta. Dio usnica koji pripada usnoj šupljini je vermilion odnosno dio usnice koji dolazi u kontakt sa suprotnom usnom.

Bukalna sluznica uključuje sluzničku površinu obraza, prema naprijed do granice s usnama, a straga do pterigomandibularne rafe. Prema gore odnosno dolje dopire do alveolarnog grebena maksile odnosno mandibule. Mišić bukcinator čini lateralni zid vestibuluma usta.

Alveolarni greben uključuje alveolarni nastavak maksile odnosno mandibule s nadležecom sluznicom. Alveolarni greben mandibule se proteže od jednog do drugog uzlaznog kraka mandibule odnosno od bukalnog sulkusa do dna usta u anteroposteriornom smjeru. Alveolarni greben maksile se proteže od jednog do drugog prednjeg nepčanog luka odnosno od bukalnog sulkusa do tvrdog nepca anteroposteriorno.

Dno usta je područje sluznice u obliku srpa koje se pruža od alveolarnog grebena mandibule do ventralne strane jezika. Ispod sluznice dna usta su milohoidni mišić i hioglossus. Frenulum jezika dijeli dno usta na lijevu i desnu polovicu, a sa svake strane frenuluma su karunkule na kojima se otvaraju duktusi submandibularnih žlijezda. Između sluznice dna usta i milohoidnog mišića nalaze se Warthonov duktus, sublingvalna žlijezda s izvodnim kanalom i n. lingualis.

Dio jezika, koji pripada usnoj šupljini, su prednje 2/3 jezika ispred papila circumvalata. Baza jezika, koja se nalazi iza papila, pripada orofarinksu. Oralni jezik se sastoji od vrška, lateralnog ruba te dorzalne i ventralne površine. Jezik čini šest uparenih mišića, tri ekstrinzična (genioglossus, hyoglossus, styloglossus) koja miču jezik i tri intrinzična (lingualis, verticalis, transversus linguae) koja mijenjaju oblik jezika.

Retromolarni prostor je trokutasto područje sluznice koja prekriva uzlazni krak mandibule. Baza tog trokuta je iza zadnjeg molara, a vršak trokuta završava na tuberu maksile. Lateralna stranica tog imaginarnog trokuta je u dodiru s bukalnom sluznicom, a medijalna stranica s prednjim nepčanim lukom.

Tvrdo nepce zahvaća primarno nepce, nastalo spajanjem nepčanih nastavaka maksile, i sekundarno nepce, nastalo spajanjem horizontalnih nastavaka nepčanih kostiju. Spijeda se pruža do unutrašnjeg dijela alveolarnog grebena maksile, a straga dolazi do stražnjeg ruba palatinalne kosti odnosno do spoja s mekim nepcem koje pripada orofarinksu.

1.2.2 Epidemiologija karcinoma usne šupljine

Točni podaci za Hrvatsku nisu poznati, ali su vrlo dobro poznati i točni epidemiološki podaci o karcinomu usne šupljine za SAD iz National Cancer Institute (SEER Database).² Karcinom usne šupljine se javlja češće kod muškaraca nego kod žena. Omjer je 2,3:1. Srednja dob u kojoj se javlja je 62. godina života, a u 70% svih slučajeva se javlja od 45. do 75. godine života. Prema zadnjim podacima stopa incidencije javljanja karcinoma usne šupljine u SAD-u je 10 na 100000 stanovnika (15,4 kod muškaraca, 6,1 kod žena). Kod muškaraca je to po incidenciji osmi najčešći zloćudni tumor, dok kod žena nije među prvih deset najčešćih maligniteta. Stopa mortaliteta od karcinoma usne šupljine za žene i muškarce zajedno je 2,5 na 100000. Prema podacima Američkog udruženja za rak (engl. *American Cancer Society*)³, procijenjeno je da će se u SAD-u u 2012. godini pojaviti 40250 novih slučajeva karcinoma usne šupljine, od toga dvostruko više kod muškaraca nego kod žena. Zanimljivo je da stopa incidencije pada od 2004. do 2008. godine, kod žena za 1% godišnje dok je kod muškaraca na istoj razini. Isto tako procjenjuje se da će u 2012. godini 7850 oboljelih umrijeti od karcinoma usne šupljine. Stopa smrtnosti također

pada od 2004. do 2008 godine. Iznosi 1,2% godišnje kod muškaraca te 2,2% godišnje kod žena.

Epidemiološki podaci se znatno zemljopisno razlikuju. Tako je, prema nedavno objavljenoj studiji, karcinom usne šupljine zajedno s karcinomom ždrijela među muškom populacijom u Indiji najčešći karcinom po učestalosti (čini 22,9% svih tumora) dok je kod žena na trećem mjestu.⁴ Visoka stopa incidencije karcinoma usne šupljine osim u jugoistočnoj Aziji javlja se i u Brazilu. Prema podacima Nacionalnog instituta za rak među muškarcima stopa incidencije je 10,64 na 100000, a među ženama dosta niža 3,76.⁵ U Europi najveću stopu incidencije karcinoma usne šupljine ima Francuska te zemlje centralne i istočne Europe (Mađarska, Slovačka).

1.2.3 Etiologija karcinoma usne šupljine

Karcinom usne šupljine javlja se u daleko većem postotku kod muškaraca jer je usko vezan uz konzumaciju alkohola i pušenje, navike koje su kod muškaraca puno češće nego kod žena. U zapadnom svijetu već zadnjih 20-30 godina postoji trend smanjenja pušenja cigareta i konzumacije alkohola. Sukladno tome je i trend incidencije karcinoma usne šupljine u blagom padu, ali ne toliko koliko bi se očekivalo. Isto tako, omjer muškaraca i žena se smanjuje s obzirom da muškarci sve više napuštaju rizične navike za razliku od žena koje su proporcionalno više počele pušiti cigarete i konzumirati alkohol.

Pušenje cigareta je neovisni rizični čimbenik za nastanak karcinoma usne šupljine.⁶ Više od 300 karcinogena, koji oštećuju DNA, je identificirano u dimu cigareta. Većina tih karcinogena, poput policikličkih benzopirena i nitrozoamina, je topivo u vodi odnosno slini te djeluje lokalno na sluznicu gornjeg aerodigestivnog trakta. Karcinogeni uzrokuju mutaciju gena p53. Ta je mutacija češća kod pušača nego kod nepušača s karcinomom usne šupljine te je to vjerojatno molekularni mehanizam karcinogeneze.⁷ Rizik za nastanak karcinoma usne šupljine je 6-8 puta veći kod pušača nego kod nepušača.⁸ Promjene na sluznici usne šupljine uzrokovane pušenjem cigareta su reverzibilne. Tako se s prestankom pušenja smanjuje rizik za nastanak karcinoma usne šupljine. Ukoliko je prošlo više od 10 godina rizik se smanjuje za 50%. Nakon 17 godina rizik za nastanak karcinoma usne šupljine gotovo je jednak onome nepušača.⁹ Žvakanje duhana, njegovo držanje u ustima između

bukalne sluznice i zubiju, isto tako može dovesti do nastanka karcinoma upravo na bukalnoj sluznici.¹⁰ Ono je rašireno diljem svijeta; u nekim dijelovima SAD-a te zapadne Europe gdje je pušenje zabranjeno na javnim mjestima, pa se umjesto toga žvače duhan, ali i u jugoistočnoj Aziji gdje se žvače duhan sam ili s betelom, ili areka oraščićem.¹¹

Alkohol je poznati karcinogen dokazan u mnogim studijama.¹² Nije točno poznat mehanizam karcinogeneze, ali se vjeruje da alkohol djeluje lokalno na epitelne stanice čineći ih manje otpornima i time permeabilnijima za utjecaj drugih karcinogena. Prema drugom istraživanju, alkohol smanjuje protok sline te su na taj način epitelne stanice u usnoj šupljini dulje izložene djelovanju samog alkohola, ali i drugih potencijalnih karcinogena.¹³ Drugi mehanizam je onaj u kojem ingestirani alkohol, odnosno njegovi metaboliti, resorpcijom u krv i otpuštanjem u slinu, ponovno dolaze u usnu šupljinu i tamo produženim kontaktom sa sluznicom uzrokuju karcinogena oštećenja.¹⁴ Alkohol je neovisni rizični čimbenik i rizik je oko šest puta veći za nastanak karcinoma usne šupljine, nego kod ljudi koji ne konzumiraju alkohol.¹⁵ Oko 90% bolesnika s karcinomom usne šupljine konzumira alkohol svakodnevno u većim količinama.

Alkohol i pušenje imaju sinergistički učinak, a ne kumulativni na karcinogenezu, što znači da je učinak oba čimbenika zajedno veći nego njihov zbroj. Tako bolesnici koji puše i piju imaju 15 puta veći rizik da razviju karcinom usne šupljine, nego oni koji nemaju te rizične čimbenike.¹⁶

Žvakanje betelovog oraščića je vrlo raširena i društveno prihvatljiva navika u jugoistočnoj Aziji (Indija, Pakistan, Bangladeš, Tajvan, Šri Lanka, Nepal) i u tom području predstavlja bitan etiološki čimbenik u nastanku karcinoma usne šupljine.¹⁷ U Indiji je zbog toga karcinom usne šupljine najčešći tumor kod muškaraca, a treći po učestalosti kod žena i čini ukupno 40% svih malignih oboljenja.¹⁸ Žvakanje čistog betelovog oraščića nosi i do 16 puta veći rizik za nastanak karcinoma gornjeg aerodigestivnog trakta.¹⁹ Često se nažalost ne žvače čisti betel, već mješavina betelovog lišća u koji su umotani areka oraščić, duhan, gašeno vapno i razni dodaci za okus (u engl. literaturi *bettel quid*) što ima dodatno izrazito karcinogeno djelovanje na usnu šupljinu i orofarinks. Areka oraščić, koji je u Indiji dostupan za žvakanje čak i u komercijalnim oblicima kao osvježivač daha pomiješan s raznim okusima i popularan

među mladmom populacijom, može dovesti do stvaranja submukozne fibroze, dakle premalignog stanja.²⁰

Uloga vodica za ispiranje usta koje sadrže alkohol u nastanku karcinoma usne šupljine je bila predmet rasprave zadnjih desetljeća. Prema nedavnoj meta analizi Gandini i suradnika²¹ nije nađena povezanost redovite upotrebe vodica i karcinoma usne šupljine pa čak i kod njihove pojačane upotrebe.

Prehrana i stanja povezana s manjkom pojedinih vitamina i elemenata se također dovode u vezu s karcinomom usne šupljine. Tako je poznato da je kod kronične sideropenične anemije u sklopu Plummer-Vinsonovog sindroma (disfagija, glositis i atrofija sluznice) češća incidencija karcinoma usne šupljine.²² Isto tako, prehrana bogata vitaminom C, ili povrćem, ili voćem može dovesti do smanjenog rizika za nastanak karcinoma usne šupljine.²³

Loša oralna higijena, koju u pravilu viđamo kod bolesnika s karcinomom usne šupljine, vjerojatno nije uzročni čimbenik iako prema nekim radovima oralna mikroflora može etanol razgraditi enzimatski u acetaldehid koji je poznat kao karcinogen.²⁴

Traumatski ulkusi na sluznici od nesaniranog zubala i od nošenja loše adaptiranih proteza, te samo dugotrajno nošenje proteza također ne predstavljaju neovisni rizični čimbenik.²⁵

Uloga nasljeđa nije još u potpunosti razjašnjena. Nije nađen specifičan gen koji bi bio odgovoran za nastanak karcinoma usne šupljine. Pozitivna obiteljska anamneza na karcinom usne šupljine nosi povećani rizik za nastanak karcinoma na način da su ti pojedinci očito osjetljiviji na djelovanje karcinogena u usnoj šupljini²⁶, što znači da će bez djelovanja poznatih etioloških čimbenika rizik ostati gotovo na razini ostale populacije.

1.2.4 Premaligne lezije i stanja s povećanim rizikom nastanka karcinoma usne šupljine

Pindborg navodi da je 1972. na sastanku istraživača skupa "Histološka definicija premalignih lezija", Svjetske zdravstvene organizacije, dogovoreno da se oralne premaligne lezije definiraju kao morfološki promijenjeno tkivo u kojem je veća šansa da se razvije karcinom nego na sluznici koja izgleda nepromijenjeno.²⁷ Na istom skupu su se premaligna stanja definirala kao generalizirana stanja povezana s povećanim rizikom za razvoj karcinoma. Leukoplakija i eritroplakija su premaligne lezije, a premaligna stanja su oralni lihen planus te submukozna fibroza.

Leukoplakija je definirana 1978. na skupu "Histološka definicija premalignih lezija", Svjetske zdravstvene organizacije, kao bijeli keratotički plak ili sloj koji se ne može drugačije definirati klinički ili histološki.²⁸ Od tada se definicija leukoplakije mijenjala nekoliko puta. Zadnja je važeća ona iz 2007. g. prema kojoj je leukoplakija bijeli plak upitnog rizika koji isključuje ostala poznata stanja i bolesti koja ne nose povećani rizik za razvoj karcinoma.²⁹ Klinička klasifikacija dijeli leukoplakiju na homogenu i nehomogenu. Homogena se dalje dijeli na ravnu, valovitu, naboranu i plavkastu. Nehomogena se dijeli na verukoznu, nodularnu, ulcerativnu i eritroleukoplakiju. Javlja se najčešće na bukalnoj sluznici, vermilionu usne, gingivi mandibule ili maksile. Maligniji potencijal ima ona koja se javlja na jeziku ili dnu usta. Godišnja stopa maligne transformacije je oko 1%, odnosno sveukupno oko 10-18% leukoplakija na kraju prijeđe u karcinom usne šupljine.^{30,31} Zanimljivo, Amagasa i suradnici³² su našli veću stopu maligne transformacije kod žena nego kod muškaraca (11,2% prema 6,2%). Rizični čimbenici za malignu transformaciju leukoplakije su ženski spol, dugo trajanje leukoplakije, leukoplakija kod nepušača, leukoplakija jezika i/ili dna usta, veličina (>200 mm²), nehomogeni tip, prisutnost epitelne displazije.²⁹ Svaka leukoplakija koja ima bar dva navedena rizična čimbenika trebala bi biti kirurški odstranjena i tako bi se mogućnost maligne transformacije svela na minimum.³²

Eritroplakija je definirana 1978. na skupu "Histološka definicija premalignih lezija", Svjetske zdravstvene organizacije, kao svijetlocrveni, baršunasti plak na sluznici koji se ne može drugačije definirati klinički ili histološki.²⁸ Definicija se također s godinama mijenjala te trenutno vrijedi ona iz 2010. g. koja eritroplakiju

definira kao predominantno crvenu leziju oralne sluznice, koja se ne može okarakterizirati kao neka druga poznata lezija.³³ Iako se javlja rjeđe nego leukoplakija, potencijal maligne transformacije je veći nego kod leukoplakije. Od 14% do 50% eritroplakija na kraju maligno prijeđe u karcinom.³⁴ Čak u trenutku biopsije velik dio eritroplakija sadrži ili tešku displaziju, ili karcinom in situ, ili početni površni invazivni karcinom. Najčešće se javlja kod muškaraca između 65. i 74. godine, pogotovo na dnu usta, jeziku ili mekom nepcu. S obzirom na tako visoku stopu maligne transformacije terapija je kirurška ekscizija.

Lihen planus je kronična dermatološka bolest sa čestom manifestacijom na sluznici usne šupljine pa tada govorimo o oralnom lihen planusu. Lihen je imunološki posredovan sistemski poremećaj. Točan razlog nastanka se ne zna. Optužuje se stres, hepatitis C infekcija, nasljeđe, ali ništa nije sa sigurnošću dokazano. Najčešće se javlja kod ženskih osoba srednje dobi i to na bukalnoj sluznici. Ostala mjesta u usnoj šupljini, na kojima se lihen češće razvija, su gingiva čeljusti te jezik i nepce. Klinički se razlikuju dva oblika lihena: retikularni i erozivni. Retikularni oblik je obično asimptomatski i prikazuje se bijelim linijama koje se međusobno isprepliću, obično na bukalnoj sluznici bilateralno. Liječenje ovog oblika lihena nije potrebno. Rjeđi oblik, koji je obično simptomatski, je erozivni lihen. Javlja se na bukalnoj sluznici ili gingivi te se klinički manifestira kao eritematozno atrofično područje sa centralnom ulceracijom. Na periferiji same lezije se nalaze bijele strije. Zbog sličnosti s displastičnim promjenama ili početnim karcinomom potrebno je inicijalno uzeti biopsiju da se isključi malignitet. Terapija je kortikosteroidima, sistemski u težim oblicima, ili lokalno u blažim. Sam lihen rijetko maligno alterira (češće erozivni oblik). Vjerojatno najviše do 1% bolesnika s oralnim lihenom na kraju razvije karcinom usne šupljine.³⁵

Submukozna fibroza je bolest nepoznate etiologije koju karakterizira fibroziranje i induracija submukoze odnosno vezivnog tkiva usne šupljine. Najčešće se javlja na bukalnoj sluznici, retromolarnom području, mekom nepcu. Generalizirana fibroza submukoze usne šupljine dovodi do otežanog otvaranja usta i pečenja u ustima. U ranoj fazi dolazi do blijedenja sluznice te izgleda poput mramora, a histološki se nalazi kronična infiltracija subepitelnog tkiva s upalnim stanicama. U kasnijoj fazi epitel postaje izrazito atrofičan, a po bukalnoj sluznici ili oko usta se stvaraju palpabilni tvrdi vezivni tračci. Biopsija uzeta u ovoj fazi često pokazuje

određen stupanj displazije. Submukozna fibroza ne regredira te nema poznatog lijeka. Česta je kod Indijaca i Pakistanaca zbog izrazito raširene navike žvakanja areka ili betelovog oraščića. Navodi se podatak da oboli 4 od 1000 ljudi. Od 2,3% do 7,6% slučajeva maligno prijeđe u karcinom usne šupljine.³⁶

1.2.5 TNM klasifikacija karcinoma usne šupljine

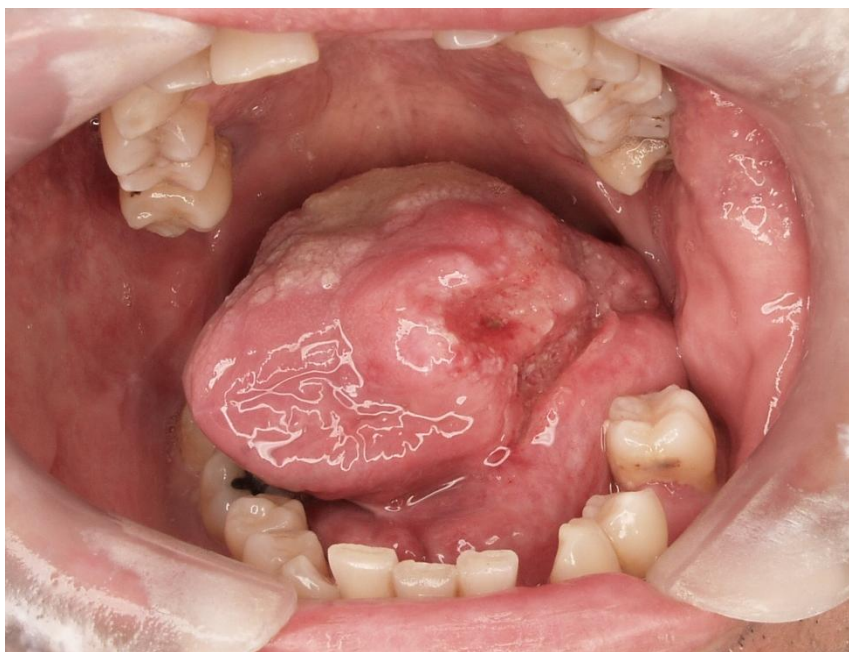
U klasifikaciji tumora se služimo TNM klasifikacijom kako bismo uniformno okarakterizirali tumore i svrstali ih u pojedine stadije. Tako T označava primarni tumor, N regionalnu metastazu, a M udaljenu metastazu. T može biti 0-4 ovisno o prisutnosti i veličini tumora, N 0-3 ovisno o prisutnosti regionalnih metastaza, a M ima samo dvije vrijednosti 0 i 1 ovisno ima li ili nema udaljenih metastaza. Trenutno vrijedi šesta zajednička klasifikacija UICC (*International Union Against Cancer*) i AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) za karcinom usne šupljine iz 2003. godine (Tablica 1).³⁷

Tablica 1. TNM klasifikacija karcinoma usne šupljine

T	Primarni tumor
T1	=<2 cm
T2	>2 do 4 cm
T3	>4 cm
T4a	zahvaćen kortikalis, vanjski mišići jezika, maksilarni sinus, koža
T4b	zahvaćen mastikatorni prostor, pterigoidni nastavci, baza lubanje oko karotis interne
N	Regionalne metastaze
N0	Nema
N1	Jedan homolateralni čvor do 3 cm
N2a	Jedan homolateralni čvor od 3-6 cm
N2b	Više homolateralnih čvorova do 6 cm
N2c	Kontralateralni čvor ili bilateralni čvorovi
N3	Jedan homolateralni čvor veći od 6 cm
M	Udaljene metastaze
M0	Nema
M1	Ima
Stadij bolesti	TNM
Stadij 1	T1N0M0
Stadij 2	T2N0M0
Stadij 3	T3N0M0 ili T1-3N1M0
Stadij 4	T4 ili N2-3 ili M1

1.2.6 Klinička prezentacija karcinoma usne šupljine

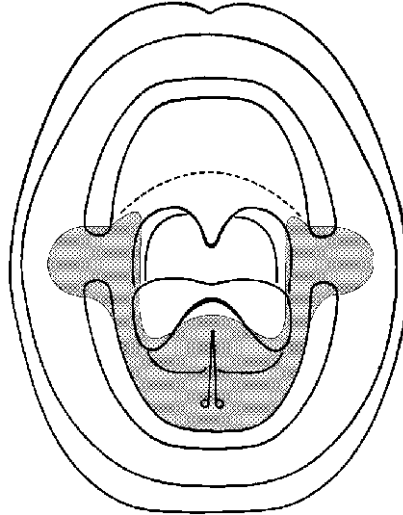
Prvi simptomi karcinoma usne šupljine su obično bol, pečenje, krvarenje, rana u ustima koja ne zacjeljuje, otežan govor ili gutanje, klimavost zubiju, otežano otvaranje usta, ili rjeđe ispad kranijalnih živaca. Simptomi često ovise o lokalizaciji tumora u usnoj šupljini. Tako otežan govor može biti prezentacija karcinoma jezika koji je infiltrirao muskulaturu jezika pa je jezik manje pokretan. Klimavost zubiju je česta prezentacija karcinoma gingive mandibule ili maksile, ili pak uznapredovalog sublingvalnog karcinoma koji je infiltrirao kost. Trizmus je karakterističan za retromolarne karcinome zbog tumorske infiltracije obližnje pterigidne muskulature. Često je čak prva prezentacija pojava čvora, odnosno regionalne metastaze na vratu. Klinički se karcinom usne šupljine najčešće prezentira kao lezija sa središnjim ulkusom oko kojeg se nalazi tvrda tumorska infiltracija. Na dodir obično krvari i boli (Slika 2). Može biti predominantno egzofitičan pa tumor raste prema van ili endofitičan gdje prevladava infiltracijska komponenta (prisutan mali ulkus, ali palpatorno puno veća infiltracija nego očekivano s obzirom na ulkus).



Slika 2. Tipična klinička slika karcinoma jezika

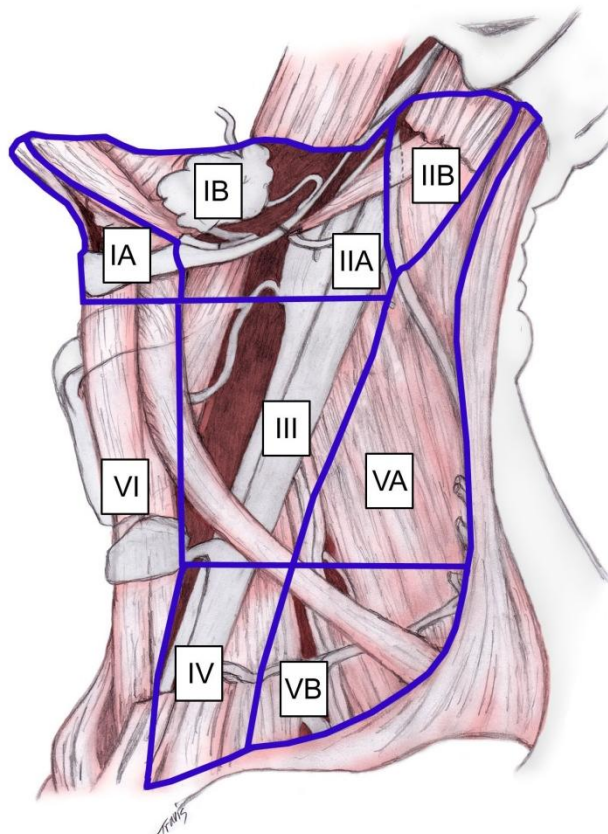
Oko 90% planocelularnog karcinoma u usnoj šupljini se javlja u takozvanom bazenu sline potkovastog oblika (Slika 3), tj. ventralnoj strani i lateralnom rubu jezika, sublingvalnom području i retromolarnom području koje zahvaća svega 20%

površine usne šupljine.³⁸ To je područje najčešće zahvaćeno zbog produženog kontakta sluznice i sline u kojoj se nalaze karcinogeni.¹⁴



Slika 3. Potkovasto područje u usnoj šupljini gdje se najčešće javlja karcinom usne šupljine

Karcinom usne šupljine prvenstveno metastazira u regionalne limfne čvorove vrata koji predstavljaju prvu barijeru širenju tumora sistemski, a vrlo rijetko hematogeno. Hematogene metastaze su kod inicijalne prezentacije bolesnika s karcinomom usne šupljine prisutne u manje od 5% slučajeva i najčešće su u plućima (70%).³⁹ Prema podjeli, koju su razvili Shah i suradnici⁴⁰ u “Memorial Sloan Kettering” bolnici u SAD-u, analizirajući uzorak metastaziranja karcinoma glave i vrata kod 1000 bolesnika, limfne čvorove vrata dijelimo na pet regija (I-V), odnosno iznimno se opisuju još dvije dodatne regije (VI i VII). (Slika 4)



Slika 4. Podjela limfnih čvorova vrata na regije (preuzeto s: <http://emedicine.medscape.com/article/849834-overview>)

Regija I obuhvaća submentalne limfne čvorove (između dva prednja trbuha digastričnog mišića i jezične kosti) te submandibularne limfne čvorove (između mandibule, prednjeg i stražnjeg trbuha digastričnog mišića i stilohoidnog mišića). U ovu regiju se najčešće dreniraju karcinomi koji zahvaćaju donju usnicu, dno usta, jezik, gingivu mandibule.

Regija II obuhvaća gornje jugularne čvorove (uz v. jugularis internu od baze lubanje do jezične kosti, medijalno do stilohoidnog mišića, a lateralno do stražnjeg ruba sternokleidomastoidnog mišića). Akcesorni živac ovu regiju dijeli na IIB, straga i gore od živca, i IIA, sprijeda i dolje od živca. U ovu regiju najčešće se dreniraju karcinomi cijele usne šupljine kao i karcinomi epi-, oro- i hipofarinksa te larinksa, paranazalnih sinusa, parotidne žlijezde.

Regija III obuhvaća srednje jugularne čvorove (uz v. jugularis internu od jezične kosti do krikoidne hrskavice, medijalno do lateralnog ruba sternohoidnog mišića, a

lateralno do stražnjeg ruba sternokleidomastoidnog mišića). U ovu regiju također se dreniraju karcinomi iz cijele usne šupljine kao i karcinomi epi-, oro- i hipofarinksa te larinksa, paranazalnih sinusa, parotidne žlijezde.

Regija IV obuhvaća donje jugularne čvorove (uz v. jugularis internu od krikoidne hrskavice do ključne kosti, medijalno do lateralnog ruba sternohioidnog mišića, a lateralno do stražnjeg ruba sternokleidomastoidnog mišića). U ovu regiju najčešće se dreniraju karcinomi hipofarinksa, larinksa, cervikalnog dijela jednjaka te štitnjače.

Regija V obuhvaća čvorove stražnjeg vratnog trokuta (sprijeda stražnji rub sternokleidomastoidnog mišića, straga prednji rub mišića trapeziusa, dolje ključna kost). Čvorovi uz akcesorni živac pripadaju regiji Va, a čvorovi uz a. i v. transversu colli i supraklavikularno pripadaju regiji Vb. U ovu regiju dreniraju se najčešće karcinomi epifarinksa, orofarinksa te kožni karcinomi stražnjeg dijela vlasišta i vrata.

Regija VI obuhvaća prednje vratne čvorove (pre- i paratrahealni, prekrikoidni te pretiroidni), a anatomska omeđenja su gore jezična kost, dolje jugulum te lateralno zajedničke karotidne arterije. U ovu regiju najčešće se dreniraju karcinomi štitnjače, larinksa i hipofarinksa.

Regija VII obuhvaća gornje mediastinalne čvorove koji su smješteni niže od juguluma.

Anamneza i detaljan klinički pregled glave i vrata su obično dovoljni za postavljanje dijagnoze. Biopsijom se obično potvrdi klinička sumnja na planocelularni karcinom. Multislice kompjutorizirana tomografija (MSCT) usne šupljine, vrata i toraksa je standard u preoperativnoj obradi karcinoma usne šupljine. Ovim putem možemo preciznije utvrditi lokalnu i regionalnu proširenost bolesti, ali isto tako i prisutnost metastaza ili drugog primarnog tumora, najčešće u plućima.⁴¹

1.2.7 Liječenje karcinoma usne šupljine

U liječenju karcinoma usne šupljine moguća je kirurška terapija, radioterapija te kemoterapija.

Kada govorimo o kirurškom liječenju primarnog tumora u usnoj šupljini, onda govorimo o intraoralnoj eksciziji ili o blok resekciji (intraoralni tumor u bloku s disektatom vrata).

Ukoliko je tumor ograničen na usnu šupljinu (bez regionalnih metastaza klinički i/ili radiološki) te je dostupan adekvatnoj kirurškoj resekciji kroz usta (T1, T2 i ponekad T3 tumori), onda je intraoralna resekcija tumora prvi izbor.⁴² Obavezno je redovito praćenje bolesnika s obzirom da se mogu razviti regionalne metastaze, koje su u trenutku intraoralne ekscizije bile klinički okultne. Ukoliko se regionalne metastaze pojave u tijeku praćenja radi se kurativna disekcija vrata.

Blok resekcija uključuje u kontinuitetu resekciju primarnog tumora u usnoj šupljini s disektatom vrata. U kliničkoj praksi koristi se naziv *commando operacija* ili engl. *composite resection*.⁴³ Sam naziv ima povijesnu pozadinu koja seže u vrijeme II svjetskog rata kada su se komandosi iskrcavali u Normandiji i opkolili neprijatelja s dvije strane. Sukladno tome su kirurzi bolnice “Memorial Sloan Kettering Centre” ovu operaciju nazvali *commando operacija* jer se tumoru pristupa istovremeno s dvije strane, kroz vrat i kroz usta.⁴⁴ Blok resekcija se radi:

- Ukoliko je tumor uznapredovao (T3 ili T4) tako da je potreban pristup kroz vrat da bi se adekvatno uklonio tumor iz usne šupljine, a nema klinički evidentnih regionalnih metastaza. U tom slučaju radi se elektivna disekcija vrata.
- Ukoliko nema regionalnih metastaza, a potreban je pristup kroz vrat za potrebe resekcije i/ili rekonstrukcije primarnog tumora (obično mikrovaskularnim režnjevima ili regionalnim režnjevima). I u ovom slučaju radi se elektivna disekcija vrata.
- Ukoliko postoje klinički evidentne regionalne metastaze. U tom slučaju radi se kurativna disekcija vrata.

Pristup kroz vrat na tumor smješten u usnoj šupljini moguć je na tri načina:

- Tzv. “pull through” tehnikom⁴⁵ ukoliko je tumor na dovoljnoj udaljenosti od mandibule tako da se sama mandibula ne mora resecirati iz onkoloških razloga.
- Tzv. mandibularnim swingom ili labiomandibulotomijom⁴⁶ (medijalna, paramedijalna ili lateralna) gdje se prerežu donja usna i brada, a mandibula osteotomira i time se otvori pristup pogotovo za tumore u stražnjem dijelu usne šupljine. Na kraju operacije se napravi osteosinteza mandibule, a usnica po slojevima sašije.
- Segmentalnom resekcijom mandibule u bloku s disektatom vrata.⁴⁴

Mandibula može u određenim slučajevima biti resecirana i marginalno, što znači da se resecira obično gornja polovica te je tako očuvan kontinuitet mandibule, čime se izbjegava funkcijski i estetski defekt koji nosi segmentalna resekcija.⁴²

1.2.7.1 Radioterapija

U liječenju T1 i T2 karcinoma usne šupljine zračenje i kirurško liječenje imaju podjednak učinak. Prednost kirurgije u ovom slučaju je što je liječenje brže, manji je trošak, postoji patohistološki uzorak na kojem se mogu analizirati prognostičke značajke te nema kasnih posljedica zračenja poput kserostomije ili osteoradionekroze mandibule.⁴² T3 i T4 karcinomi se najuspješnije liječe kombinacijom kirurgije i postoperativnog zračenja. U tom slučaju govorimo o adjuvantnoj radioterapiji koja se provodi obično u punoj tumorskoj dozi od 60 do 70 Gy unutar 6 tjedana od operacije da se poboljša lokoregionalna kontrola bolesti uništavanjem eventualnih preostalih klonskih stanica tumora.⁴² Primarna radioterapija se provodi za inoperabilne karcinome usne šupljine ili ukoliko bolesnik odbije kirurško liječenje.

1.2.7.2 Kemoterapija

S obzirom da kemoterapija za karcinom usne šupljine nije dala zadovoljavajuće rezultate, predstavlja zadnji modalitet liječenja. Može se provoditi u tri oblika:

- Adjuvantno: nakon kurativnog zračenja ili operacije sa ciljem uništenja potencijalnih mikrometastaza tumora.

- Neoadjuvantno: kao primarna terapija kod bolesnika koji nisu pogodni za kirurško liječenje ili bi operacija predstavljala veliku mutilaciju.
- Komplementarno: davanje kemoterapeutika prije ili za vrijeme zračenja kako bi se poboljšala lokoregionalna kontrola.⁴²

Kemoterapija se kod karcinoma usne šupljine gotovo uvijek koristi kao neoadjuvantno liječenje uz radioterapiju. Pokazalo se da ne produžuje ukupno preživljenje već samo poboljšava lokoregionalnu kontrolu bolesti, smanjuje postotak udaljenih metastaza i produžava razdoblje bez bolesti (engl. *disease free period*).⁴⁷

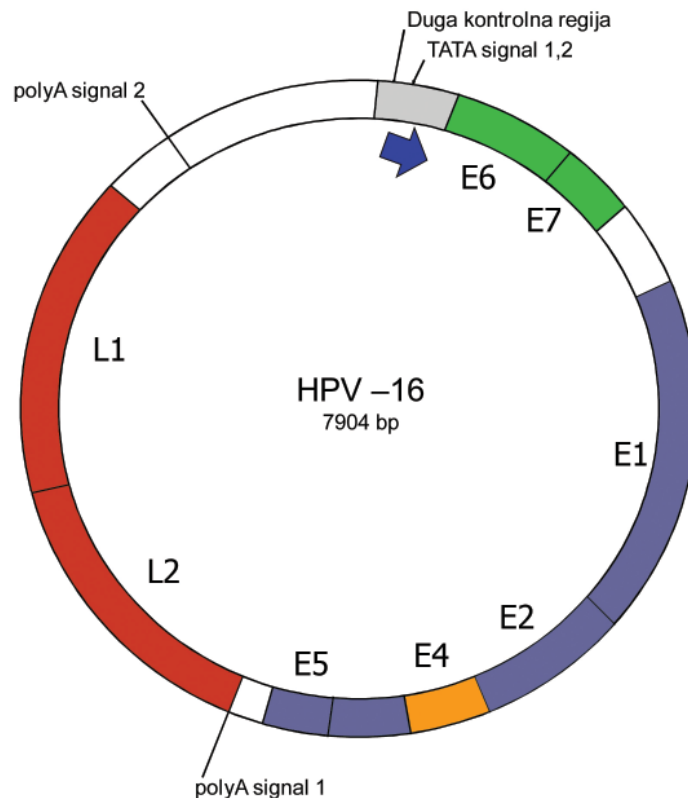
1.2.8 Prognoza i preživljenje

Sveukupno petogodišnje preživljenje za karcinom usne šupljine je 61,5%. Ukoliko je tumor lokaliziran na usnu šupljinu preživljenje je oko 82,4%. Kod prisutnih regionalnih metastaza preživljenje pada na 57,3%, a ukoliko su prisutne i udaljene metastaze petogodišnje preživljenje je oko 34,9%.²

1.3 Humani papiloma virus (HPV)

1.3.1 HPV i molekularni mehanizam karcinogeneze

Postoji oko 130 različitih tipova humanoga papiloma virusa. Mogu se svrstati u kožne ili sluzničke viruse, a unutar svake od ovih grupa pojedini virusi su visokog ili niskog rizika prema sklonosti za malignu progresiju genitalnog epitela, poglavito cerviksa. Od sluzničkih tipova među niskorizičnim najčešći su tipovi 6, 11, 42, 43 i 44, a od visokorizičnih najčešći su 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56 i 58.⁴⁸ Papiloma virusi su mali DNA virusi s ikozohedralnom vanjskom kapsidnom ovojnicom i s dvolančanom DNA koja sadrži oko 8000 parova baza. Genom virusa se dijeli na tri glavne regije: rana E (od engl. *early*) regija koja kodira nestrukturane proteine (E6 i E7 geni za onkoproteine, E2 gen za transkripcijski faktor, E4 gen za helikazu), kasna L (od engl. *late*) regija koja sadrži kod za dva kapsidna proteina (L1 i L2) te duga kontrolna regija LCR (od engl. *long control region*) koja je nekodirajuća i regulira virusnu replikaciju i ekspresiju gena (Slika 5).⁴⁹

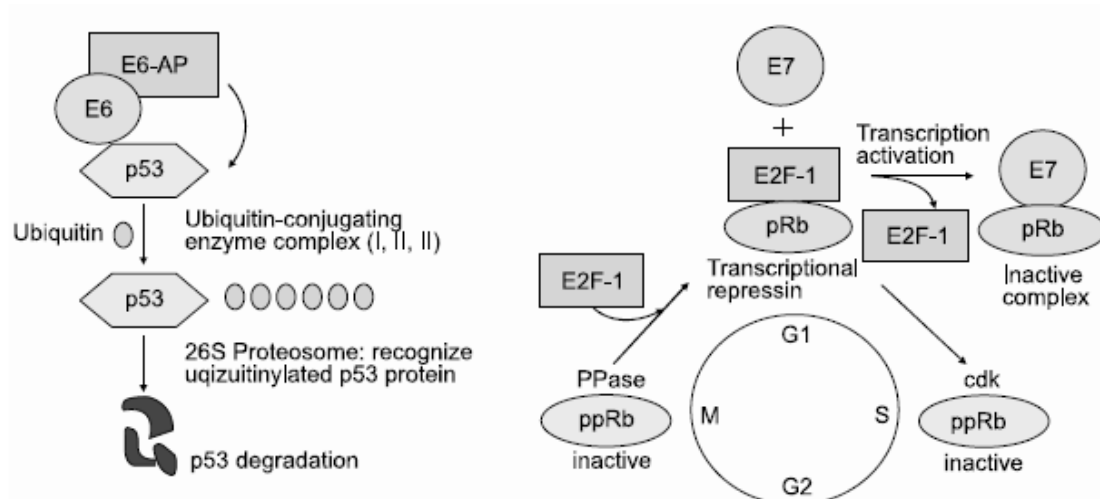


Slika 5. Genom virusa HPV-a (preuzeto iz Hadžisejdić I, Grce M, Grahovac B. Humani papiloma virus i karcinom cerviksa: mehanizmi karcinogeneze, epidemiologija, dijagnostika i profilaksa. Medicina Fluminensis 2010;46:112-23.)

Virus zaražava prvo nediferencirane proliferativne parabazalne stanice višeslojnog pločastog epitela putem mikrotraume epitela, ali i putem za sada još nepoznatih epitelnih receptora. Kada uđe u parabazalne stanice, virus biva prenesen u jezgru gdje se zadržava u episomatskoj formi tj. ekstrakromosomski. Koristeći replikacijske mehanizme epitelnih stanica, virus replicira vlastiti genom na oko 50 do 100 puta. U ovoj fazi ekspresija virusnih proteina je mala. Aktivan je obično E5 protein čiji je zadatak da poviše razinu mitogenih čimbenika, povećavajući proliferaciju bazalnih stanica čime se odgađa stanična diferencijacija. Svrha je ovog procesa povećanje broja inficiranih stanica. Kada je infekcija uspostavljena, ispoljuje se gen E2 koji smanjuje ekspresiju E6 i E7 proteina, čime se smanjuje replikacija stanice te omogućava diferencijacija u keratinocite i migracija u površnije slojeve epitela. Nakon toga protein E1 djeluje na dugu kontrolnu regiju (LCR) čime se

inducira replikacija DNA stanice domaćina, ali i virusne DNA. Kada inficirana stanica konačno dospije na površinski sloj epitela, ispoljavaju se proteini E4, L1 i L2 koji su nužni za formiranje viriona. U ovoj fazi virusne čestice se dalje šire direktnim kontaktom sa sluznicom na novog domaćina.⁵⁰

U visoko promijenjenim epitelnim stanicama, genom visokorizičnih tipova HPV-a često se ugrađuje u genom stanice domaćina što je put prema karcinogenezi. E2 protein u keratinocitima ima obično funkciju transkripcijskog represora virusne ekspresije. Gubitak funkcije E2 gena uslijed ugradnje virusnog genoma rezultira pretjeranom ekspresijom virusnih onkogeni E6 i E7. Onkoprotein E6 ima afinitet za tumor supresorski protein p53. Veže se za njega čineći kompleks i uzrokuje njegovu proteolizu. Protein p53 je središnji protein u kontroli staničnog ciklusa. Povećana ekspresija proteina p53 dovodi do zaustavljanja stanične diobe u G1 fazi u kojoj se vrši popravak DNA, te do indukcije apoptoze. Ukoliko se smanji ekspresija p53 proteina, kao što je slučaj kod virusne infekcije stanica, ne vrši se popravak oštećene DNA i izbjegava se programirana stanična smrt što posljedično vodi u gensku nestabilnost stanice i na kraju neoplastičnu transformaciju. Onkoprotein E7 ima pak afinitet za tumor supresorski protein Rb, stvara s njim kompleks ometajući njegovo djelovanje. Protein Rb ima afinitet da blokira E2 transkripcijski faktor koji inače stimulira replikaciju DNA i ulazak u S fazu staničnog ciklusa. Inaktivacijom pRb se stimulira sinteza DNA i S faza staničnog ciklusa te proliferacija stanica. Dakle, kod visokorizičnih HPV tipova, onkoproteini E6 i E7 supresijom p53 i pRb induciraju genomsku nestabilnost stanice na način da interferiraju s kontrolnim točkama u staničnom ciklusu uzrokujući daljnje nakupljanje mutacija, a ne njihovo ispravljanje (Slika 6).⁵¹ Kod niskorizičnih tipova onkogeni E6 i E7 imaju nizak afinitet za domaćinske tumor supresor gene, stoga su takve infekcije obično samoograničavajuće i prolaze bez posljedica. Perzistirajuća HPV infekcija s visokorizičnim tipovima povećava rizik razvoja karcinoma, a ona s niskorizičnim tipovima povećava rizik razvoja benignih kožnih/sluzničkih lezija.



Slika 6. Mehanizam onkogeneze virusa HPV-a putem onkoproteina E6 i E7 (preuzeto iz: Yim EK, Park JS. The role of HPV E6 and E7 oncoproteins in HPV-associated cervical carcinogenesis. *Cancer Res Treat* 2005;37:319-24.)

1.3.2 HPV i karcinom cerviksa

Karcinom cerviksa je u nerazvijenim zemljama na drugom mjestu po učestalosti kod žena, dok je u SAD-u tek na osmom mjestu. Prihvaćeno je da je infekcija HPV-om spolno prenosiva te da je ona glavni etiološki uzročnik karcinoma cerviksa. Prvi je to dokazao Harald zur Hausen za što je dobio Nobelovu nagradu za medicinu 2008. godine. On je još sedamdesetih godina prošlog stoljeća tvrdio da je virus HPV-a uzročnik karcinoma cerviksa⁵²⁻⁵⁴ što je i dokazano kasnijim istraživanjima. Da bi nešto bilo etiološki čimbenik, potrebno je zadovoljiti nekoliko kriterija (prema odjeljku Etiologija karcinoma Nacionalnog Instituta za rak): epidemiološki kriteriji što znači da uzročnik mora biti pronađen u većini karcinoma, postojanje jasnih molekularnih patoloških mehanizama koji dovode do karcinogeneze, sposobnost karcinogeneze u eksperimentalnim uvjetima (kultura tkiva ili in vitro), sposobnost karcinogeneze kod ispitivanja na životinjama.⁵⁵ Ovi su kriteriji ispunjeni za HPV i karcinom cerviksa dok za ostala sijela svi kriteriji nisu ispunjeni. Danas je poznato da je HPV najčešća spolno prenosiva bolest. Put od infekcije do karcinoma traje najmanje 10 godina čemu prethode razni stupnjevi displazije epitela. Kod cervikalnog karcinoma najzastupljeniji su visokorizični tipovi 16 (oko 60%), 18 (30%) i 45.⁵⁶

1.3.3 HPV i tumori glave i vrata

Prva je na moguću ulogu humanoga papiloma virusa u nastanku tumora glave i vrata ukazala Stina Syrjänen 1983. godine kada je u 16 od 40 tumorskih uzoraka karcinoma larinksa i usne šupljine/farinksa našla histološke i morfološke sličnosti s lezijama inficiranim virusom HPV-a.⁵⁷ Nakon što je 1990. na istom uzorku, metodom PCR i in situ hibridizacije, u 12 od 40 uzoraka dokazala DNA humanoga papiloma virusa, sve više karcinoma glave i vrata se povezuje s HPV-om.⁵⁸ Povezanost se temelji na sljedeće tri činjenice: dobro poznat epitelotropizam virusa HPV-a, morfološke sličnosti sluznice gornjeg aerodigestivnog trakta i anogenitalne sluznice, sposobnost imortalizacije humanih keratinocita in vitro⁵⁹ i snažna etiološka povezanost visokorizičnih tipova HPV-a i cervikalnog karcinoma.⁶⁰ Epitel usne šupljine i orofarinksa je višeslojni pločasti i histološki je sličan epitelu cerviksa te stoga ni ne čudi potencijalni onkogeni učinak HPV-a u tumorima glave i vrata.⁶¹ Virus HPV-a izgleda ima afinitet prema limfoepitelijalnom tkivu Waldeyerovog prstena, točnije prema lingvalnoj i palatinalnoj tozili, mjestima gdje se nalaze duboke kripte u kojima su nezrele bazalne stanice izloženije djelovanju virusa HPV-a.⁶² Jednom kada uđe u stanicu, virus se replicira i integrira u genom domaćina te se onkogeneza dalje odvija na prethodno opisani način. Za razliku od onkogeneze kod pušača i konzumenata alkohola, pretpostavlja se da E6 i E7 onkoproteini vrše inaktivaciju tumor supresor gena p53 i Rb, a ne njihovu mutaciju te na taj način remete stanični ciklus i stanicu čine besmrtnom. Prema podacima iz literature, postoje snažne epidemiološke poveznice između virusa HPV-a i pojedinih sijela tumora glave i vrata. U Europi i SAD-u u zadnjim desetljećima došlo je do značajnog pada aktivnih pušača sa 42% 1965. na 20,9% 2005., a u isto vrijeme porasta broja nepušača sa 44% na 57%. Istovremeno je broj oboljelih od karcinoma glave i vrata točnije orofaringealnog karcinoma (tonzile i baze jezika) porastao za oko 3% u populaciji od 20. do 44. godine.^{63,64} Ovaj trend je također uočen i u Švedskoj i Finskoj.^{65,66} U Švedskoj u Stockholmu 2,8 puta je porastao broj karcinoma tonzile od 1970. do 2002. godine, a broj HPV pozitivnih karcinoma tonzile otprilike isto toliko unatoč smanjenju pušenja.⁶⁷ Dvije velike meta analize su ispitivale učestalost virusa HPV-a u karcinomima glave i vrata diljem svijeta. Kreimer i suradnici⁶⁸ navode podatak od 26%, a Termine i suradnici⁶⁹ od 34,5%. Prema tim meta analizama, iz tumora glave i vrata su izolirani uglavnom visokorizični HPV tipovi i to najčešće tip 16 (80%), a u

manjem broju i tip 18 (5-10%), dok ostali visokorizični tipovi, kao i niskorizični HPV tipovi 6 i 11, izgleda imaju manju ulogu u onkogenezi tumora glave i vrata. Gotovo je nedvojbeno dokazano da virus ima ulogu kod nastanka karcinoma orofarinksa, točnije karcinoma tonzile i baze jezika, a pogotovo kod bolesnika koji nisu pušili niti konzumirali alkohol.⁷⁰ U svim ovim studijama za rastući trend karcinoma orofarinksa optužen je virus HPV-a. Glavni put prijenosa HPV infekcije je spolni odnos. Ranija dob prvog spolnog odnosa, više spolnih partnera, oralno genitalni odnos, ranija prisutnost genitalnih bradavica/infekcije, sve to povećava rizik nastanka HPV pozitivnog tumora glave i vrata.⁷¹

Prema više istraživanja, HPV pozitivni i HPV negativni tumori glave i vrata predstavljaju dva različita klinička entiteta koji se razlikuju po biološkim, epidemiološkim i prognostičkim karakteristikama. Gillison i suradnici⁷² kao i Fakhry i suradnici⁷³ su dokazali da HPV pozitivni tumori imaju manju stopu recidiva, bolju prognozu i petogodišnje preživljenje te bolje reagiraju na kemoradioterapiju nego HPV negativni koji su inducirani pušenjem i alkoholom. Prema nedavnom Gillisonovom istraživanju razlika u petogodišnjem preživljenju između HPV pozitivnog i negativnog orofaringealnog tumora je 30%.⁷⁴

Prema istraživanju Isayeva i suradnika⁷⁵ u kojem se analizirala prevalencija HPV-a u ne-orofaringealnim tumorima glave i vrata, HPV je pronađen u 23,6% laringealnih tumora (od ukupno 1712 slučajeva), 29,6% sinonazalnih tumora (od ukupno 120 slučajeva) i 31,1% nazofaringealnih tumora (od ukupno 154 slučaja). Niti u jednoj skupini nije utvrđen statistički značajno bolji ishod povezan s HPV-om. Klinički značaj prisutnosti HPV-a u ovim tumorima još uvijek nije utvrđen.

Rekurentna respiratorna papilomatoza je bolest koja zahvaća larinks i traheju. Karakterizirana je papilomatoznim egzofitičnim izraslinama na sluznici larinksa i traheje i uzrokuje promuklost i opstrukciju dišnog puta. U 1990-im godinama je HPV dokazan kao etiološki čimbenik i to HPV tipovi niskog rizika 6 i 11. Mogućnost maligne transformacije je mala (manje od 1%). Javlja se u juvenilnom i adultnom obliku, a vjeruje se da je za juvenilni oblik odgovorna infekcija koja nastaje in utero, odnosno prilikom prolaska djeteta pri porodu kroz porođajni kanal. Adultni oblik je povezan, ili s novom infekcijom nastalom oralnim seksom, ili reaktiviranom in utero infekcijom.⁷⁶

Značaj prisutnosti HPV-a u sinonasalnim invertnim papilomima je još od 1980-ih predmet brojnih rasprava. Prema meta analizi Lawson i suradnika⁷⁷, incidencija HPV-a u sinonasalnim invertnim papilomima se kreće oko 25%. Ima li sama infekcija utjecaj na malignu transformaciju i česte recidive, još uvijek ostaje otvoreno.

Oprečni su i oskudni podaci za prisutnost HPV-a u salivarnim tumorima. Hafed i suradnici⁷⁸ su dokazali HPV u 8 od 34 salivarna tumora in situ hibridizacijom te su zaljučili da postoji povezanost između HPV infekcije i salivarnih tumora. Vageli i suradnici⁷⁹ su PCR-om dokazali prisutnost visokorizičnih tipova HPV-a u 7 od 9 parotidnih tumora. Atula i suradnici⁸⁰ pak nisu dokazali HPV niti u jednom uzorku od 38 salivarna tumora. U svim studijama se radi o premalom uzorku da bi se moglo nešto konkretnije zaključiti.

1.3.4 HPV i karcinom usne šupljine

U zdravoj normalnoj sluznici usne šupljine su otkriveni sljedeći tipovi HPV-a: 2, 6, 7, 11, 13, 16, 18, 31, 33, i 35. Značenje prisutnosti HPV-a u zdravoj sluznici usne šupljine još nije poznato. U benignim i zloćudnim oralnim lezijama otkrivena su 24 različita tipa HPV-a: 1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 13, 16, 18, 31, 32, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 55, 56, 57, 58, 59, 66, 69, 72, i 73.^{81,82}

Kao što je prije spomenuto, još 1983. se prvi put dovodi u vezu virus HPV-a i karcinom usne šupljine. Od tada se više istraživanja bavilo s HPV-om i karcinomom usne šupljine, ali se rezultati i mišljenja još uvijek sukobljavaju. Miller i White⁸³ su 1996. objavili pregledni članak u kojem su usporedili prisutnost HPV-a u normalnoj sluznici (10%), premalignim lezijama (18%) te planocelularnom karcinomu usne šupljine (26%). Razlika je bila statistički značajna te su zaključili da je HPV značajno povezan s karcinomom usne šupljine. Miller i Johnstone⁸⁴ 2001. godine objavljuju meta analizu objavljene literature od 1982. do 1997. na temu prevalencije HPV-a u normalnoj sluznici, premalignim lezijama te planocelularnom karcinomu usne šupljine. Razlika je opet bila statistički značajna (46,5% u karcinomima, prema 10% u normalnoj sluznici) te su zaključili da je HPV infekcija neovisni rizični čimbenik za razvoj karcinoma usne šupljine.

Prema rezultatima iz objavljene literature prisutnost HPV-a isključivo u karcinomima usne šupljine se kreće od 0% (Rivero i suradnici⁸⁵, Young⁸⁶, Zeuss i suradnici⁸⁷) pa sve do 100% (Koyama i suradnici⁸⁸, Sugiyama i suradnici⁸⁹). Prevalencija HPV-a u većini studija je ipak oko 30% (Gonzalez-Moles i suradnici⁹⁰, Gichki i suradnici⁹¹, Shindoh i suradnici⁹², Mao i suradnici⁹³, Wen i suradnici⁹⁴, Badaracco i suradnici⁹⁵, Nagpal i suradnici⁹⁶, Fregonesi i suradnici⁹⁷, Nemes i suradnici⁹⁸). Općenito razlog tako velikoj razlici u rezultatima ponajprije treba tražiti u etničko-zemljopisnim razlikama, veličini uzorka, vrsti analiziranog uzorka (biopsija, bris četkicom, ispirak usta), načinu pohrane uzorka (svježe smrznuti, fiksiran u formalinu, parafinski blok), metodama detekcije HPV-a (PCR, ISH, serologija, imunohistokemija) te lokalizaciji uzorka (usna šupljina, oro-, epi-, hipofarinks, larinks).

Poznato je da zemljopisna raznolikost utječe na varijabilne rezultate prevalencije HPV-a. Tako studije iz Azije imaju najveću prevalenciju HPV-a u karcinomu usne šupljine (od 66% do 100%) što može uputiti da HPV u kombinaciji s određenim dijetnim navikama i genetskom predispozicijom može dovesti do razvoja karcinoma usne šupljine.⁹⁹⁻¹⁰³ Meta analiza radova od 1994. do 2011. na temu HPV-a kod kineskih bolesnika s karcinomom usne šupljine je otkrila prevalenciju HPV-a od 58%.¹⁰⁴ Nama zemljopisno najbliža studija je ona Kanskog i suradnika¹⁰⁵ iz Slovenije, gdje je na uzorku od 62 bolesnika s karcinomom usne šupljine samo 8,4% bilo pozitivno na HPV detektiran PCR metodom iz parafinskih blokova. Zemljopisno najniža prevalencija HPV-a zabilježena je u studijama iz Afrike. Van Rensburg i suradnici^{106,107}, i Boy i suradnici¹⁰⁸ su kod populacije bolesnika s karcinomom usne šupljine u Južnoafričkoj Republici utvrdili prevalenciju HPV-a od 0% do 11,9%. Ibrahim i suradnici¹⁰⁹ na 88 bolesnika iz Sudana nisu uspjeli dokazati ni PCR-om, ni ISH, niti jednu HPV DNA u tumorskim uzorcima karcinoma usne šupljine.

Što se tiče uzorka, biopsija ili trajni kirurški preparat dobiven resekcijom tumora je bolji nego bris ili ispirak usta jer je reprezentativniji te uključuje i stanice bazalnog sloja, gdje je virus obično prisutan kad je i u latentnom neproduktivnom obliku.¹¹⁰ Miller i White⁸³ su utvrdili značajnu razliku između svježih uzoraka tkiva i parafinskih preparata u pogledu detekcije HPV-a, tj. značajno više je detektiran HPV u svježim nego u parafinskim uzorcima.

Što se tiče metode detekcije HPV-a, potrebna je visoko osjetljiva metoda zbog slabe virusne produktivnosti u sluznici gornjeg aerodigestivnog trakta pa je PCR vjerojatno metoda izbora.

Prema ranije navedenoj meta analizi Termine i suradnika⁶⁹, prevalencija HPV-a u karcinomima samo usne šupljine (isključujući ostala sijela glave i vrata) je 38,1%. To je rezultat analize ukupno 47 studija odnosno 3583 bolesnika s karcinomom usne šupljine diljem svijeta u kojima je istraživana prevalencija HPV-a. Doduše, niti u jednoj od tih studija ne spominje se podatak o pušenju i alkoholu, tipičnim rizičnim čimbenicima, odnosno prevalencija HPV-a kod takvih nerizičnih bolesnika. U istoj studiji je prevalencija HPV-a, u kojoj nije bilo naznačeno podsijelo tumora glave i vrata (dakle zajedno uzorci tumora usne šupljine, farinksa, larinksa), bila 24,1%. Upravo iz tog razloga Termine naglašava da je osobito bitno raditi distinkciju iz kojeg anatomskeg dijela gornjeg aerodigestivnog trakta dolaze uzorci u kojima se analizira prisutnost HPV DNA jer se time izbjegava moguća pogreška u analizi stope prevalencije HPV-a u tumorima glave i vrata.⁶⁹ Ponekad se ne radi stroga distinkcija između karcinoma usne šupljine i orofaringealnog karcinoma ili karcinoma oralnog dijela jezika i baze jezika pa je možda i to razlog za povećanu prevalenciju HPV-a u karcinomu usne šupljine u nekim studijama.¹¹¹

S obzirom na sve podatke, još uvijek nije sa sigurnošću potvrđena, ali ni isključena uloga HPV-a u karcinomu usne šupljine, a pogotovo kod bolesnika koji ne puše i ne konzumiraju alkohol s obzirom da takvih studija gotovo ni nema.

1.3.5 Metode dokazivanja HPV-a kod tumora glave i vrata

1.3.5.1 Direktno dokazivanje HPV-a

Metodom Southern blotting genomski DNA se ekstrahira iz uzorka i rastavi pomoću enzima. Zatim se fragmenti DNA elektroforezom u agarozu gelu razdvoje ovisno o veličini samog fragmenta. DNA fragmenti se zatim hibridiziraju s HPV genomskim probama koje su označene radioizotopom. Detekcija označenih DNA hibrida znači prisustvo HPV-a u datom uzorku. Ova metoda se ne može upotrijebiti za dokazivanje HPV DNA iz parafinskih uzoraka s obzirom da je u njima DNA obično križno povezana i degradirana. U odnosu na PCR, Southern blotting metoda je možda specifičnija, ali nije toliko osjetljiva te danas više nema primjenu u kliničkoj praksi.

Reakcija lančanom polimerazom (PCR, engl. *Polymerase Chain Reaction*) je metoda u kojoj se signalna sekvenca DNA ili RNA (odnosno komplementarna DNA nakon reverzne transkriptaze) amplificira u velikom broju kroz nekoliko krugova denaturacije na visokim temperaturama (950 °C), zatim spaja s komplementarnim oligonukleotidima (engl. *primers* odnosno početnice) na niskim temperaturama (550 °C) te replicira na 720 °C pomoću DNA polimeraze. Broj tako novonastalih DNA se povećava geometrijskom progresijom (1, 2, 4, 8, 16, 32, 64,...). Dokazivanje HPV-a ovom metodom se temelji na umnožavanju L1 regije genoma virusa HPV-a koja je najčešće uvijek očuvana, te se koriste početnice koje su specifične za više najčešćih tipova HPV-a.¹¹² Najčešće korišteni komercijalni kitovi, tzv. konsenzus početnice su PGMY09/11, GP5+/GP6+ i SPF10.¹¹³ Početnice se razlikuju po broju parova baza (PGMY09/11 450pb, GP5+/GP6+ 140 pb, SPF 65 pb) te je ona početnica, koja je manja, ujedno i osjetljivija s obzirom da se prilikom ekstrakcije DNA iz parafinskih blokova događa određeni stupanj fragmentacije. Stoga razlike u objavljenim rezultatima učestalosti HPV-a mogu proizlaziti i iz korištenja više ili manje osjetljivih početnica. Razlikovanje pojedinih tipova HPV-a, odnosno genotipizacija, se vrši hibridizacijom sa specifičnim oligonukleotidnim probama. PCR metoda je visoko osjetljiva metoda koja može detektirati već i jednu kopiju DNA po stanici. Može se koristiti na svježem tkivu ili na parafinskim blokovima. Specifičnost je također vrlo visoka iako su neke druge metode još specifičnije. Negativne strane su što je nemoguće razlikovati episomalnu od integrirane DNA, nemoguće je utvrditi potječe li

HPV DNA iz neoplastičnog tkiva ili okolnog tkiva u uzorku, odnosno je li otkriveni HPV aktivan ili ne,¹¹⁴ te se navodi da je ova metoda sklona nekad lažno pozitivnim rezultatima zbog potencijalne kontaminacije uzorka.^{115,116}

Metodom PCR u realnom vremenu (engl. *real time PCR*) se ciljane DNA može kvantitativno analizirati određujući virusno opterećenje (engl. *viral load*). Time se izbjegavaju lažno pozitivni rezultati s obzirom da PCR može otkriti i samo jednu kopiju ciljane DNA po stanici.¹¹⁷

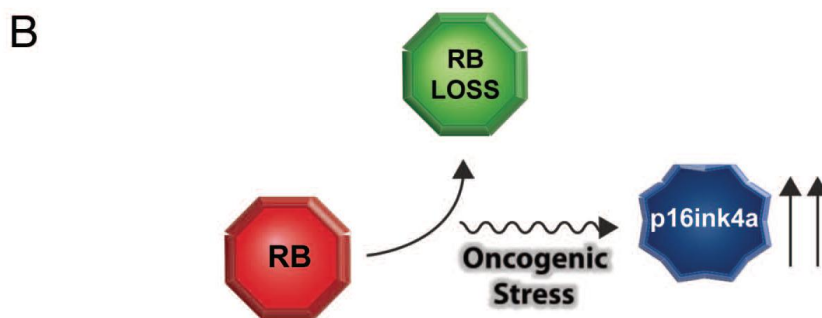
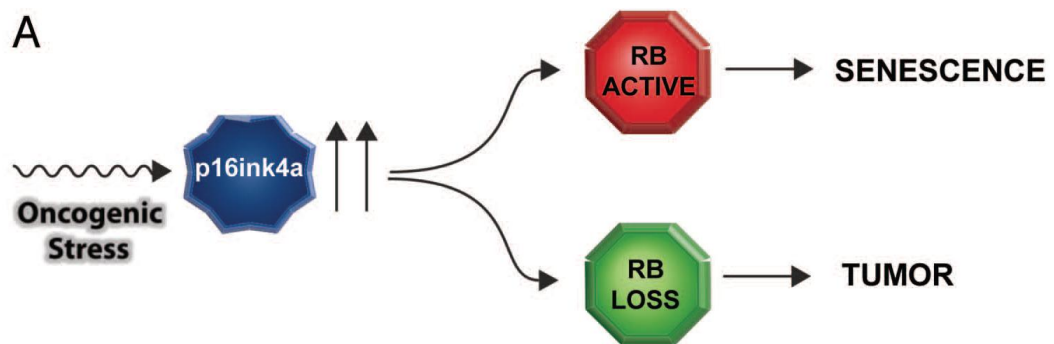
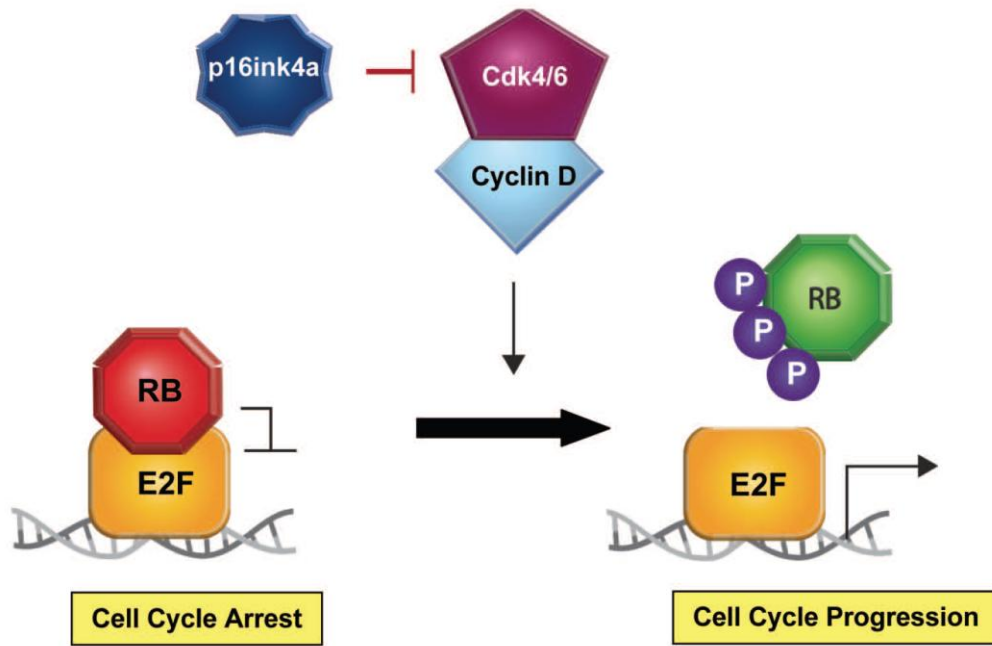
Metodom PCR reverzne transkriptaze mRNA E6 ili E7 proteina se pomoću istoimenog enzima pretvori u komplementarnu DNA koja se onda amplificira na već opisani način. Ovim putem se dokazuje transkripcijski aktivna HPV infekcija te time i klinički značajna. Negativna strana je što je ova metoda vremenski dugotrajna i tehnički zahtjevna.¹¹⁸

Metoda *in situ* hibridizacije (ISH) jedina razlikuje smještaj virusne DNA u patološkom uzorku, tj. razlikuje je li smještena u tumorskim stanicama ili ne, te gdje se u stanici nalazi, integrirana u genom ili je u episomalnoj formi. Time se može razlikovati klinički značajna od neznčajne infekcije.¹¹⁹ Rezultat hibridizacije s komercijalnim kitovima se evaluira mikrosopski pomoću fluorescencije. Ako je izgled precipitata točkast, onda se virus nalazi u integriranoj formi, a ako je difuzan, onda je u episomalnoj. Najveća negativna strana, zbog koje se ova metoda ne koristi rutinski u dokazivanju HPV-a, je relativno mala osjetljivost od oko 83% (manja nego PCR), dok je specifičnost 100%.¹¹⁷

1.3.5.2 Indirektno dokazivanje HPV-a

Imunohistokemijsko dokazivanje HPV-a se zasniva na dokazivanju povišene ekspresije proteina p16INK4a. Protein p16INK4a je zadužen za kontrolu staničnog ciklusa i inače se u stanici nalazi vezan za ciklin ovisne kinaze 4 i 6 (CDK4 i 6). Time inhibira njihovu aktivnost putem ciklina D onemogućujući fosforilaciju proteina Rb. Nefosforilirani protein Rb veže na sebe transkripcijski faktor E2F i time spriječava progresiju iz G1 u S fazu staničnog ciklusa. Stoga povišene razine proteina p16INK4a inhibiraju proliferaciju, a gubitak funkcije p16INK4a dovodi do fosforilacije proteina Rb, otpuštanja E2F transkripcijskog faktora i neinhibirane progresije staničnog

ciklusa.¹²⁰ HPV putem svojih onkoproteina, prvenstveno E6 i E7, inaktivira tumor supresor gene. Tako se protein E7 veže na protein Rb i dovodi do njegove degradacije čime dolazi do gubitka funkcije Rb proteina, otpuštanja E2F faktora i nekontroliranog ulaska u stanični ciklus. Da bi stanica popravila štetu, aktivira se pojačano p16INK4a protein koji zbog nefunkcionalnog Rb proteina ne može više zaustaviti stanični ciklus. Ovo je molekularni mehanizam putem kojeg se, pomoću povišene ekspresije proteina p16INK4a u preparatu tumora, indirektno dokazuje HPV infekcija, odnosno aktivnost onkoproteina E6 i E7 HPV-a.¹²¹ Sam onkogeni stres, koji stanica prepoznaje kao takav, može dovesti do pojačane ekspresije p16INK4a bez utjecaja na funkciju pRb (Slika 7).¹²² Imunohistokemijsko bojanje, odnosno dokazivanje proteina p16INK4a, ima visoku osjetljivost (blizu 100%) za detekciju HPV povezanog tumora te se često koristi kao surogat marker HPV infekcije. Specifičnost ove metode je niža, između 70 i 80%. Prednost metode je što se može izvesti i na svježim uzorcima i na parafinskim blokovima, te su komercijalni kitovi izrazito dostupni.



Slika 7. Signalni putevi u staničnom ciklusu. (A) Funkcija p16INK4a proteina kao regulatora staničnog ciklusa preko proteina CDK4/6 djeluje na Rb protein. (B) Onkogeni stres direktno ili putem gubitka funkcije Rb proteina djeluje na povišenu ekspresiju p16INK4a proteina koji pokušava svojim mehanizmom zaustaviti stanični ciklus (preuzeto iz: Witkiewicz AK, Knudsen KE, Dicker AP, Knudsen ES. The meaning of p16(ink4a) expression in tumors: functional significance, clinical associations and future developments. Cell Cycle 2011;10:2497-503.)

Serološko dokazivanje HPV-a uključuje detekciju protutijela na HPV-16 u plazmi ispitanika koristeći standardnu ELISA (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) metodu.¹²³ Ovom metodom se dokazuje izloženost infekciji HPV-a tijekom života ispitanika, a ne trenutnog stanja infekcije. Naime, ovom metodom ne može se dokazati virus HPV-a u usnoj šupljini, a još manje u samom tumoru.

1.4 HPV i karcinom usne šupljine kod nerizične populacije

Vrlo je malo studija koje su se bavile samo karcinomom usne šupljine kod bolesnika bez tipičnih rizičnih čimbenika, a još manje onih koje su utvrđivale prevalenciju HPV-a kod takve populacije.

Pregledom literature nađene su sljedeće studije koje su istraživale populaciju bolesnika (obično mlađi od 40 godina ili stariji iznad 70 godina) bez tipičnih rizičnih čimbenika s karcinomom glave i vrata. One uglavnom nisu povezivale prisutnost HPV-a u preparatima tumora takvih bolesnika, a ako i jesu, onda nisu uspoređivale klinički ishod (preživljenje, pojavu recidiva, drugog primarnog tumora) s bolesnicima koji su u anamnezi imali pušenje i konzumaciju alkohola.

Farshadpour i suradnici¹²⁴ analiziraju kliničko-patološke karakteristike 195 nerizičnih bolesnika (4,4% od ukupnog broja) od 1980. do 2003. godine. Uključeni su tumori glave i vrata svih sijela (usna, oro- i hipofarinks, larinks). Nerizični bolesnici su u prosjeku stariji, bilo je 73% žena, 67% tumora je bilo smješteno u usnoj šupljini (nema dalje podjele po anatomskim lokacijama). Drugi primarni tumor je razvilo 16% bolesnika. Predlažu se drugi karcinogeni čimbenici kao HPV, gastrointestinalni refluks, lichen planus, dijeta bez voća i povrća, obiteljska predispozicija, ali ništa se nije dokazivalo pa nema konkretnih podataka. Zanimljiva je visoka stopa drugih primarnih tumora kod nerizičnih bolesnika. Nedostaci ovog istraživanja su da nema podataka o preživljenju i recidivima, nema raščlanjenja nerizičnih bolesnika po godinama (mladi, stari), nema analize prisutnosti HPV-a. Nedostatak je i što su uključeni svi tumori glave i vrata, a ne samo usna šupljina (uključena čak i usnica za koju alkohol i pušenje ionako nisu etiološki čimbenici), te se s obzirom na visok postotak sijela tumora u usnoj šupljini ne navodi gdje su ti tumori u ustima bili smješteni.

Dahlstrom i suradnici¹²⁵ analiziraju sve bolesnike s karcinomom glave i vrata od 1996. do 2005. godine. Bez rizičnih čimbenika ih je bilo 172, a 1131 s tipičnim rizičnim čimbenicima. Nepušači su bili oni koji su u životu popušili manje od 100 cigareta, a nekonzumenti alkohola oni koji nisu pili alkohol svaki tjedan kroz godinu dana. HPV je dokazivan PCR-om iz tumora i serološki. Nerizični bolesnici su bili značajno mlađi i bilo je više žena, te ih je bilo više krajnjih godina (ili mladi ili stari). Češće su imali tumore u usnoj šupljini (jezik) i orofarinksu. Nerizični muškarci su češće imali tumore orofarinksa dok su žene imale češće karcinome usne šupljine. Također, javljali su se u ranijim stadijima u odnosu na kontrolnu skupinu. HPV 16 je bio pozitivan kod 16% nerizičnih te 12% rizičnih bolesnika. Zaključuje se da je karcinom kod nerizičnih bolesnika karcinom jezika kod žena mlađih od 50, orofaringealni karcinom kod muškaraca ispod 60 i gingivobukalni kod žena starijih od 70 godina, te da je HPV bitan kod nerizičnih za razvoj karcinoma orofarinksa. Nedostaci ovog istraživanja su da ostaje i dalje otvoreno pitanje ima li HPV ulogu kod karcinoma usne šupljine nerizičnih bolesnika, što ćemo upravo mi u našoj studiji pokušati dokazati. Nadalje nema analize preživljenja nerizičnih bolesnika niti ima ikakvog govora o pojavi recidiva ili drugih primarnih tumora. Kao i u prethodnoj, i u ovoj studiji su uključeni nerizični bolesnici s karcinomom svih sijela glave i vrata, a ne samo s karcinomom u usnoj šupljini.

Harris i suradnici¹²⁶ proučavaju bolesnike mlađe od 40 godina s karcinomom glave i vrata koji su nepušači i ne konzumiraju alkohol. Cjelokupni uzorak je 78 bolesnika između 18 i 39 godina od čega je 28 bez rizičnih čimbenika, a 50 je redovito konzumiralo alkohol i pušilo. Nerizični bolesnici su bili statistički značajno mlađi. Bilo je više žena i bijelaca u istoj skupini te su imali češće T1 karcinome i to jezika. Nije bilo razlike u desetogodišnjem preživljenju, ali su nerizični bolesnici imali značajno bolje sveukupno preživljenje (71% prema 46%). Razlika našeg istraživanja od ove studije je što su u studiji uključeni nerizični bolesnici s karcinomom svih sijela glave i vrata, a ne samo s karcinomom u usnoj šupljini. Isto tako nije analizirana pojava HPV-a kao mogućeg etiološkog čimbenika kod takvih bolesnika. Istraživanje analizira samo nerizične bolesnike mlađe od 40 godina, dok su u našu studiju uključeni i stariji nerizični bolesnici.

Pytynia i suradnici¹²⁷ provode prospektivnu epidemiološku studiju, uspoređuju 50 parova pušača i nepušača s karcinomom usne šupljine i ždrijela koji su slični po

ostalim karakteristikama (engl. *matched case analysis*). Prosjek godina je 54. Među skupinom nepušača 13 ih je s karcinomom usne šupljine (najčešće jezik), 31 s karcinomom orofarinksa (najčešće tonzila). Nepušači su imali značajno bolje preživljenje kao i manje recidiva. Nedostaci ovog istraživanja su što nema podataka o drugim primarnim tumorima, nema analize prisutnosti HPV-a kod nepušača, ne spominje se konzumacija alkohola, heterogena grupa tumora (svi tumori glave i vrata, tj. nije samo usna šupljina).

U još jednoj studiji Dahlstrom i suradnici¹²⁸ postavljaju hipotezu da je HPV 16 infekcija, dokazana serološki, rizični čimbenik za karcinom glave i vrata, osobito za orofaringealni karcinom i to posebno kod nepušača i nealkoholičara. Podijelili su ispitanike u dvije skupine. Jedna skupina je bila od 120 bolesnika s karcinomom glave i vrata (60 pušača i 60 nepušača), a druga kontrolna skupina od 120 zdravih ljudi. Serološki pozitivno na HPV je bilo 40% bolesnika, dok ih je u kontrolnoj skupini pozitivno bilo samo 9%. Iako je 43% nepušača bilo pozitivno serološki prema 38% pušača s karcinomom, nije nađena statistički značajna razlika između pušača i nepušača s karcinomom glave i vrata. S HPV-om je bilo povezano 58% karcinoma orofarinksa, a samo 8% karcinoma usne šupljine. Zaključuje se da postoji povezanost između orofaringealnog karcinoma i serološki dokazanog HPV-a (sedam puta veći rizik). Nedostaci ovog istraživanja su što su i u ovoj studiji uključeni svi karcinomi glave i vrata (ne zna se od ukupnog broja bolesnika koliko ih je bilo s karcinomom usne šupljine), što nema analize preživljenja, drugih primarnih tumora ili pojave recidiva. Također, serološko ispitivanje upućuje samo na kontakt s HPV-om u tijeku života, a ne njegovo prisustvo u stanicama tumora.

Andrews i suradnici¹²⁹ provode studiju o povezanosti visokorizičnog HPV-a i karcinoma glave i vrata kod nepušača i nealkoholičara. Od 802 bolesnika bilo je 40 nerizičnih. Od toga su 22 bolesnika bila s lezijom u usnoj šupljini ili orofarinksu, a 18 je bilo kontrola, tj. bez karcinoma. Analizirali su prisutnost HPV-a tip 16/18 u parafinskim blokovima PCR metodom. Navode da je to prva studija o ulozi papiloma virusa kod bolesnika bez rizičnih čimbenika. Hipoteza je da je visokorizični HPV uzročnik karcinoma orofarinksa kod netipičnih bolesnika. HPV 16 je imalo 78% takvih bolesnika u parafinskim preparatima od čega je 85% slučajeva orofaringealnog karcinoma bilo pozitivno na HPV. Autori na kraju zaključuju da je HPV kod nerizičnih bolesnika s orofaringealnim karcinomom potencijalni uzročnik tumora.

Nedostaci ovog istraživanja su: mali uzorak, pomiješani tumori usne šupljine i orofarinksa u uzorku, ne spominje se postotak pozitivnosti karcinoma usne šupljine na HPV, nema analize preživljenja, pojave drugih primarnih tumora ili recidiva kod takvih bolesnika.

Wiseman i suradnici¹³⁰ navode da je etiologija, kao i biološko ponašanje, tumora kod bolesnika bez rizičnih čimbenika nejasno kao i ponašanje na liječenje. Cilj studije je da pokaže kliničke manifestacije bolesti i rezultate liječenja s krajnjim ciljem da se popravi ishod u ovoj jedinstvenoj populaciji. Od 1970. do 2001. godine svega 40 (2,4%) bolesnika su bili oni koji nisu pušili ni konzumirali alkohol. Kriteriji koje koriste za uključivanje bolesnika u studiju su: nije pušio, nije konzumirao alkohol, bez anamneze zračenja glave i vrata, nije koristio betelov oraščić, nije ranije imao tumor glave i vrata, bez imunosupresije. Analizom takvih bolesnika utvrdili su da su srednje godine 60, omjer je bio 3:1 za žene i samo je jedan imao srodnika s tumorom glave i vrata. U usnoj šupljini se javlja 75% tumora, 20% u orofarinksu i 5% u larinksu. Uglavnom su se bolesnici javljali u uznapredovalim stadijima. Recidive je dobilo 47,5%, od čega polovica u usnoj šupljini. Bilo je 25% drugih primarnih tumora (svi u usnoj šupljini). Tumor u usnoj šupljini je imalo 41% bolesnika, najčešće jezik pa bukalna sluznica. Nedostaci ovog istraživanja su što su se analizirali svi tumori glave i vrata, a ne samo usne šupljine i što nema analize HPV-a kod ovih bolesnika, a to je jedna od bitnih razlika prema našoj studiji. Nedostatak je i relativno mali uzorak s obzirom na veliki vremenski raspon.

Tan i suradnici¹³¹ analiziraju 59 nepušača i uspoređuju s kontrolnom skupinom svih bolesnika s karcinomom glave i vrata od 1986. do 1993. godine. Cilj studije je bio dokazivanje uloge pasivnog pušenja i okarakterizirati tu nerizičnu populaciju. Druga kontrolna skupina su zdravi pojedinci bez karcinoma glave i vrata koji su nepušači radi usporedbe uloge pasivnog pušenja. Rezultati su sljedeći za nerizičnu populaciju: više je žena i to osobito u starijoj dobi, obično se javljaju s karcinomom jezika, puno je manje laringealnog karcinoma, također je povećan rizik za pojavu drugog primarnog tumora (10%), češće u bijeloj rasi, značajno su više bili izloženi pasivnom pušenju nego kontrolna skupina. Nedostaci ovog istraživanja su što nema usporedbe preživljenja među skupinama ili pojave recidiva, nema analize uloge HPV-a, te kao i u brojnim prethodnim studijama nema izolirane analize nerizičnih bolesnika samo s karcinomom usne šupljine.

Wey i suradnici¹³² retrospektivno analiziraju ukupno 109 bolesnika s karcinomom usne šupljine, od čega je 14 bilo bez tipičnih rizičnih čimbenika i to sve žene. Samo je bio jedan muškarac bez rizičnih čimbenika koji nije uključen u studiju. Najčešće sijelo je bilo gingiva sa 40%, a nakon toga jezik s 26%. Nerizični bolesnici su u prosjeku bili stariji za 10 godina od tipičnih bolesnika. Obično su se javljali u ranim stadijima. Recidiv ih je dobilo 50%, za razliku od tipičnih bolesnika (37%). Bolja kontrola recidiva je kod netipičnih (češće su lokalni) nakon ponovnog liječenja. Nijedan drugi primarni tumor nije bio kod netipične populacije. Isto tako imali su bolje preživljenje, 79% prema 63%. To je jedna od rijetkih studija koja analizira nerizičnu populaciju kod bolesnika samo s karcinomom usne šupljine. Nedostaci ovog istraživanja su: mali uzorak, samo jedan spol, nema analize HPV-a kao mogućeg rizičnog čimbenika.

Bundgaard i suradnici¹³³ analiziraju 23 nerizična bolesnika s karcinomom usne šupljine te zaključuju da nema razlike u preživljenju među ovom populacijom i kontrolnom grupom. Zaključuju da u ovoj skupini ima više žena te da se razlikuje od kontrolne skupine po diferencijaciji tumora i anatomskoj lokaciji intraoralno. Nedostaci ovog istraživanja su: relativno mali uzorak za istraživanje, nema analize drugih primarnih tumora, recidiva, nisu ispitivali ulogu HPV-a.

Agudelo i suradnici¹³⁴ su retrospektivno analizirali 933 laringealna karcinoma od 1984. do 1993. godine od čega je 31 (3,3%) bio nepušač i nije konzumirao alkohol. Nepušači su bili starije dobi, nije bilo predominacije muškaraca već su podjednako oboljevale i žene. Obično su imali tumore glotisa, manje tumore, bolje preživljenje i nisu imali druge primarne tumore. Nedostatak je što se studija bavi različitom lokalizacijom tumora za razliku od našeg istraživanja. One su po konceptu slične, jedino što nerizične bolesnike autori nisu testirali na prisutnost HPV-a u tumorima larinksa.

Koch i suradnici¹³⁵ su analizirali pojavu p53 mutacija i HPV-a kod 305 bolesnika s karcinomom glave i vrata. Podijelili su ih u dvije skupine, 230 pušača i 46 nepušača te 29 bivših pušača. Češće su bile mutacije p53 kod pušača, a HPV je bio gotovo jednako učestao kod pušača i nepušača s time da je HPV uglavnom bio pozitivan kod karcinoma orofarinksa nepušača. Nepušači su imali dvostruku stopu učestalosti HPV povezanih tumora. Nepušači su češće imali tumore jezika i bukalne

sluznice, a pušači sublingvalne tumore. Nepušači su se pojavljivali u ranijim stadijima (bilo zbog bolje brige za zdravlje, prednjeg smještaja tumora, manje agresivnosti tumora). Nije bilo statistički značajnije razlike u preživljenju između pušača i nepušača. Isto tako razvoj drugih primarnih tumora se nije razlikovao između dvije grupe bolesnika. Nedostaci ovog istraživanja su: analizirani su svi tumori glave i vrata, a ne samo usna šupljina (ne znamo broj karcinoma usne šupljine u studiji), nije uzet u obzir i alkohol tj. onaj manji dodatni broj bolesnika koji ne puše, a piju. Nema podataka o recidivima kod nepušača.

Fouret i suradnici¹³⁶ analiziraju prisutnost HPV-a kod 187 bolesnika s karcinomom glave i vrata. Bolesnike su podijelili na pušače i nepušače. Ukupno 10% svih bolesnika je imalo PCR metodom izoliran HPV iz parafinskih blokova tumora, s time da je dvaput češće HPV bio nađen u orofarinksu. Bilo je svega 10 nepušača od kojih je 50% imalo prisutnost HPV-a dok je svega 8% pušača bilo pozitivno na HPV. Nedostaci ovog istraživanja su: analizira se cijela populacija bolesnika s karcinomom glave i vrata ne izolirano bolesnici s karcinomom usne šupljine, mala skupina bez rizičnih čimbenika (svega 10 bolesnika), nema kliničkih značajki (preživljenje, pojava drugih primarnih tumora, recidiva).

Lingen i suradnici¹³⁷ su napravili pregledni članak o populaciji bolesnika s karcinomom glave i vrata bez rizičnih čimbenika na osnovi do tada objavljene literature. Zaključak je da je HPV odgovoran za nastanak orofaringealnog karcinoma te da HPV pozitivni tumori imaju bolju prognozu. Što se tiče karcinoma usne šupljine ne navodi se ni u jednoj studiji povezanost s HPV-om. Uglavnom su to mlađe ženske osobe koje obolijevaju od karcinoma jezika, ali etiologija nije nigdje dokazana. Nedostatak je što se i u ovom preglednom članku ne analizira posebno usna šupljina i što se ne spominju studije gdje bi se dokazivao HPV kod karcinoma usne šupljine.

Uvidom u dosadašnju objavljenu literaturu na navedenu temu postoje određene zamjerke. Uglavnom sve studije analiziraju učestalost HPV-a u svim karcinomima glave i vrata što znači da su tu zajedno svrstani karcinomi usne šupljine, orofarinksa, hipofarinksa i larinksa, a tek se u tekstu eventualno navode podaci po anatomskim jedinicama. Većina studija nije ispitala nerizičnu populaciju samo s karcinomom usne šupljine, već općenito s karcinomom glave i vrata. Broj analiziranih uzoraka je obično bio mali (najveći uzorak ima Farshadpour¹²⁴ ukupno 130 bolesnika te

Dahlstrom¹²⁵ sa 73 bolesnika, većina ostalih ima od 2 do 38 bolesnika). Neke studije su ispitivale samo žensku nerizičnu populaciju. Isto tako nijedna studija nije bila sveobuhvatna, tj. neke su utvrđivale biološko ponašanje tumora (stadij, preživljenje, recidive, druge primarne tumore) kod navedene populacije, ali nisu ispitivale učestalost, odnosno ulogu HPV-a i obrnuto (Tablica 2). Imajući to na umu, ovo istraživanje je posebno jer je uzorak ciljano odabran, odnosno analiziraju se samo bolesnici bez tipičnih rizičnih čimbenika s planocelularnim karcinomom u usnoj šupljini ne miješajući ih s ostalim sijelima glave i vrata. Namjera ovog istraživanja je upravo utvrditi biološko ponašanje tumora i korelirati ga s HPV statusom kod navedene populacije s karcinomom u usnoj šupljini, a bez tipičnih rizičnih čimbenika.

Tablica 2. Pregled studija koje su se bavile karcinomom glave i vrata kod nerizične populacije

Autor	Vremenski period	Sijela tumora glave i vrata	Ukupan broj bolesnika u studiji	Broj bolesnika bez tipičnih rizičnih čimbenika		Dokazivanje prisutnosti HPV-a (metoda)	Analiza biološkog ponašanja karcinoma kod nerizične populacije*
				Svi	Oni s karcinomom u usnoj šupljini		
Farshadpour ¹²⁴	1980-2003	Sva sijela	4404	195	130	Ne	Djelomično
Dahlstrom ¹²⁵	1996-2005	Sva sijela	1303	172	73	Da (PCR i serološki)	Ne
Harris ¹²⁶	1989-2007	Sva sijela	78 (mlađi od 40)	28	10	Ne	Da
Pytynia ¹²⁷	1995-2001	Sva sijela	100	50 (samo nepušači)	13	Ne	Djelomično
Dahlstrom ¹²⁸	1996-2001	Sva sijela	120	60	18	Da (serološki)	Ne
Andrews ¹²⁹	1995-2005	Orofarinks i usna šupljina	40	18	2	Da (PCR)	Ne
Wiseman ¹³⁰	1970-2001	Sva sijela	1648	40	30	Ne	Da
Tan ¹³¹	1986-1993	Sva sijela	59	59 (samo nepušači)	38	Ne	Djelomično
Wey ¹³²	1975-1985	Usna šupljina	109	14 (samo žene)	14 (samo žene)	Ne	Da
Bundgaard ¹³³	1987-1992	Usna šupljina	161	23	23	Ne	Djelomično
Agudelo ¹³⁴	1984-1993	Larinks	933	31	0	Ne	Da
Koch ¹³⁵	1992-1998	Sva sijela	305	46 (samo nepušači)	Nepoznato	Da (PCR)	Djelomično
Fouret ¹³⁶	1989-1995	Sva sijela	187	10 (samo nepušači)	Nepoznato	Da (PCR)	Ne

* recidivi, drugi primarni tumori, preživljenje

2. HIPOTEZA

Povećana prisutnost visokorizičnih tipova HPV-a, poglavito tipova 16 i 18, u tumorskim stanicama karcinoma usne šupljine kod bolesnika koji u anamnezi nemaju tipičnih rizičnih čimbenika, dakle ne konzumiraju alkohol i ne puše cigarete, ukazuje na moguću povezanost HPV-a i karcinoma usne šupljine kod nerizične populacije.

3. CILJEVI RADA

Primarni cilj istraživanja je utvrditi kolika je učestalost visokorizičnih tipova HPV-a, poglavito tipova 16 i 18, u stanicama karcinoma usne šupljine kod bolesnika koji nemaju tipičnih rizičnih čimbenika (alkohol i pušenje).

Specifični ciljevi ovog istraživanja:

1. Odrediti eventualni utjecaj visokorizičnog HPV-a i ekspresije proteina p16INK4a na prognozu karcinoma usne šupljine.
2. Definirati demografski nerizičnu populaciju s obzirom na dob i spol.
3. Utvrditi anatomske lokalizacije u usnoj šupljini koje su najčešće zahvaćene kod nerizične populacije.
4. Odrediti biološko ponašanje karcinoma usne šupljine kod nerizične populacije (stadij, preživljenje, recidivi, drugi primarni tumori).
5. Utvrditi prosječnu količinu i vrstu alkohola koju konzumira tipičan bolesnik s karcinomom usne šupljine, te utvrditi kolika je u prosjeku ukupna ekspozicija pušenju tipičnog bolesnika s karcinomom usne šupljine.

4. ISPITANICI I METODE

4.1 Ispitanici

Istraživanje je bilo retrospektivno i uključilo je sve bolesnike s planocelularnim karcinomom u usnoj šupljini koji su se primarno kirurški liječili na Klinici za kirurgiju lica, čeljusti i usta, Kliničke bolnice Dubrava od 1995. do 2010. godine. Od ukupnog broja bolesnika, uvidom u onkološke kartone i bolesničke anamneze, izdvojili smo one koji u anamnezi nemaju tipičnih rizičnih čimbenika za karcinom usne šupljine, odnosno one koji su nepušači i nisu konzumirali alkohol. Među nepušače su svrstani oni koji nisu nikada pušili ili oni koji su pušili manje od 10 kutija na godinu (engl. *pack/years*, kutija na godinu = broj cigareta dnevno x godina/20). Među nekonzumente alkohola su svrstani oni koji nisu nikada svakodnevno konzumirali alkohol ili su ga konzumirali povremeno (npr. dva do tri puta tjedno). Već svakodnevna konzumacija jednog alkoholnog pića (2 dl vina ili 3 dl piva ili 0,1 dl žestokog) ima za posljedicu dvostruko veći rizik za nastanak karcinoma usne šupljine.¹³⁸

Uvidom u kompjutersku kliničku bazu podataka "tum2", koja se na Klinici za kirurgiju lica, čeljusti i usta vodi od 1988., i prije spomenute onkološke kartone, ispitanike smo podijelili u dvije skupine:

1. nerizična skupina – bolesnici koji imaju karcinom usne šupljine, a nisu pušili niti konzumirali alkohol prema navedenim kriterijima, te
2. kontrolna skupina – bolesnici koji imaju karcinom usne šupljine te su pušili više od 10 kutija na godinu i/ili svakodnevno konzumirali alkohol.

Analizom snage testa za χ^2 test (snaga testa od 80%, razina značajnosti alfa od 0,05, i očekivana razlika u učestalosti HPV ekspresije od 20%) ukupni uzorak bi trebao uključivati najmanje 124 bolesnika, odnosno ispitivana skupina nerizičnih bolesnika bi trebala imati najmanje 62 bolesnika (G*Power for Windows, verzija 3.1.2).

S obzirom da je broj bolesnika s tipičnim čimbenicima rizika znatno veći od onih koji nemaju rizične čimbenike, kontrolna skupina se odabrala randomizacijom iz ukupnog broja bolesnika s karcinomom usne šupljine i prisutnim čimbenicima rizika.

Randomizacijom se odabrao isti broj ispitanika kao i u nerizičnoj skupini. Randomizacija se provela uz pomoć statističkog programa MedCalc for Windows, verzija 11.3 (www.medcalc.be).

4.2 Metode

Na Zavodu za patologiju Kliničke bolnice Dubrava je za svakog pojedinog sudionika ovog istraživanja izvađeno iz bolničke arhive stakalce s tumorskim materijalom (tumor tkivo koje je dobiveno kirurškom resekcijom, ukoliko je to bilo moguće, ili biopsijom u protivnom), a zatim je prema pojedinom reprezentativnom stakalcu, koje sadrži najviše tumorske mase, nađena odgovarajuća parafinska kocka koja sadrži isti takav tumorski materijal.

U obje skupine ispitanika se provelo dokazivanje prisutnosti HPV-a iz parafinskih kocki. Prisutnost HPV-a se ispitala s dvije različite metode, indirektno imunohistokemijski na p16INK4a i direktno PCR metodom na prisutnost HPV DNA te potom genotipizacija visokorizičnih tipova HPV-a.

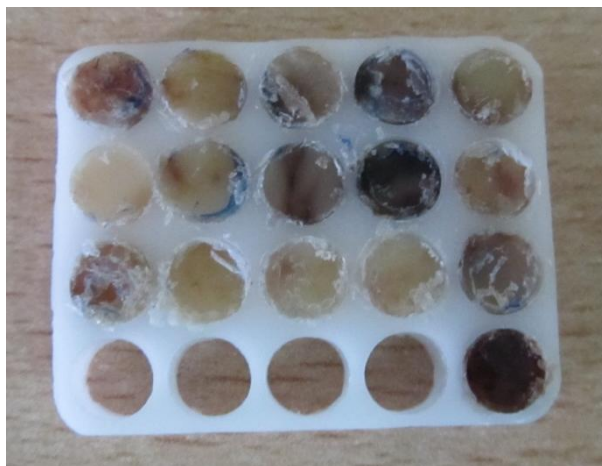
4.2.1 p16INK4a imunohistokemijsko ispitivanje

Prije samog imunohistokemijskog ispitivanja, iz parafinskih blokova ispitanika se korištenjem tissue microarray (TMA) tehnike¹³⁹ specijalnom šupljom iglom za uzimanje tkiva (Slika 8) uzeo cilindar ciljano tumorskog tkiva promjera 5 mm iz svakog parafinskog bloka.



Slika 8. Specijalna šuplja igla kojom su se uzimali uzorci od 5 mm za TMA

Ti cilindri tumorskog tkiva su potom stavljeni u specijalne parafinske mrežice (u svaku mrežicu maksimalno stane 20 cilindara) (Slika 9). Iz svake mrežice je potom napravljen jedinstveni parafinski blok koji je sadržavao 15 različitih uzoraka karcinoma usne šupljine te jednu kontrolu potpuno različitog tkiva (jetra ili gušterača).



Slika 9. Popunjena parafinska mrežica za primanje 5 mm cilindara tkiva pomoću koje se radi jedinstveni parafinski blok s 15 različitih uzoraka i jednom neovisnom kontrolom (jetra ili gušterača)

Pripremanje parafinskih blokova TMA tehnikom rađeno je na Zavodu za patologiju KB Merkur. Iz svakog tako pripremljenog parafinskog bloka je potom napravljeno odgovarajuće stakalce koje je korišteno za imunohistokemijsko bojanje. U p16INK4a imunohistokemijskom dokazivanju upotrebljavan je CINtec Histology Kit (mtm laboratories AG, Njemačka) koji koristi mišje monoklonalno protutijelo (klon E6H4) usmjereno na protein p16INK4a. Rezultat se smatrao pozitivnim ako se pokaže difuzni uzorak bojanja (engl. *diffuse staining pattern*), tj. kontinuirano bojanje stanica bazalnog i parabazalnog sloja, s ili bez bojanja površinskog sloja stanica. Fokalni uzorak bojanja (engl. *focal staining pattern*), tj. bojanje izoliranih ili manjih nakupina stanica, a pogotovo nebazalnih i parabazalnih slojeva epitela, se smatrao negativnim nalazom.¹⁴⁰ Nadalje odredio se i stupanj pozitivnosti na p16INK4a: 0-25% pozitivnih stanica +, 25-50% pozitivnih stanica ++, >50% pozitivnih stanica +++.

Imunohistokemijsko bojanje se vršilo na Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu.

4.2.2 Izolacija DNA

Za izolaciju DNA iz uzoraka tumora sa svake kocke odrezano je 5-7 rezova debelih 10 μ m i prebačeno u prethodno obilježenu 1,5 ml tubu. DNA je iz rezova izolirana komercijalnim kitom Nucleospin Tissue (Machery-Nagel, Düren, Njemačka) prema uputama proizvođača.

Koncentracija izolirane DNA određena je spektrofotometrijski na uređaju Cecil CE 2040 (Engleska).

Kako bi se utvrdila upotrebljivost izolirane DNA za daljnje PCR analize svaki uzorak bio je analiziran PCR-om na uspješnost amplifikacije humanih beta globin¹⁴¹ i beta aktin¹⁴² gena. Korištene početnice prikazane su u Tablici 3.

Sastavi reakcijskih smjesa i uvjeta reakcije opisani su ranije za beta globin¹⁴¹ i beta aktin.¹⁴²

Tablica 3. Početnice korištene za analizu upotrebljivosti izolirane DNA za daljnje PCR analize

Početnice	Naziv	Slijed nukleotida (5'-3')	Veličina produkta PCR-a (pb)
β -globin	PC04	CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC	268
	GH20	GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC	
β -aktin	β -actin-6999-7018	CCCACTGTGCCCATCTACG	99
	β -actin-7097-7072	AGGATCTTCATGAGGTAGTCAGTCAG	

4.2.3 Detekcija i tipizacija papiloma virusa čovjeka

Za detekciju prisutnosti papiloma virusa čovjeka u uzorcima tumora upotrebljeno je više različitih PCR početnica. Korištene su sljedeće početnice koje prepoznaju više tipova papiloma virusa: PGMY¹⁴³, GP5+/6+¹⁴⁴ i SPF¹⁴⁵ te specifične početnice koje prepoznaju samo određene tipove virusa: 6/11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58.¹⁴⁶ Korištene početnice prikazane su u Tablici 4.

Rezultati svih PCR reakcija vizualizirani su na 2% gelu agaroze. Iznimno rezultati beta aktin i SPF reakcija analizirani su na 3% gelu agaroze zbog male veličine fragmenata.

Kao što je već spomenuto, prvo je izvedena PGMY reakcija s dodanim beta globin početnicama. Nakon amplifikacije 1 µl reakcije korišten je kao supstrat za ugnježdenu (engl. *nested*) GP5+/6+ reakciju kako bi se povećala osjetljivost.

Reakcije na specifične tipove HPV-a rađene su u kombiniranim (engl. *multiplex*) reakcijama pri čemu su spajane početnice za HPV6/11 i HPV 31 te tipove 16, 18 i 33 i naposljetku 45 i 58 dok je tip 52 analiziran u posebnoj reakciji zbog nekompatibilnosti početnica i očekivanih veličina produkta.

Nadalje, primijenjene su SPF početnice koje daju izuzetno kratki amplikon od samo 65 parova baza. Prva reakcija SPF početnica bila je re-umnožena sa SPF početnicama na koje su dodane T7 i SP6 univerzalne početnice što je prethodno opisano.¹⁴⁵ Osim u svrhu pojačavanja signala re-amplifikacija s povećanim početnicama učinjena je kako bi se produkti mogli analizirati određivanjem slijeda nukleotida u cilju utvrđivanja tipa virusa u analiziranom uzorku.

Prije određivanja slijeda nukleotida uzorci pozitivni na SPF PCR reakciju amplificirani su u istim uvjetima u 25 µl reakciji kako bi se povećala količina produkta te su pročišćeni komercijalnim kitom za pročišćavanje PCR produkata Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, USA). Ukoliko su u PCR reakciji postojali amplikoni različitih veličina, reakcijska smjesa je nanosena na 0.5% gel agaroze te je fragment od interesa izrezan iz gela i pročišćen istim kitom.

Tablica 4. Početnice korištene za detekciju prisutnosti papiloma virusa čovjeka u uzorcima tumora

Početnice	Naziv	Slijed nukleotida (5'-3')	Genomska regija	Veličina produkta PCR-a (pb)
HPV	PGMY11	GCM CAG GGW CAT AAYAAT GG*	L1	≈ 450
	PGMY09	CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC*		
	GP5+	TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC	L1	≈150
	GP6+	GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATTC		
	SP1A	GCICAGGGICACAATAATGG	L1	≈65
	SP1B	GCICAGGGICATAACAATGG		
	SP1C	GCICAGGGICATAATAATGG		
	SP1D	GCICAAGGGICATAATAATGG		
	SP2B	GTIGTATCIACAACAGTAACAAA		
	SP2D	GTIGTATCIACTACAGTAACAAA		
	SP2J	GTGGTATCCACAACIGTGACAAA		
	SP2K	GTAGTITCCACAACAGTAAGAAA		
	SP2M	GTIGTATCTACAACIGTTAAAAA		
SP2P	GTAGTATCAACACAGGTAATAAA			
HPV 6/11	6/11-U	TAC ACT GCT GGA CAA CAT GC	E6/7	301
	6/11-N	GTG CGC AGA TGG GAC ACA C		
HPV 16	16-U	CCC AGC TGT AAT CAT GCA TGG AGA	E6/7	253
	16-N	GTG TGC CCA TTA ACA GGT CTT CCA		
HPV 18	18-U	CGA CAG GAA CGA CTC CAA CGA	E6/7	201
	18-N	GCT GGT AAA TGT TGA TGA TTA ACT		
HPV 31	31-U	ATG GTG ATG TAC ACA ACA CC	E2/E4	514
	31-N	GTA GTT GCA GGA CAA CTG AC		
HPV 33	33-U	ATG ATA GAT GAT GTA ACG CC	E1	455
	33-N	GCA CAC TCC ATG CGT ATC AG	E2	
Univerzalne	T7	TAATACGACTCACTATAGG		≈100
	SP6	ATTTAGGTGACACTATAG		

Pet mikrolitara pročišćenog PCR produkta pomiješano je s 5 mikrolitara početnica (koncentracije 5 μ M) T7 u jednoj reakciji i SP6 u drugoj reakciji kako bi se odredili sljedovi nukleotida u oba smjera. Određivanje slijeda rađeno je u Macrogen servisu za sekvenciranje (Macrogen Europe, Amsterdam, The Netherlands).

Za vizualizaciju rezultata sekvenciranja te analizu dobivenih sekvenci korišten je BioEdit programski paket (Verzija 7.05.2. dostupno na <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>).

Pojedini tipovi određeni su usporedbom dobivenih nukleinskih sljedova iz oba smjera istog uzorka s poznatim sljedovima DNA pojedinih tipova.¹⁴⁷

Molekularne analize su se vršile na Zavodu za molekularnu medicinu, Institut „Ruđer Bošković“.

4.2.4 Statističke metode

Između dvije skupine bolesnika usporedio se HPV status (p16INK4a imunohistokemija i genotipizacija), demografska obilježja, stadij bolesti, lokalizacije tumora u usnoj šupljini, preživljenje, pojava recidiva i drugih primarnih tumora. Za kontrolnu skupinu se odredilo i koliko su, kroz koje vrijeme i koju vrstu alkohola konzumirali. Isto tako odredilo se kolika je ukupna ekspozicijska doza pušenju izraženo u kutija na godinu (engl. *pack/years*).

Dobiveni podaci su prikazani tablično i grafički. Napravila se deskriptivna statistika s odgovarajućim mjerama centralne tendencije za kvantitativne varijable (aritmetička sredina i standardne devijacije, odnosno medijani i interkvartilni rasponi) dok su se kategorijske varijable prikazale frekvencijama i prevalencijom. Normalnost raspodjele se provjerila Smirnov-Kolmogorovljevim testom te su se shodno dobivenim rezultatima primijenili odgovarajući parametrijski, odnosno neparametrijski testovi. Razlike kvantitativnih vrijednosti između ispitivane i kontrolne skupine su se analizirale nezavisnim t-testom, odnosno neparametrijskim Mann-Whitney U testom. Kategorijske i kvalitativne varijable su se analizirale χ^2 testom razlike distribucija. Preživljenje se prikazalo Kaplan-Meierovom krivuljom i Coxovom regresijskom analizom. Sve p vrijednosti ispod 0,05 su se smatrale značajnima. U analizi se koristila programska podrška STATISTICA 9.1 (www.statsoft.com) i MedCalc for Windows verzija 11.3 (www.medcalc.be).

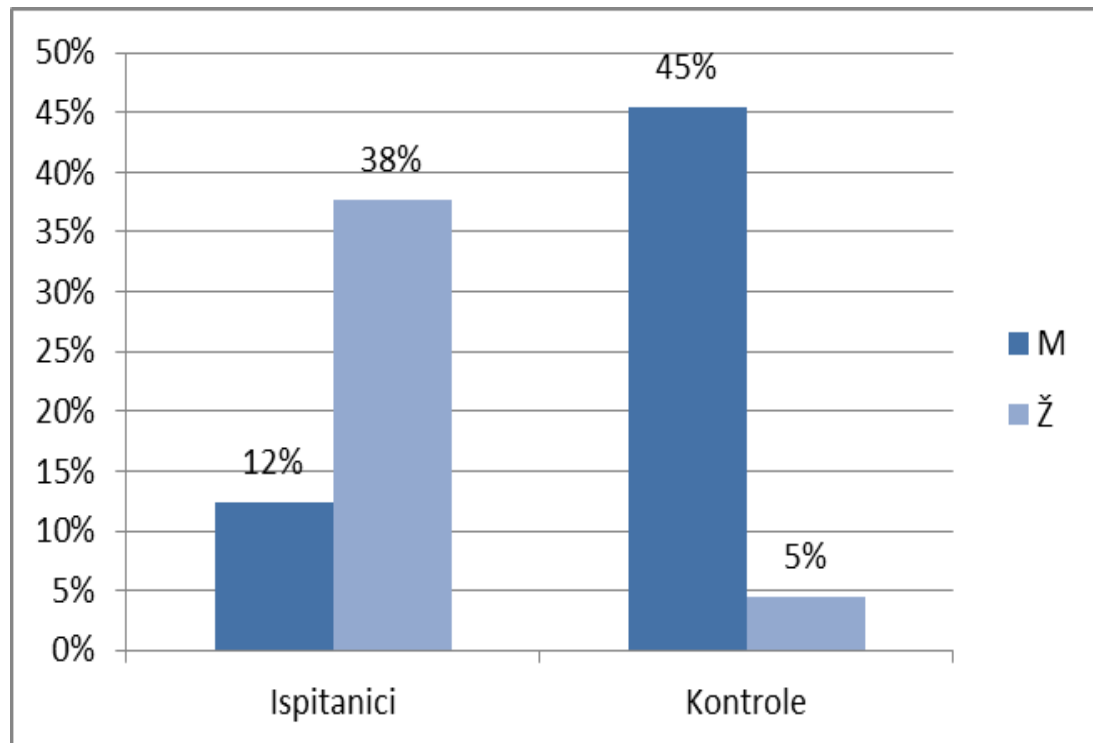
5. REZULTATI

U kliničkoj onkološkoj bazi podataka nađeno je ukupno 1392 bolesnika s karcinomom usne šupljine koji su bili primarno liječeni na Klinici za kirurgiju lica čeljusti i usta, Kliničke bolnice Dubrava od 1995. do 2010. godine. Za 318 bolesnika nisu nađeni podaci o navikama tj. konzumaciji alkohola i pušenju. Ili u samim kartonima, ili povijesti bolesti nije bilo adekvatnih podataka o rizičnim navikama te su izbačeni iz studije. Za ukupno 1074 bolesnika su izvađeni podaci iz onkoloških kartona o konzumaciji alkohola i pušenju te su na temelju toga dobivene dvije skupine bolesnika. Nerizičnih bolesnika je bilo 103 (9,59%), a onih s tipičnim rizičnim čimbenicima u anamnezi 971 (90,41%). Od ukupno 103 nerizična bolesnika za njih 77 su se uspjela naći adekvatna stakalca, odnosno parafinske kocke. Razlog nepronalasku 26 stakalaca i/ili parafinskih kocki je tehničke naravi, odnosno korištenje materijala u prijašnjim istraživanjima ili jednostavno nepotpunost bolničke arhive. Nakon što se odredio konačan broj ispitanika randomizacijom je iz skupine od 971 bolesnika određen jednak broj kontrola, odnosno njih 77. Za njih je također na Zavodu za patologiju izvađeno iz arhive prvo stakalce s tumorskim materijalom, a zatim prema njemu i odgovarajuća parafinska kocka. Za pet bolesnika nije bilo moguće naći odgovarajuću parafinsku kocku primarnog tumora koji je bio kirurški reseciran pa je umjesto toga korištena parafinska kocka inicijalne biopsije (svi iz skupine nerizičnih bolesnika).

Ukupno je u studiju bilo uključeno 154 bolesnika s karcinomom u usnoj šupljini koji su bili primarno kirurški liječeni na Klinici za kirurgiju lica, čeljusti i usta, Kliničke bolnice Dubrava. Ukupno je 77 ispitanika bilo bez tipičnih rizičnih čimbenika za karcinom usne šupljine i 77 kontrola koji u anamnezi imaju pušenje i/ili konzumaciju alkohola. Bilo je ukupno 89 muških bolesnika te 65 ženskih. Srednja dob svih ispitanika je bila 60 godina. Najmlađi bolesnik je imao 24, a najstariji 90 godina. Najčešći je bio karcinom jezika (58), zatim sublingvalni (43), retromolarni (16), gingiva mandibule (14), gingiva maksile (12), obrazne sluznice (9) te tvrdog nepca (2). Recidive je razvilo 37 bolesnika (24%) a DPT (drugi primarni tumor) 21 bolesnik (13,6%). Pedeset bolesnika je bilo liječeno samo s intraoralnom ekscizijom. Kod 23 bolesnika je naknadno nakon intraoralne ekscizije napravljena disekcija vrata zbog konverzije vrata, a kod 81 bolesnika je napravljena commando operacija.

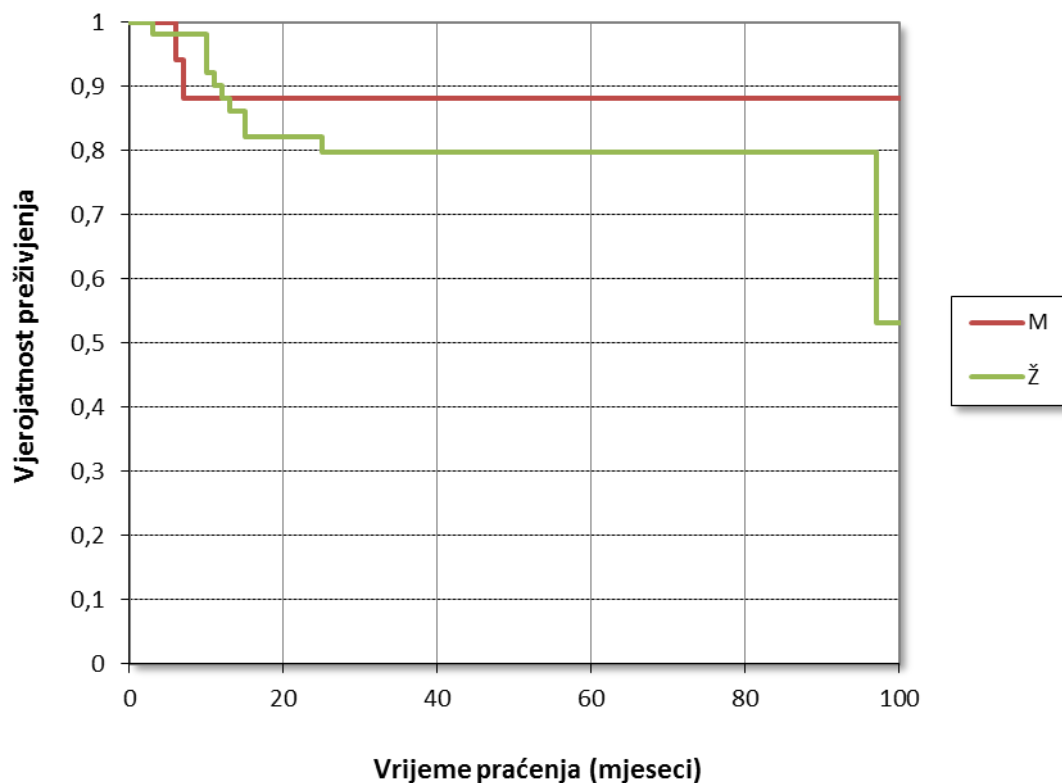
5.1 Rezultati ovisno o rizičnim navikama

U ispitivanoj skupini bolesnika, koji nisu konzumirali alkohol ni pušili, prevladavale su žene (58 prema 19), dok je obrnuta situacija bila među kontrolama gdje su dominirali muškarci (70 prema 7) što zorno prikazuje Grafikon 1. χ^2 testom nađena je statistički značajna razlika u spolnoj distribuciji ($p < 0,0001$).



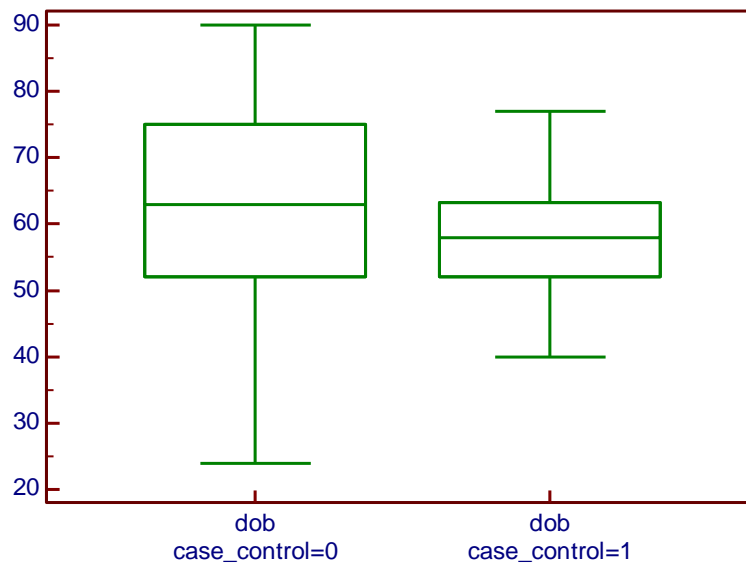
Grafikon 1. Raspodjela po spolu među ispitanicima i kontrolama

Preživljenje s obzirom na spol nije bilo statistički značajno iako su među ispitanicima žene imale lošije preživljenje za skoro 10% (Grafikon 2).



Grafikon 2. Krivulje specifičnog preživljenja po spolu među ispitanicima (M muški, Ž žene), Log rank test (Cox mantel) $p=0,5274$

Srednja dob ispitanika bila je 61 godina. Najmlađi bolesnik je imao 24 godine, najstariji 90 godina, a medijan je iznosio 63 godine. Među kontrolama srednja dob je bila 58 godina, najmlađi bolesnik je imao 40, najstariji 77 godina, a medijan 58 godina. Razliku u rasponu dobi između dvije skupine bolesnika prikazuje Grafikon 3.



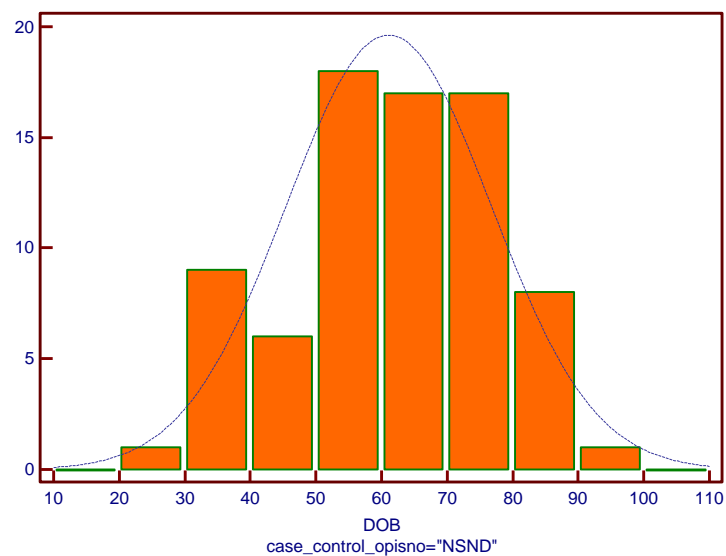
Grafikon 3. Raspon dobi između ispitanika (case control 0) i kontrola (case control 1)

Raspodjela ispitanika i kontrola po dobnim skupinama prikazana je u Tablici 5. Iako se brojčano dosta razlikuju Mann Whitneyevim testom nije nađeno statistički značajne razlike ($p=0,4330$).

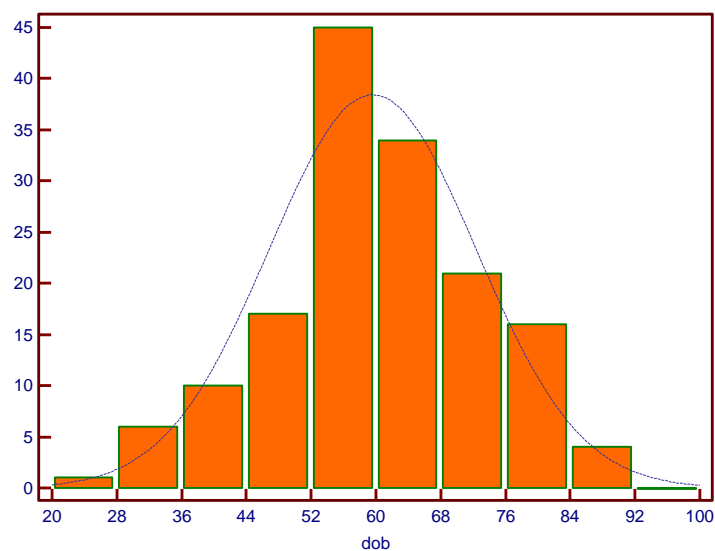
Tablica 5. Raspodjela ispitanika i kontrola po dobnim skupinama

Dobne skupine	Ispitanici	Kontrole
<45	14 (18%)	4 (5%)
45-69	37 (48%)	61 (79%)
>70	26 (34%)	12 (16%)
Ukupno	77 (100%)	77 (100%)

Normalnost raspodjele po dobi je ispitana i Smirnov-Kolmogorovljevim testom za ispitanike i kontrole (Grafikon 4 i 5). Obje skupine su slijedile normalnu raspodjelu po dobi iako su kod ispitanika krajevi krivulje nešto viši nego kod kontrola.



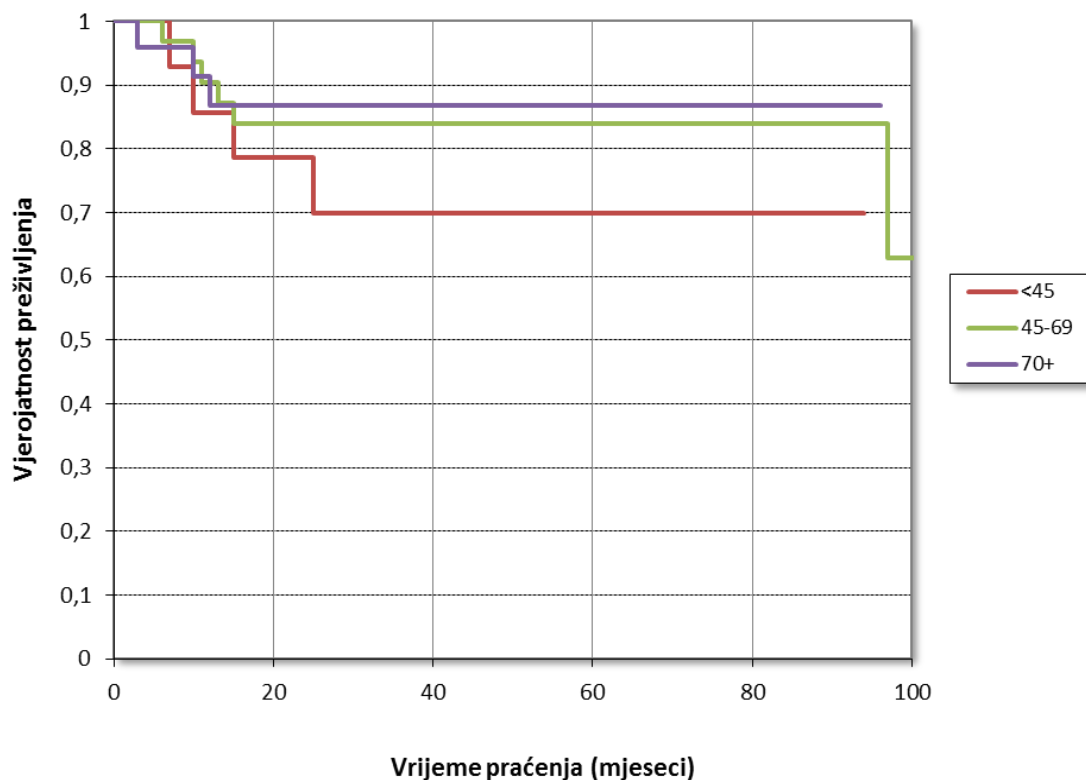
Grafikon 4. Smirnov Kolmogorovljev test po dobi za ispitanike, $p=0,6759$



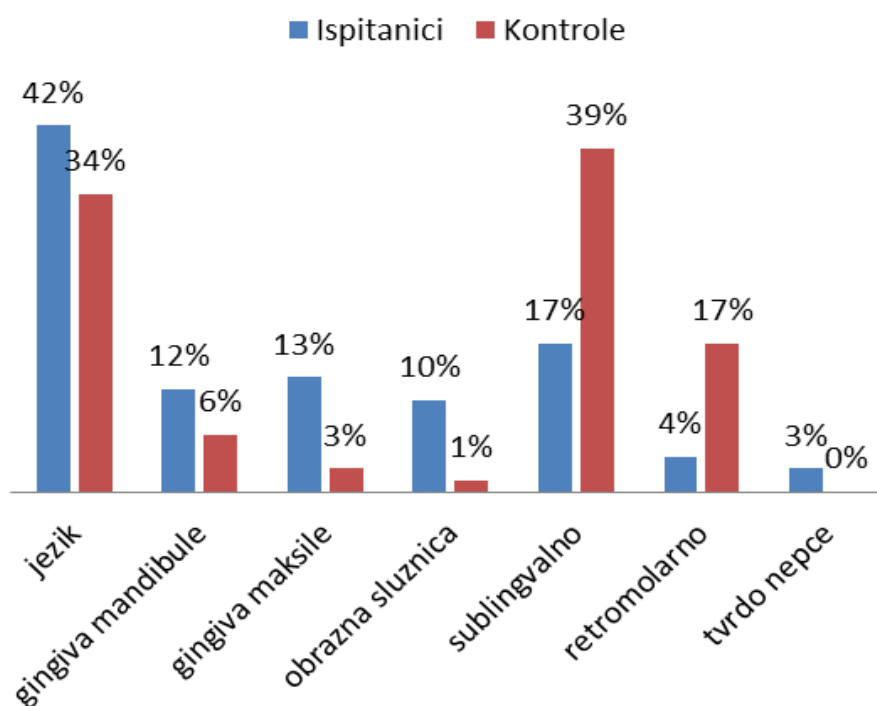
Grafikon 5. Smirnov Kolmogorovljev test po dobi za kontrole, $p=0,5038$

U preživljenju po dobnim skupinama nije nađena statistički značajna razlika iako je kod ispitanika u mlađoj skupini preživljenje lošije za više od 10% (Grafikon 6).

Anatomska raspodjela tumora u usnoj šupljini po postocima među ispitanicima i kontrolama prikazana je na Grafikonu 7.



Grafikon 6. Krivulje specifičnog preživljenja po dobnim skupinama među ispitanicima, Log rank test (Cox mantel) $p=0,5274$



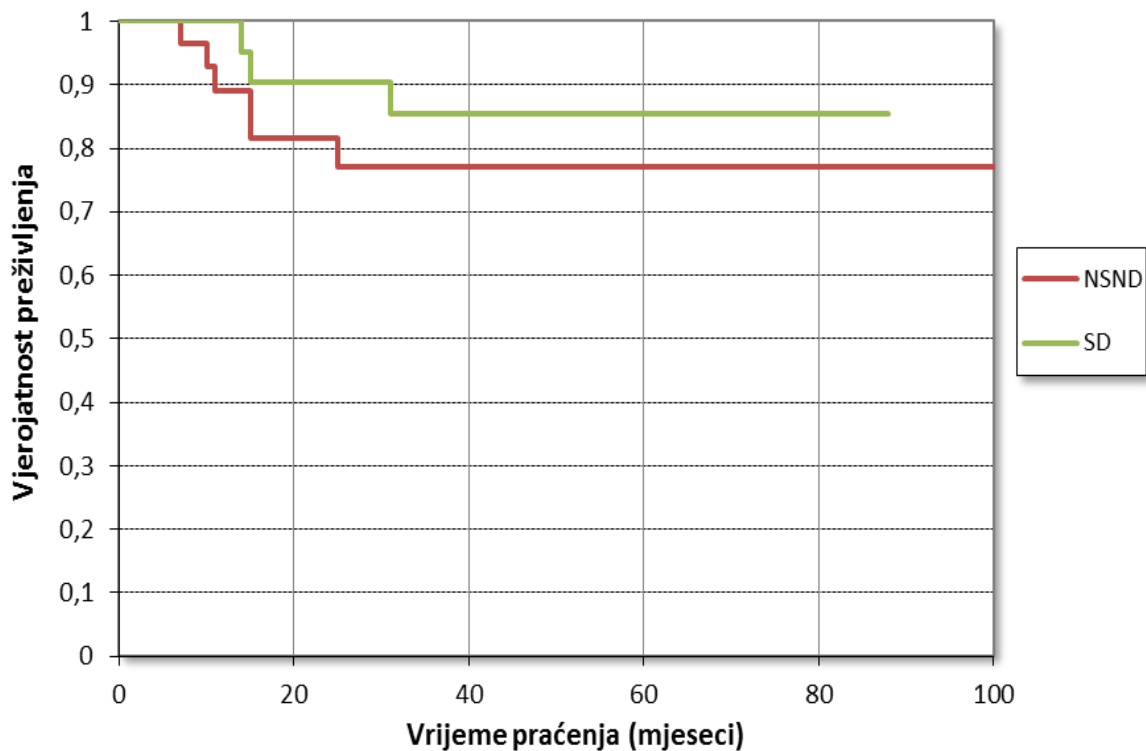
Grafikon 7. Grafička raspodjela tumora prema anatomskoj lokaciji u usnoj šupljini

Postojala je statistički značajna razlika u sijelima tumora između ispitanika i kontrola (Tablica 6), ispitanici su imali najčešće karcinome jezika, karcinome gingive mandibule i maksile te sublingvalno, a kontrole sublingvalne karcinome, karcinome jezika te retromolarno.

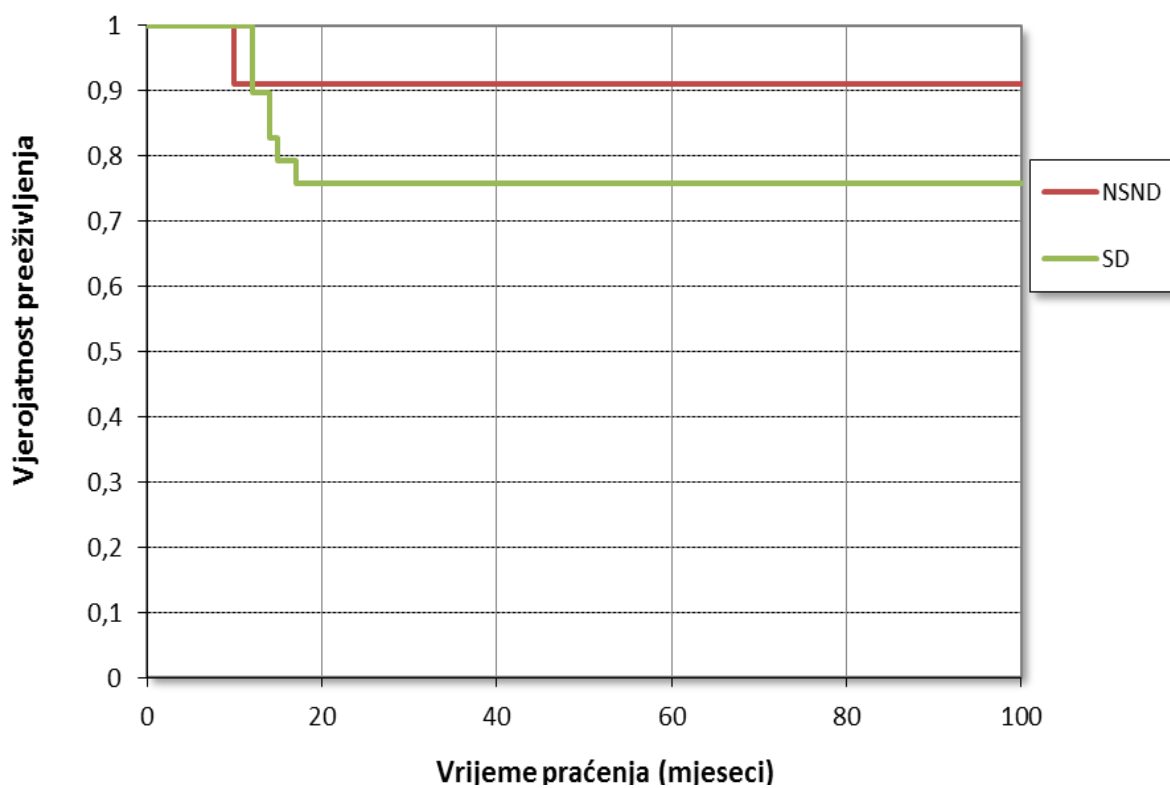
Tablica 6. Brojčana raspodjela tumora po anatomskim lokacijama i statistička značajnost između ispitanika i kontrola

Lokalizacija	Ispitanici	Kontrole	Statistička značajnost p
Jezik	32 (42%)	26 (34%)	p=0,4057
Sublingvalno	13 (17%)	30 (39%)	p<0,0001
Retromolarno	3 (4%)	13 (17%)	p=0,0175
Gingiva mandibule	9 (12%)	5 (6%)	p=0,4004
Gingiva maksile	10 (13%)	2 (3%)	p=0,0353
Obrazna sluznica	8 (10%)	1 (1%)	p=0,0393
Tvrdo nepce	2 (3%)	0 (0%)	p=0,4766

Za dva najzastupljenija tumorska sjela izračunate su krivulje preživljenja između ispitanika i kontrola koje se nisu statistički razlikovale (Grafikon 8 i 9).



Grafikon 8. Krivulje specifičnog preživljenja za karcinom jezika između ispitanika (NSND) i kontrola (SD), Log rank test (Cox mantel) $p=0,3867$



Grafikon 9. Krivulje specifičnog preživljenja za sublingvalni karcinom između ispitanika (NSND) i kontrola (SD), Log rank test (Cox mantel) $p=0,3363$

Nije bilo statistički značajne razlike u veličini tumora (T), prisutnosti regionalnih metastaza (N) i stadiju između ispitanika i kontrola (Tablica 7).

Tablica 7. Raspodjela između ispitanika i kontrola po veličini tumora (T), prisutnosti regionalnih metastaza (N) i stadiju i statistička značajnost

	Ispitanici	Kontrole	Statistička značajnost
<i>Veličina tumora T</i>			
T1	11 (14%)	11 (14%)	Mann Whitney test p=0,2854
T2	40 (52%)	33 (43%)	
T3	17 (22%)	18 (23%)	
T4	9 (12%)	15 (19%)	
<i>Regionalne metastaze N</i>			
N0	59 (77%)	53 (69%)	Mann Whitney test p=0,1885
N1	12 (16%)	10 (13%)	
N2	5 (6%)	11 (14%)	
N3	1 (1%)	3 (4%)	
<i>Stadij bolesti</i>			
I	10 (13%)	9 (12%)	Mann Whitney test p=0,1154
II	35 (45%)	30 (39%)	
III	21 (27%)	13 (17%)	
IV	11 (14%)	25 (32%)	

Drugi primarni tumor je razvio ukupno 21 bolesnik (14%) u prosjeku nakon 50 mjeseci praćenja te isto tako nije bilo razlike između ispitanika i kontrolne skupine (Tablica 8).

Tablica 8. Raspodjela i vrsta drugih primarnih tumora (DPT) između ispitanika i kontrola.

DPT	Ispitanici	Kontrole	Statistička značajnost
Obrazna sluznica	5	0	Fischer exact test p=0,603
Tonzila	0	3	
Jezik	1	0	
Gingiva maksile	2	0	
Larinks	0	2	
Jednjak	1	0	
Želudac	1	0	
Bronh	0	1	
Pluća	0	2	
Jetra	1	0	
Pankreas	1	0	
Prostata	0	1	
Ukupno	12 (16%)	9 (12%)	

Recidive je razvilo ukupno 37 bolesnika, a javljali su se u prosjeku nakon 13 mjeseci praćenja. Nije bilo statistički značajne razlike u pojavi recidiva između ispitanika i kontrola (Tablica 9).

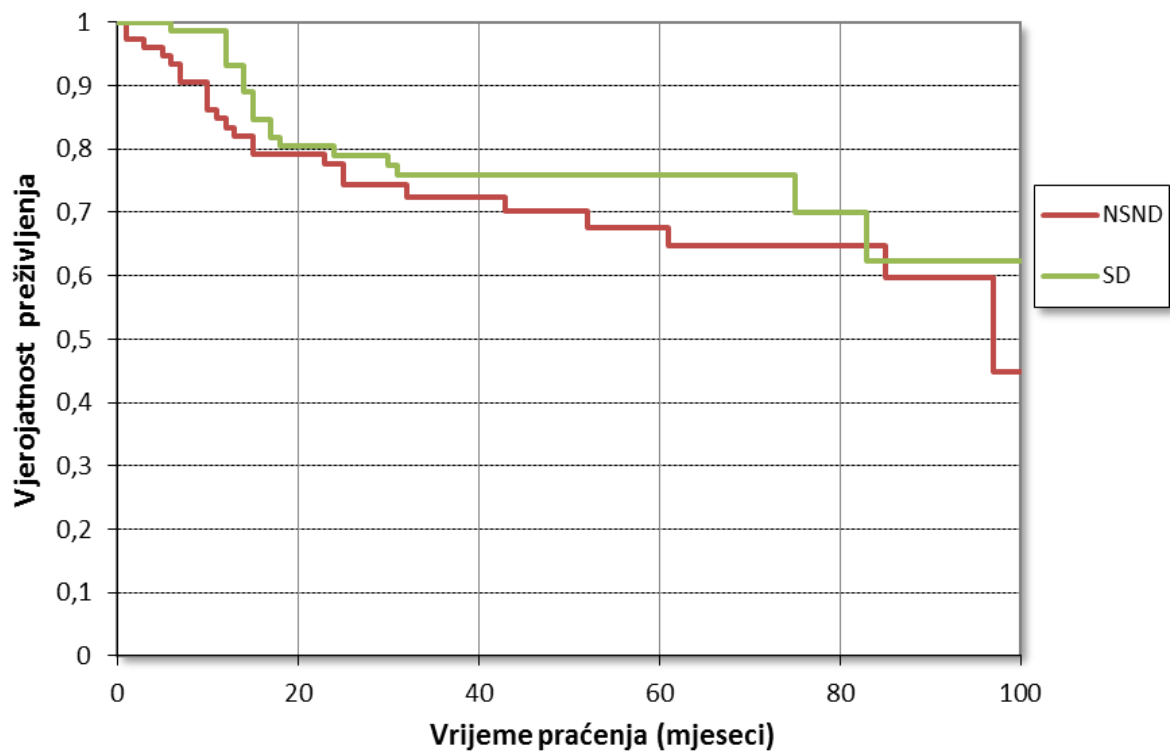
Tablica 9. Raspodjela recidiva između ispitanika i kontrola

Recidiv	Ispitanici	Kontrole	Statistička značajnost
Lokalni	13 (17%)	11 (14%)	Mann Whitney test p=0,9218
Regionalni	5 (6%)	4 (5%)	
Udaljena metastaza	1 (1%)	3 (4%)	
Ukupno	19 (24%)	18 (23%)	

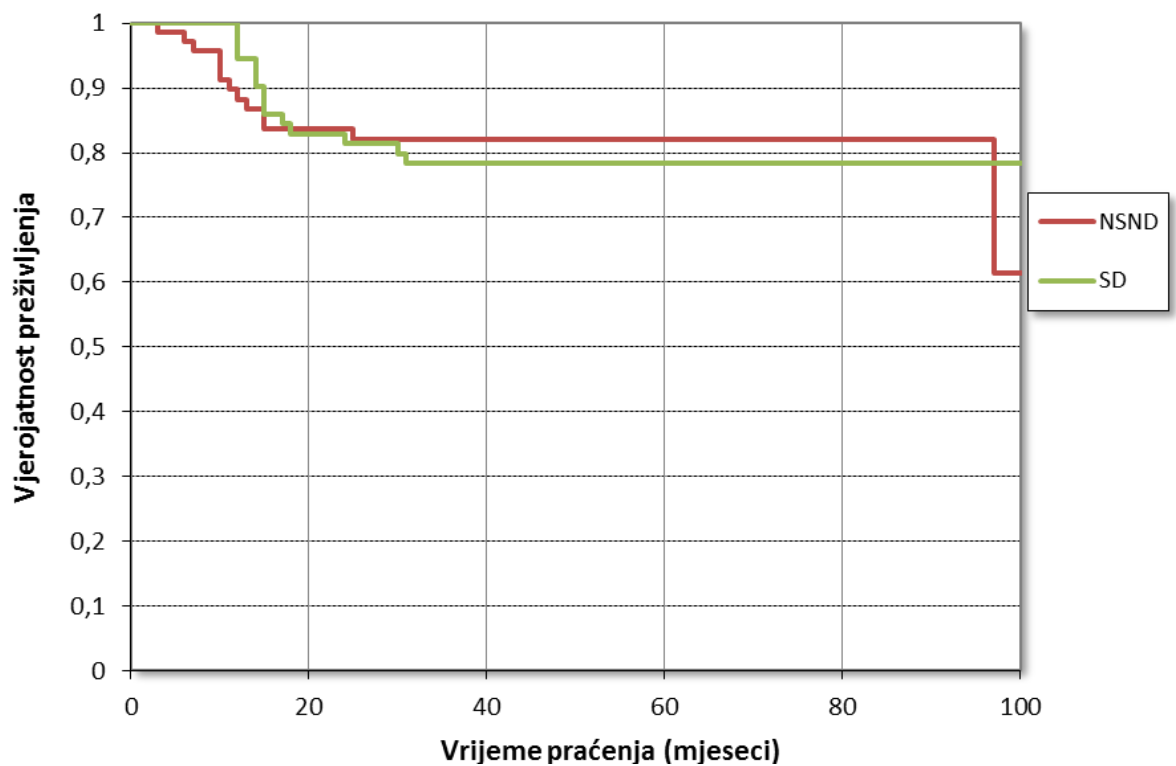
U skupini ispitanika osam bolesnika su bili aktivni pušači, ali ukupna ekspozicija pušenju nije bila veća od 10 kutija na godinu odnosno u prosjeku je bila 8,53 kutija na godinu. Petero bolesnika koji su prestali pušiti, imali su ekspozicijsku dozu veću od 10 kutija na godinu, ali su prestali prije više od 10 godina tako da se učinak pušenja gotovo izjednačio s onim nepušača. Ostala 64 bolesnika nikada nije aktivno pušilo cigarete. Dvanaest ispitanika je povremeno konzumiralo alkoholna pića dok ostalih 65 ispitanika nije konzumiralo alkohol.

U kontrolnoj skupini aktivnih pušača je bilo 57 sa srednjom ekspozicijskom dozom od 45,86 kutija na godinu. Bilo je 18 bivših pušača s ekspozicijskom dozom od 48,16 kutija na godinu. Svega dvoje ispitanika nije nikada aktivno konzumiralo cigarete. Ukupna ekspozicija pušenju u kontrolnoj skupini je 45,21 kutija na godinu. Dvoje ispitanika u kontrolnoj skupini nije konzumiralo alkohol, a njih pet samo povremeno. Svakodnevno je alkohol konzumiralo 70 bolesnika, od čega ih je 9 bilo liječeno zbog alkoholizma. Prosječna konzumacija vina je 0,8 l dnevno, 0,69 l piva dnevno, te prosječno 0,11 l žestokog pića kroz prosječno 33,64 godine.

Između ispitanika i kontrolne skupine nije bilo statistički značajne razlike u sveukupnom preživljenju i specifičnom preživljenju. Krivulje preživljenja prikazane su na Grafikonima 10 i 11.



Grafikon 10. Krivulje sveukupnog preživljenja između ispitanika (NSND) i kontrola (SD), Log rank test (Cox mantel) $p=0,431$



Grafikon 11. Krivulje specifičnog preživljenja između ispitanika (NSND) i kontrola (SD), Log rank test (Cox mantel) $p=0,912$

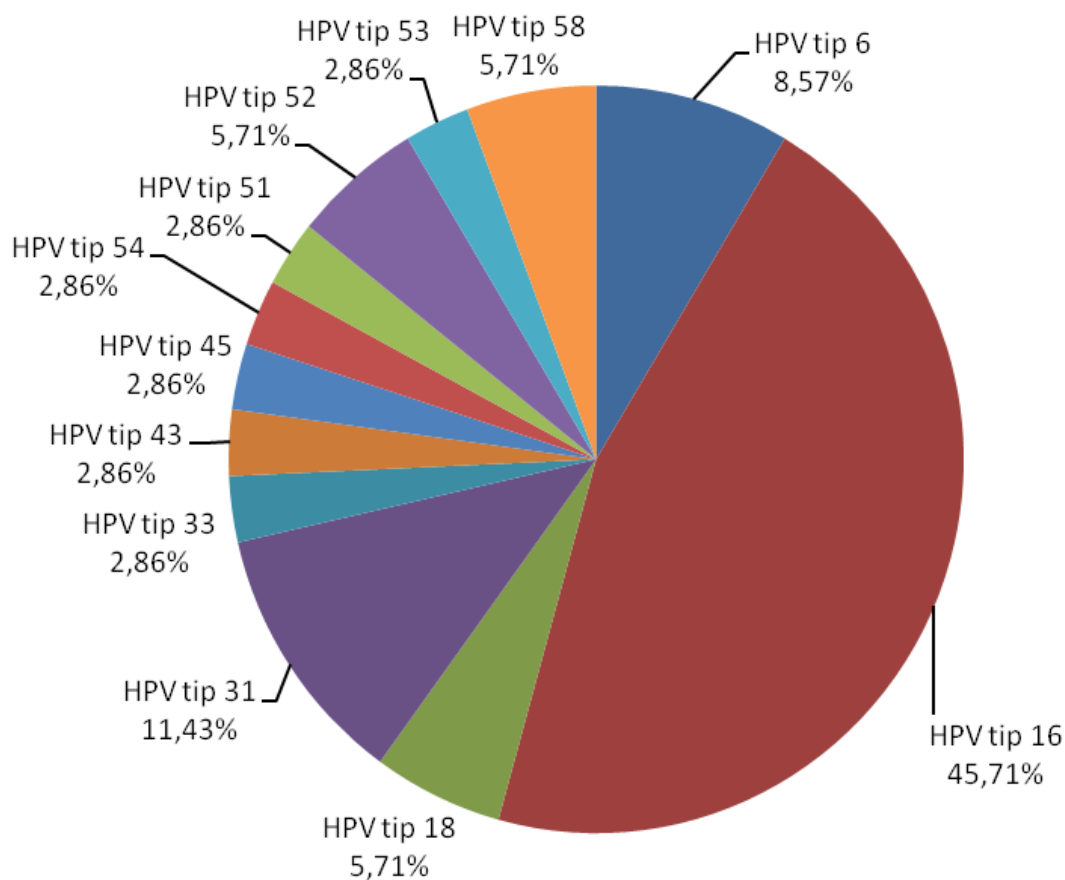
5.2 Rezultati ovisno o HPV PCR statusu

Ukupno je HPV PCR pozitivan bio 41 bolesnik (27%). Češće su HPV pozitivni bile kontrole nego ispitanici, ali ne statistički značajno (Tablica 10).

Tablica 10. Raspodjela između ispitanika i kontrola prema HPV PCR statusu i statistička značajnost

	Ispitanici	Kontrole	Statistička značajnost
HPV+	17 (22%)	24 (31%)	Chi square 1,197 p=0,2740
HPV-	60 (78%)	53 (69%)	

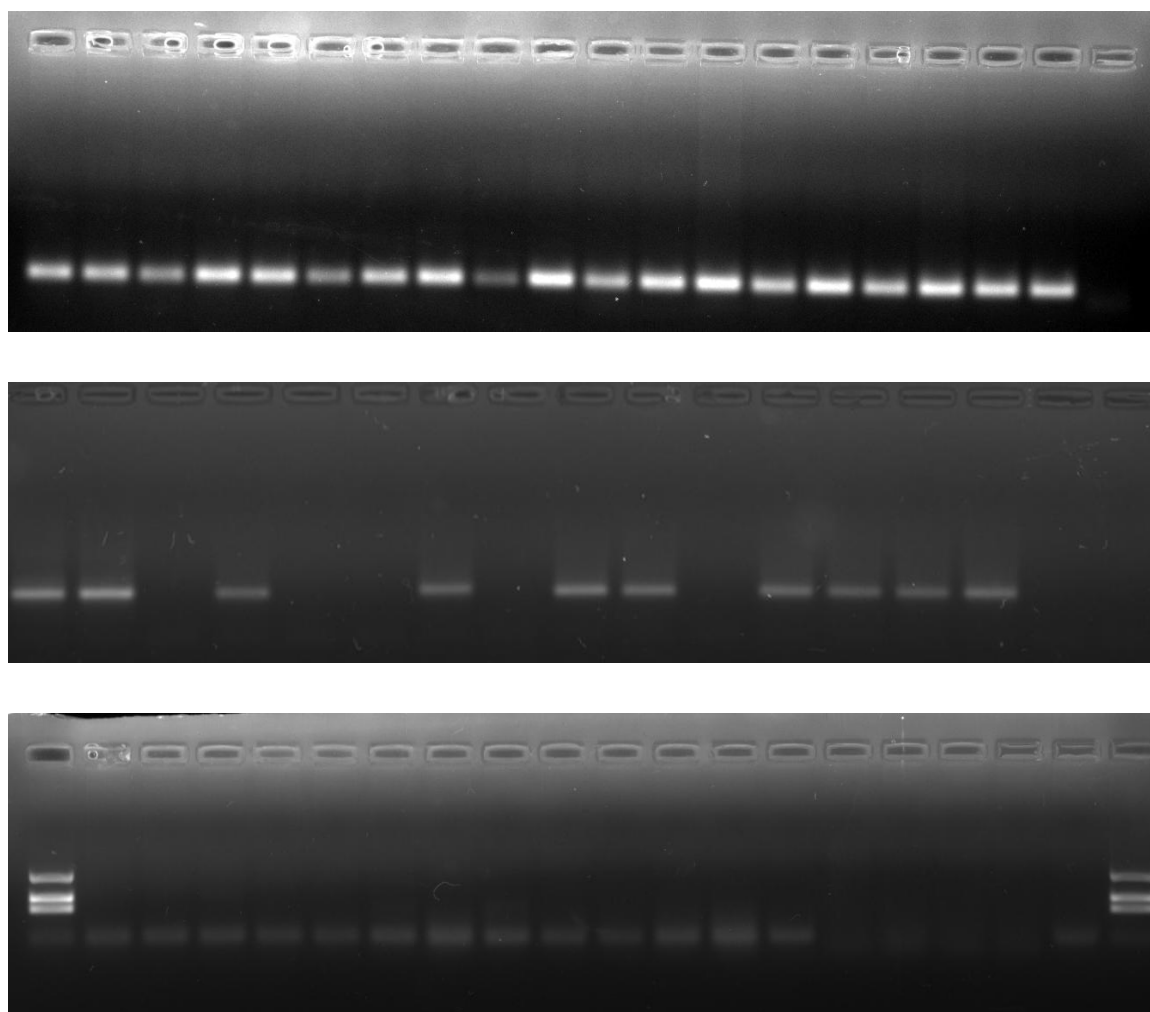
Najčešće je bio izoliran visokorizični HPV tip 16. U deset slučajeva zbog koinfekcije s multiplim tipovima HPV-a nije bilo moguće izolirati pojedine tipove. Grafikon 12 pokazuje raspodjelu detektiranih tipova HPV-a prema genotipu.



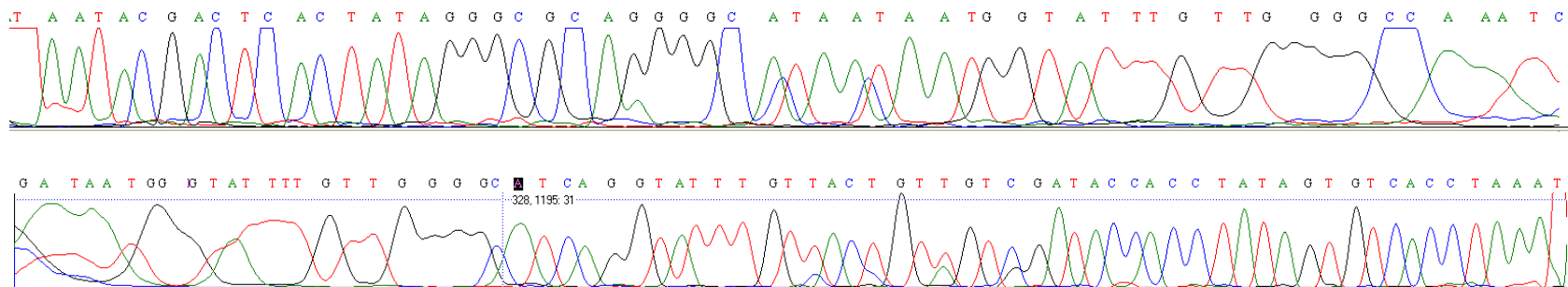
Grafikon 12. Raspodjela detektiranog HPV-a po genotipovima

U četiri slučaja otkrivena je koinfekcija i to HPV tip 16+18, 16+54, 16+58 te 51+58. Češći su bili visokorizični genotipovi (30/35). Od niskorizičnih genotipova bili su prisutni tip 6 u tri uzorka te po jednom tip 43 i 54 (prisutan zajedno s tipom 16).

Slike 10. i 11. pokazuju rezultate PCR metode na agarozu gelu te određivanje genotipa pomoću elektroferograma.

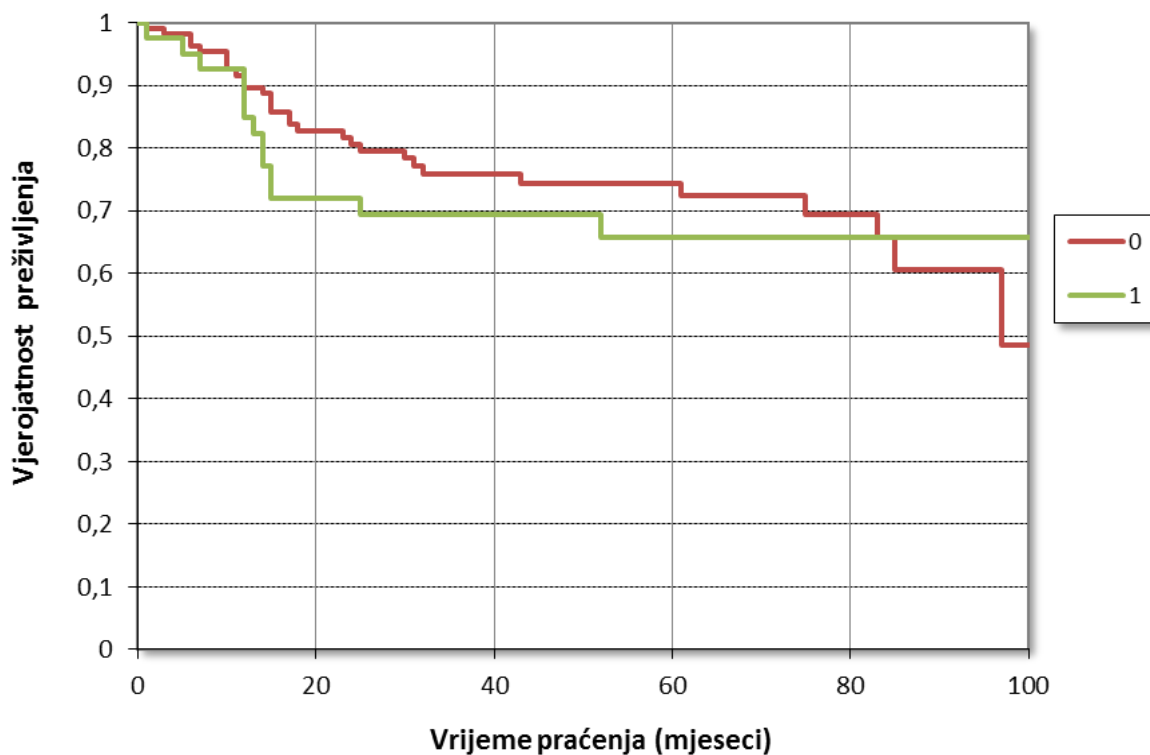


Slika 10. Gelovi agaroze s beta aktin (vrh), SPF+T7/SP6 (sredina) i amplikonima specifičnim za HPV tipove 16, 18 i 33 u kombiniranoj reakciji (dolje).

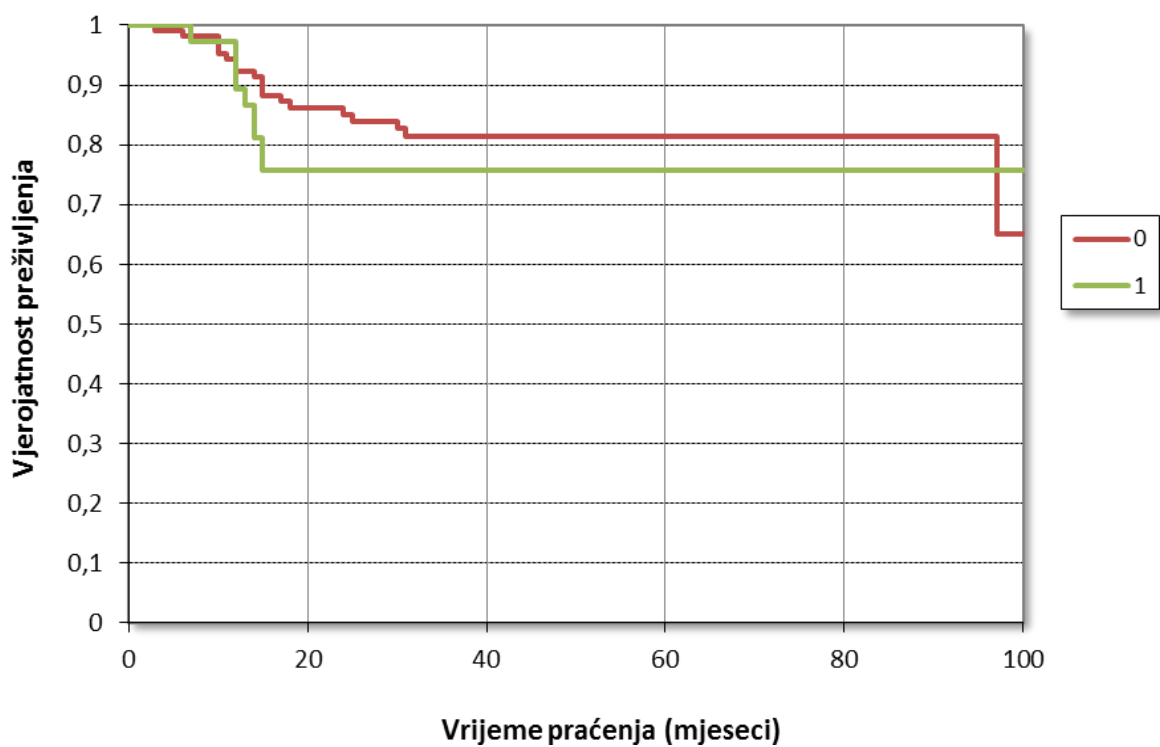


Slika 11. Reprezentativni elektroferogrami za određivanje slijeda nukleotida reakcija u oba smjera za uzorak pozitivan na HPV tipa 33. Uzvodna reakcija prikazana je na gornjoj slici te se vidi nizvodna T7 početnica, degenerirana SPF početnica i dio slijeda nukleotida amplificiranog iz uzorka. Na donjoj slici vidi se elektroferogram nizvodne reakcije s dijelom slijeda koji odgovara uzorku iza kojeg slijede degenerirana uzvodna SPF početnica te uzvodna SP6 početnica. Preklapanjem podataka može se iščitati cjelovit slijed nukleotida uzorka i identificirati prisutan tip HPV-a.

Krivulje sveukupnog i specifičnog preživljenja ovisno o HPV PCR statusu nisu se statistički značajno razlikovale (Grafikoni 13 i 14).



Grafikon 13. Krivulje sveukupnog preživljenja između HPV+ (1) i HPV- (0) bolesnika, Log rank test (Cox mantel) $p=0,379$



Grafikon 14. Krivulje specifičnog preživljenja između HPV+ (1) i HPV- (0) bolesnika, Log rank test (Cox mantel) $p=0,462$

Srednja dob HPV pozitivnih (HPV+) bolesnika je bila 56 godina, a HPV negativnih (HPV-) bolesnika 60 godina. T-testom nije nađeno značajnih razlika, $p=0,1123$. Raspodjela HPV+ i HPV- po dobnim skupinama se također nije značajno razlikovala (Tablica 11).

Tablica 11. Raspodjela HPV pozitivnih i negativnih po dobnim skupinama

Dobna skupina	HPV+	HPV-	Statistička značajnost
<45	6 (15%)	12 (11%)	Mann Whitney test $p=0,3075$
45-69	27 (65%)	71 (62%)	
70+	8 (20%)	30 (27%)	

Muškarci su češće bili HPV pozitivni nego žene (68% prema 32%) (Chi square test $p=0,1601$).

Nije bilo razlike u prevalenciji pojedinih tumorskih lokalizacija s obzirom na HPV pozitivnost ili negativnost (Tablica 12).

Tablica 12. Anatomska podjela tumora prema HPV pozitivnosti i negativnosti

Lokalizacija	HPV+	HPV-	Statistička značajnost
Jezik	15 (37%)	43 (38%)	$p=0,9198$
Gingiva mandibule	4 (10%)	10 (9%)	$p=0,8854$
Gingiva maksile	2 (5%)	10 (9%)	$p=0,6365$
Obrazna sluznica	2 (5%)	7 (6%)	$p=0,9356$
Sublingvalno	14 (34%)	29 (26%)	$p=0,4043$
Retromolarno	3 (7%)	13 (12%)	$p=0,6499$
Tvrdo nepce	1 (2%)	1 (1%)	$p=0,9583$

Statistički značajno su HPV pozitivni bolesnici imali češće regionalne metastaze (N) dok se u veličini primarnog tumora (T) ili stadiju nisu razlikovali od HPV negativnih bolesnika (Tablica 13).

Tablica 13. Raspodjela između HPV+ i HPV- bolesnika po veličini tumora (T), regionalnim metastazama (N), stadiju i statistička značajnost

	HPV+	HPV-	Statistička značajnost
<i>Veličina tumora T</i>			
T1	7 (17%)	15 (13%)	Mann Whitney test p=0,1982
T2	22 (54%)	51 (45%)	
T3	7 (17%)	28 (25%)	
T4	5 (12%)	19 (17%)	
<i>Regionalne metastaze N</i>			
N0	25 (61%)	87 (77%)	Mann Whitney test p=0,0327
N1	7 (17%)	15 (13%)	
N2	6 (15%)	10 (9%)	
N3	3 (7%)	1 (1%)	
<i>Stadij bolesti</i>			
I	5 (12%)	14 (12%)	Mann Whitney test p=0,8115
II	18 (44%)	47 (42%)	
III	6 (15%)	28 (25%)	
IV	12 (29%)	24 (21%)	

HPV pozitivni su nešto češće imali recidive, ali je razlika u recidivima bila na granici statističke značajnosti između HPV+ i HPV- grupe (Tablica 14).

Tablica 14. Recidivi u HPV+ i HPV- skupini

Recidiv	HPV+	HPV-	Statistička značajnost
Lokalni	5 (12%)	19 (17%)	Mann Whitney test p=0,0935
Regionalni	5 (12%)	4 (4%)	
Udaljena metastaza	3 (7%)	1 (1%)	
Ukupno	13 (31%)	24 (22%)	

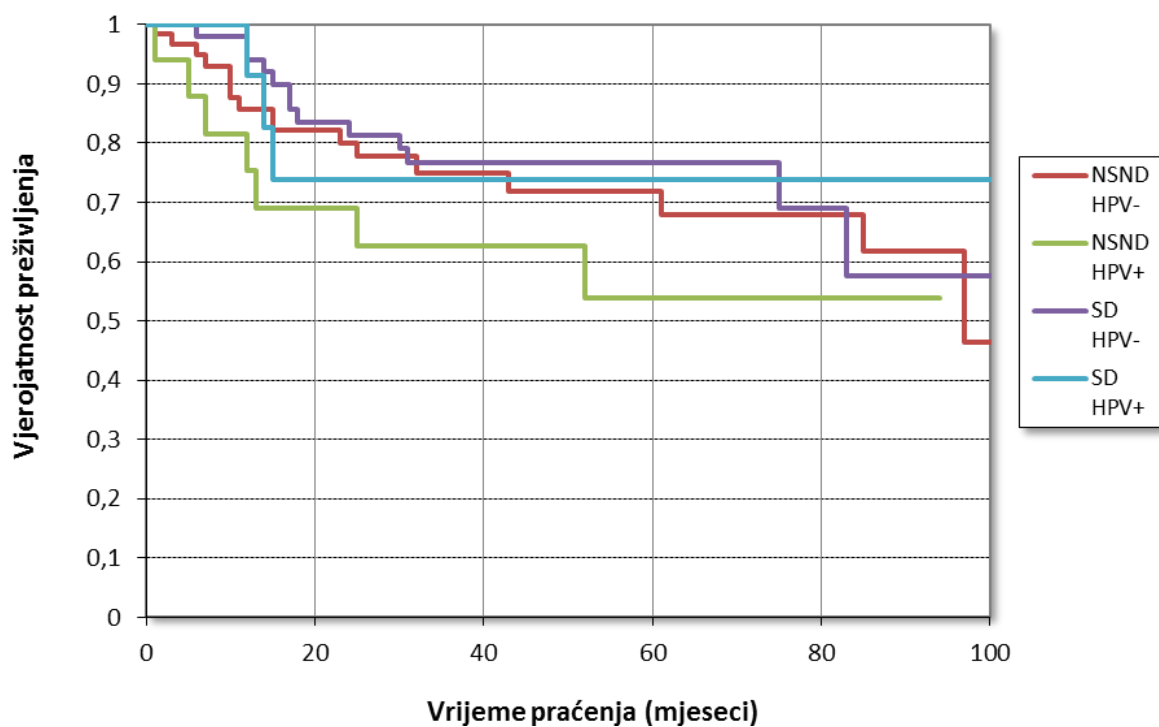
U pojavi drugih primarnih tumora prema HPV statusu nije bilo značajne razlike (Tablica 15).

Tablica 15. Raspodjela DPT-a u HPV+ i HPV- grupi

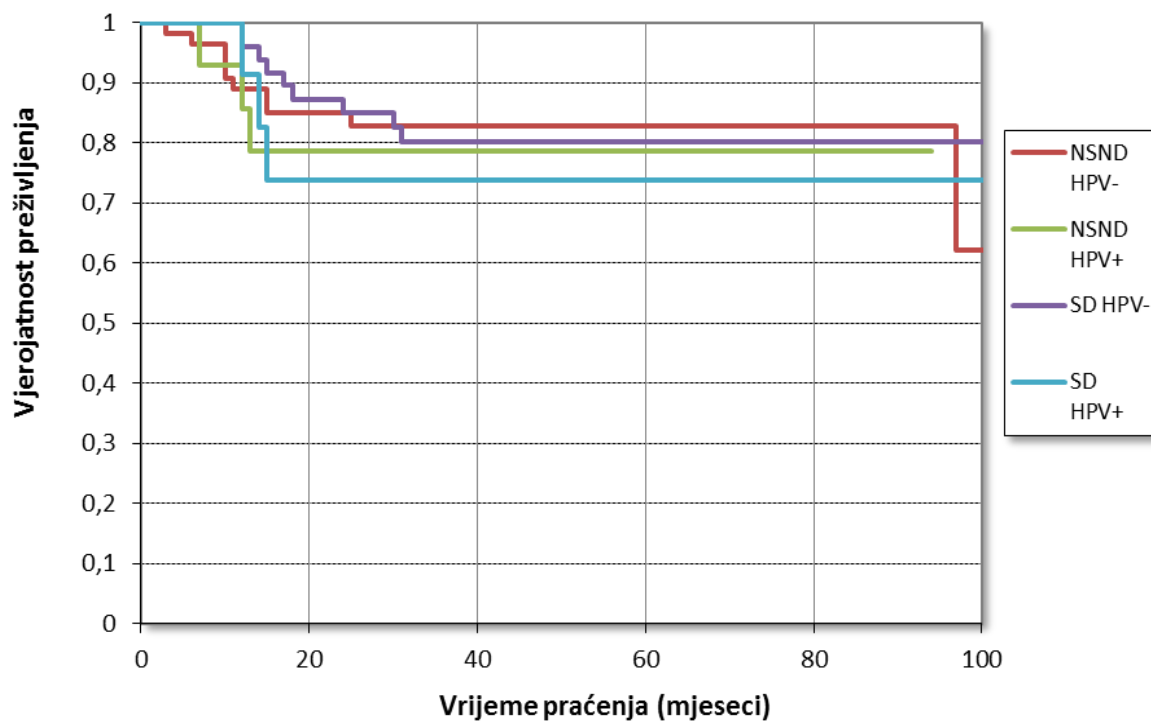
DPT	HPV+	HPV-
Obrazna sluznica	0	5
Tonzila	2	1
Jezik	0	1
Gingiva maksile	0	2
Larinks	0	2
Jednjak	0	1
Želudac	0	1
Bronh	0	1
Pluća	1	1
Jetra	1	0
Pankreas	1	0
Prostata	1	0
Ukupno	6 (15%)	15 (13%)

Nije bilo statistički značajne razlike u postotku pušača, tj. nepušača u HPV+ i HPV- skupini (Mann Whitney test $p=0,1547$). Također nije bilo statistički značajne razlike u postotku onih koji (ne)konzumiraju svakodnevno alkohol u HPV+ i HPV- skupini (Mann Whitney test $p=0,3160$).

Kada se podijele bolesnici po HPV PCR statusu i navikama, dobiju se četiri skupine bolesnika: HPV+ ispitanici, HPV- ispitanici, HPV+ kontrole, HPV- kontrole. Krivulje preživljenja za ove četiri grupe se nisu značajno razlikovale mada postoji tendencija da HPV+ ispitanici imaju najlošije preživljenje, a HPV- ispitanici najbolje (Grafikoni 15 i 16).



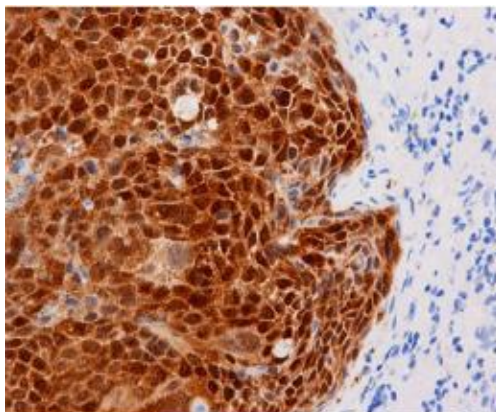
Grafikon 15. Krivulje sveukupnog preživljenja između HPV+ ispitanika, HPV- ispitanika, HPV+ kontrola i HPV- kontrola, Log rank test (Cox mantel) $p=0,532$



Grafikon 16. Krivulje specifičnog preživljenja između HPV+ ispitanika, HPV- ispitanika, HPV+ kontrola i HPV- kontrola, Log rank test (Cox mantel) $p=0,898$

5.3 Rezultati ovisno o p16INK4a ekspresiji

Ukupno je 29 (19%) bolesnika, tj. tumora pokazalo ekspresiju na p16INK4a protein (Slika 12). Od toga je 8 pokazalo slabu ekspresiju (+), 9 umjerenu (++) i 12 jaku (+++). Ispitanici su češće imali povišenu ekspresiju p16INK4a kao i jaču ekspresiju navedenog proteina što je bilo i statistički značajno (Tablice 16 i 17).



Slika 12. Izrazita ekspresija proteina p16INK4a kod karcinoma jezika

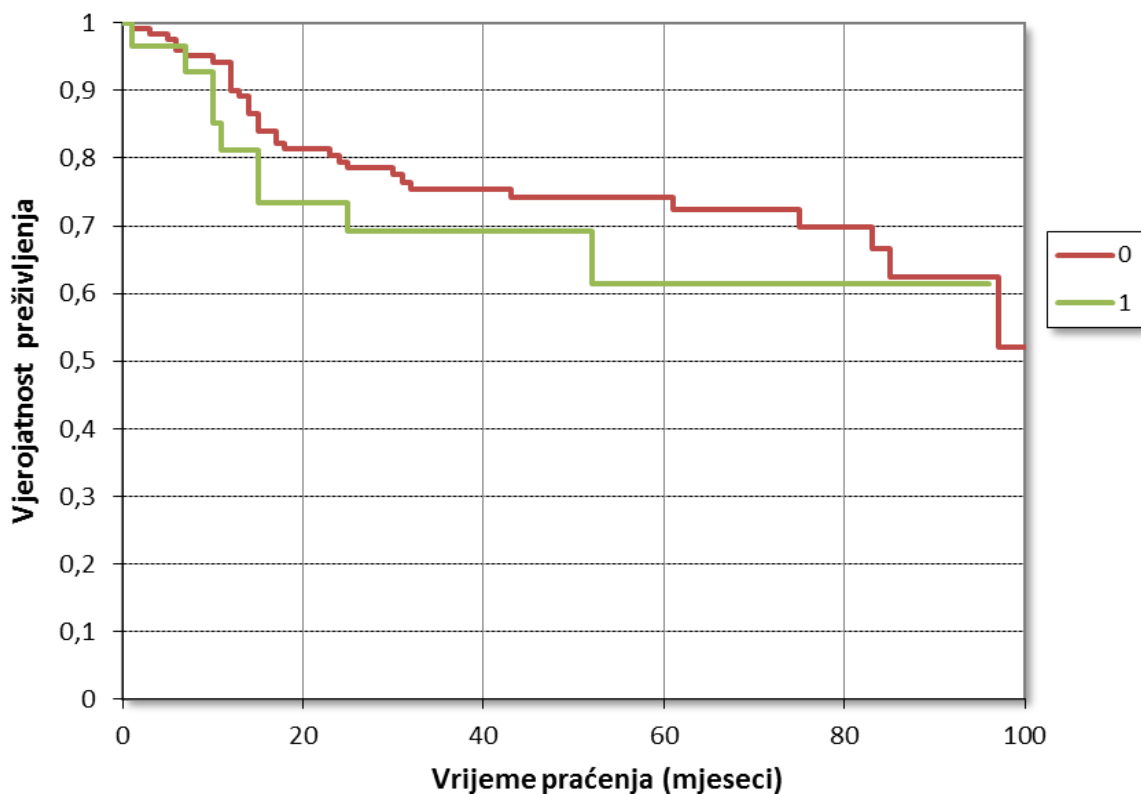
Tablica 16. Raspodjela po p16INK4a statusu između ispitanika i kontrola

	Ispitanici	Kontrole	Statistička značajnost
p16INK4a+	21 (27%)	8 (10%)	Chi square p=0,0134
p16INK4a-	56 (73%)	69 (90%)	

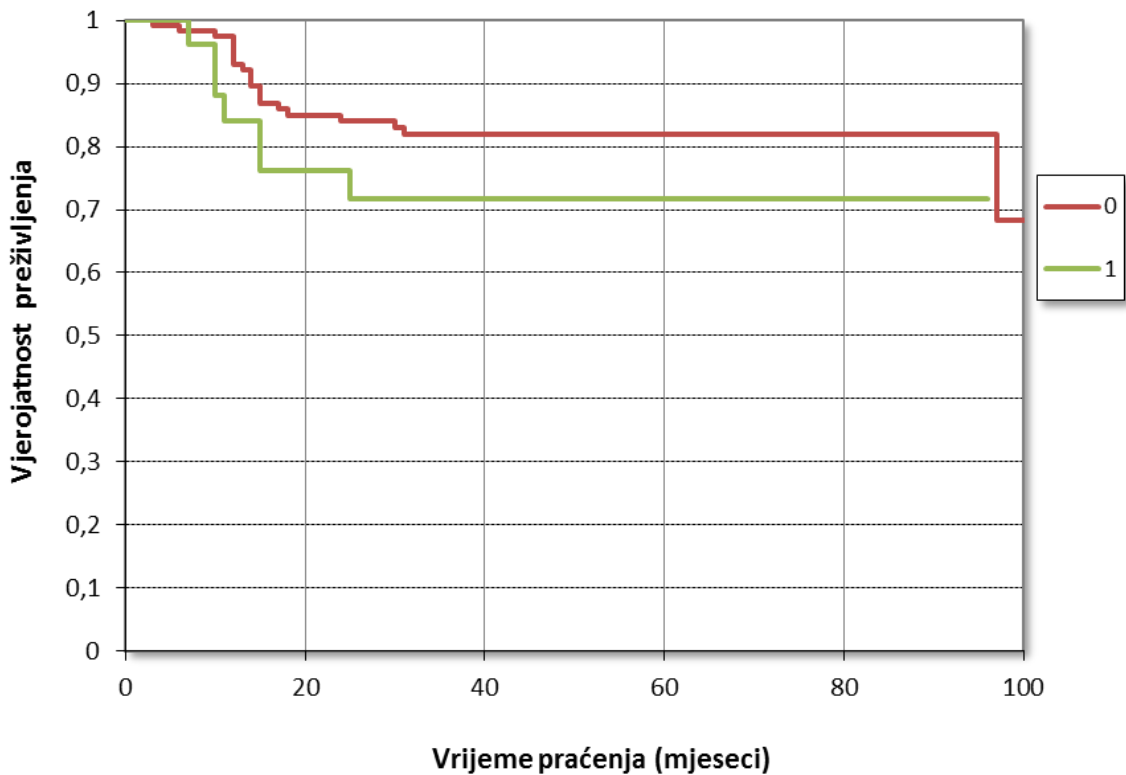
Tablica 17. Raspodjela po jačini ekspresije p16INK4a između ispitanika i kontrola

p16INK4a	Ispitanici	Kontrole	Statistička značajnost
0	56 (73%)	69 (90%)	Mann Whitney test p=0,0064
+	5 (6%)	3 (4%)	
++	6 (8%)	3 (4%)	
+++	10 (13%)	2 (3%)	

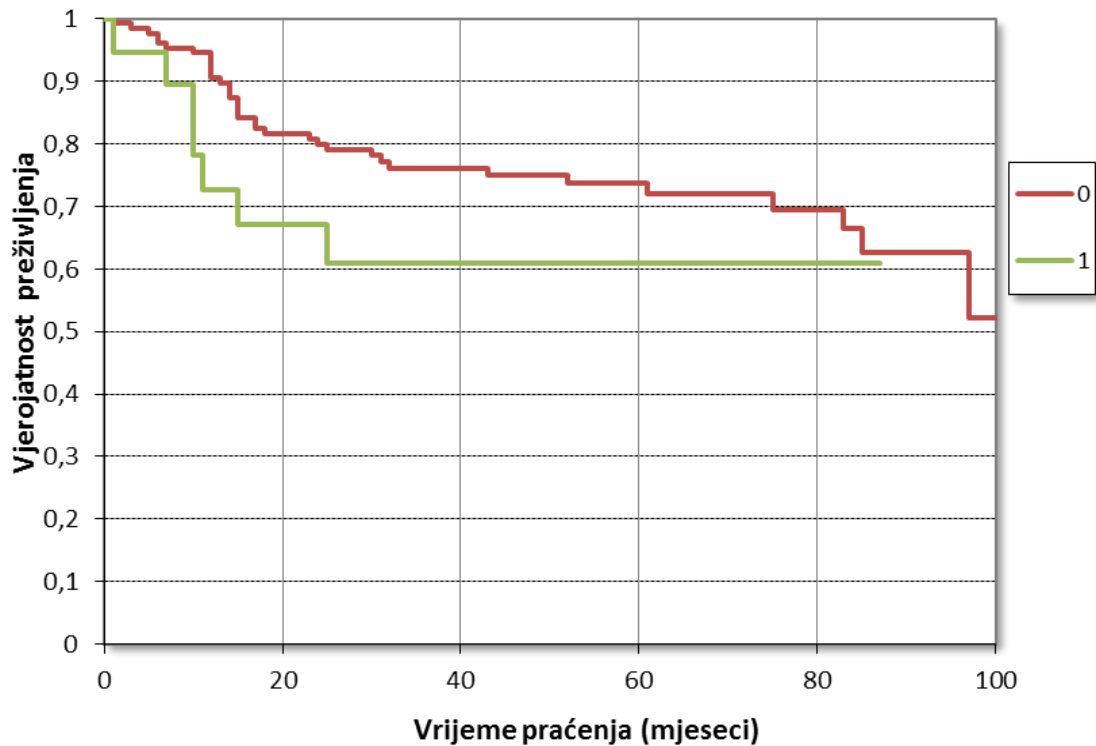
Oni koji su pokazivali ekspresiju p16INK4a, a pogotovo oni s jačom ekspresijom navedenog proteina, su imali značajno lošije preživljenje (Grafikoni 17, 18, 19 i 20).



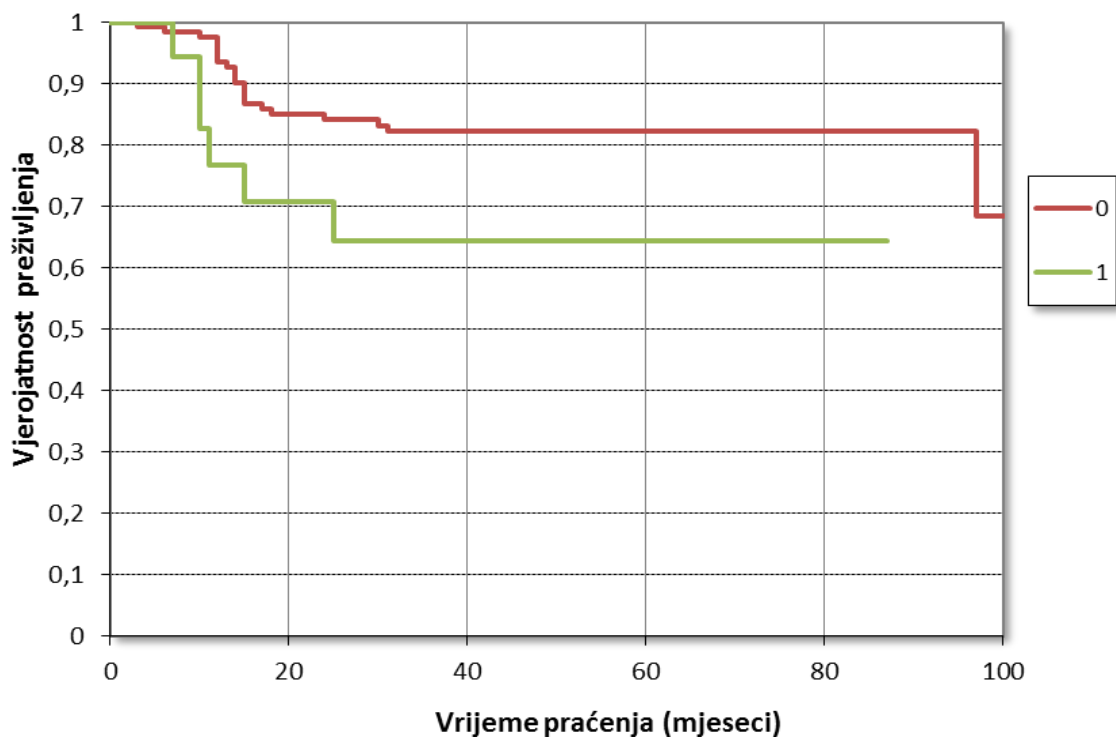
Grafikon 17. Krivulje sveukupnog preživljenja između p16INK4a+ (1) i p16INK4a- (0) bolesnika, Log rank test (Cox mantel) $p=0,3561$



Grafikon 18. Krivulje specifičnog preživljenja između p16INK4a+ (1) i p16INK4a- (0) bolesnika, Log rank test (Cox mantel) $p=0,2020$



Grafikon 19. Krivulje sveukupnog preživljenja između bolesnika koji slabo ili ne pokazuju ekspresiju p16INK4a (0) i onih koji pokazuju jaku ekspresiju p16INK4a (1), Log rank test (Cox mantel) $p=0,1769$



Grafikon 20. Krivulje specifičnog preživljenja između bolesnika koji slabo ili ne pokazuju ekspresiju p16INK4a (0) i onih koji pokazuju jaku ekspresiju p16INK4a (1), Log rank test (Cox mantel) $p=0,0501$

S obzirom na ekspresiju p16INK4a proteina bolesnici se nisu statistički značajno međusobno razlikovali po srednjoj dobi, dobnim skupinama, spolu, veličini primarnog tumora (T), prisutnosti regionalnih metastaza (N), stadiju, pojavi DPT (Tablica 18).

Tablica 18. Podjela po jačini ekspresije p16INK4a i različitim kliničkim parametrima

	p16INK4a ++ i +++	p16INK4a 0 i +	Statistička značajnost
<i>Dob i dobne skupine</i>			
Srednja dob	60	59,50	T test p=0,851
Medijan	59	59	
<45	4 (14%)	14 (11%)	Mann Whitney test p=0,8042
45-69	18 (62%)	80 (64%)	
+70	7 (24%)	31 (25%)	
<i>Spol</i>			
M	13 (45%)	76 (61%)	Chi square p=0,1737
Ž	16 (55%)	49 (39%)	
<i>Veličina tumora T</i>			
T1	7 (24%)	15 (12%)	Mann Whitney test p=0,1163
T2	14 (48%)	59 (47%)	
T3	4 (14%)	31 (25%)	
T4	4 (14%)	20 (16%)	
<i>Regionalne metastaze N</i>			
N0	20 (69%)	92 (74%)	Mann Whitney test p=0,7651
N1	6 (21%)	16 (13%)	
N2	3 (10%)	13 (10%)	
N3	0 (0%)	4 (3%)	
<i>Stadij</i>			
I	5 (17%)	14 (11%)	Mann Whitney test p=0,4797
II	12 (41%)	53 (42%)	
III	6 (21%)	28 (24%)	
IV	6 (21%)	30 (21%)	
DPT	5 (17%)	16 (13%)	

Bolesnici koji su jače ekspimirali p16INK4a, imali su i češće recidive i to statistički značajno (Tablica 19).

Tablica 19. Podjela po jačini ekspresije p16INK4a i pojavi recidiva

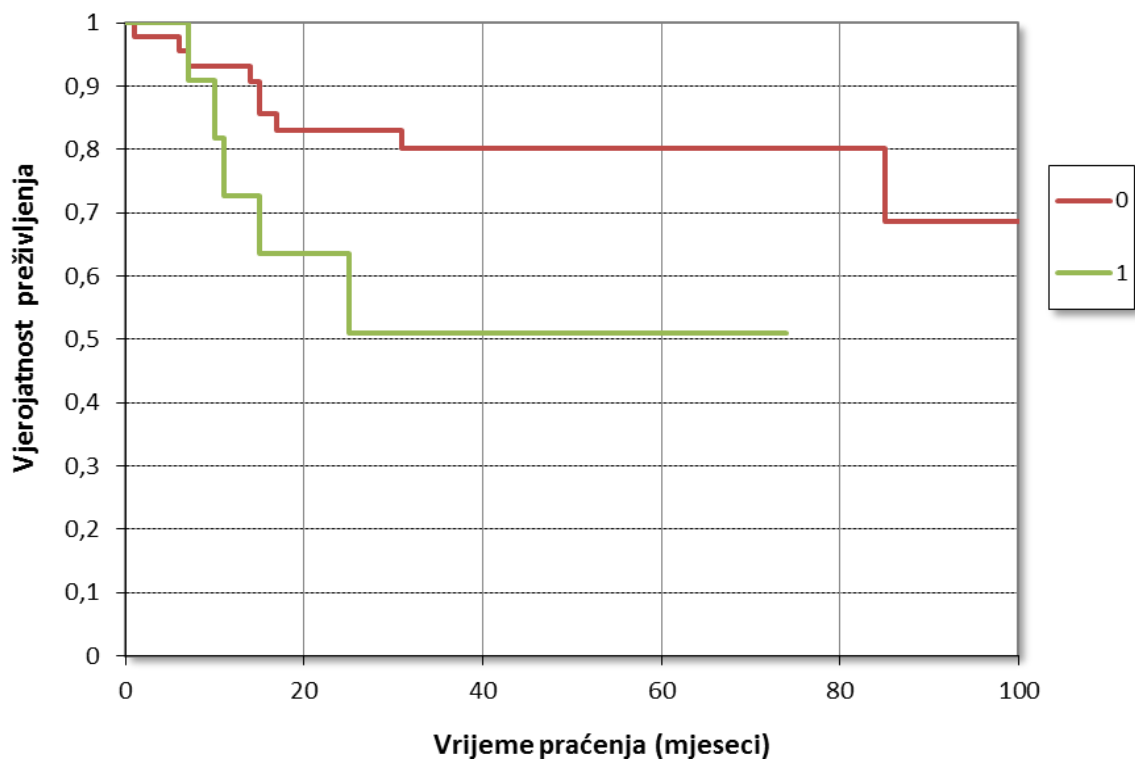
Recidivi	p16INK4a ++ i +++	p16INK4a 0 i +	Statistička značajnost
Bez	12 (57%)	105 (79%)	Mann Whitney test p=0,0463
Tr	7 (33%)	17 (13%)	
Nr	1 (5%)	8 (6%)	
M	1 (5%)	3 (2%)	

Ekspresija p16INK4a nije pokazivala veći ili manji afinitet prema nijednoj anatomskoj lokalizaciji u usnoj šupljini (Tablica 20), jedino je retromolarno područje bilo izrazito negativno prema p16INK4a ekspresiji (na granici statističke značajnosti).

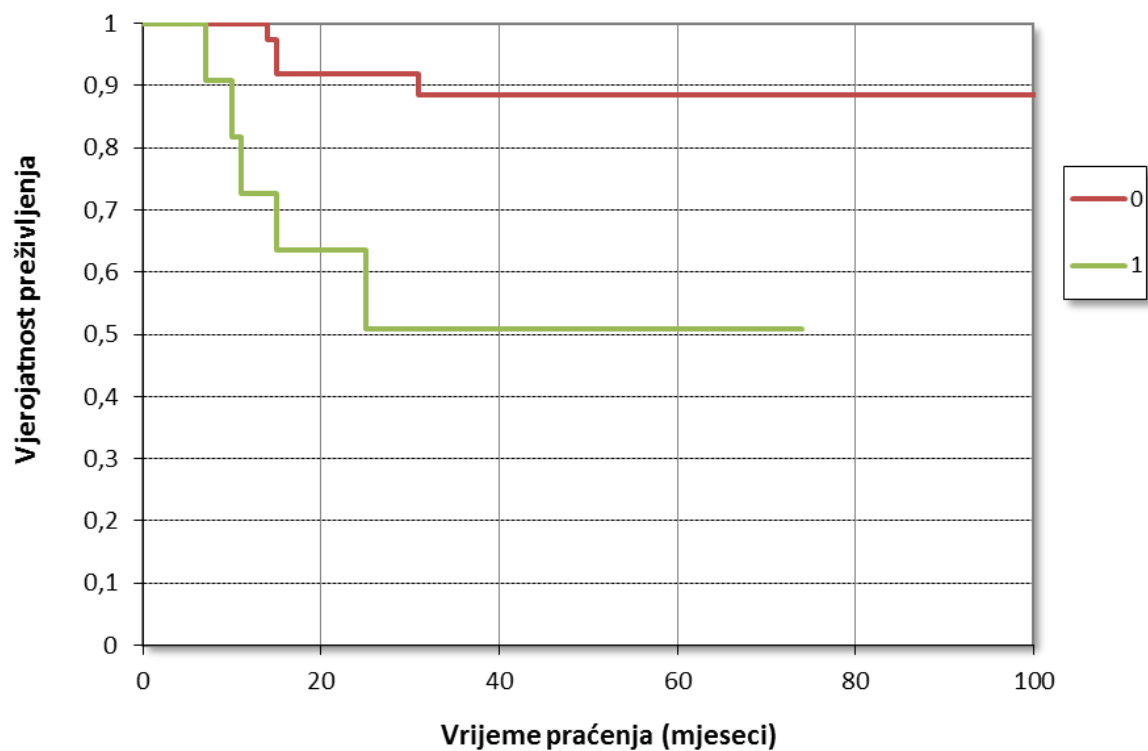
Tablica 20. Podjela po anatomskim lokalizacijama tumora u usnoj šupljini i p16INK4a statusu

Lokalizacija tumora	p16INK4a+	p16INK4a-	Statistička značajnost
Jezik	13 (45%)	45 (36%)	p=0,5021
Gingiva mandibule	3 (10%)	11 (9%)	p=0,9221
Gingiva maksile	4 (14%)	8 (6%)	p=0,3402
Obrazna sluznica	3 (10%)	6 (5%)	p=0,4793
Sublingvalno	6 (21%)	37 (30%)	p=0,4630
Retromolarno	0 (0%)	16 (13%)	p=0,0896
Tvrdo nepce	0 (0%)	2 (2%)	p=0,8223

Također statistički značajna se pokazala razlika u preživljenju karcinoma jezika s obzirom na p16INK4a ekspresiju, odnosno p16INK4a pozitivni karcinomi jezika su imali značajno lošije preživljenje (Grafikon 21 i 22).



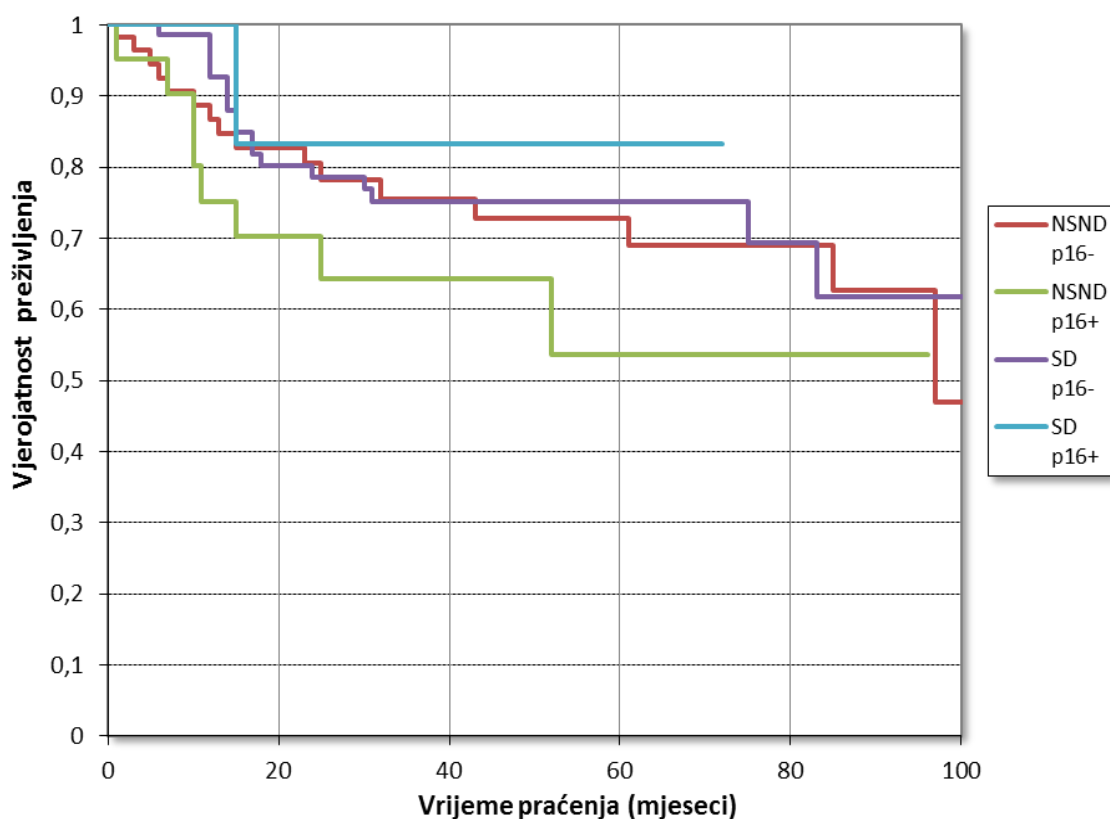
Grafikon 21. Krivulje sveukupnog preživljenja p16INK4a+ (1) i p16INK4a- (0) karcinoma jezika, Log rank test (Cox mantel) $p=0,0576$



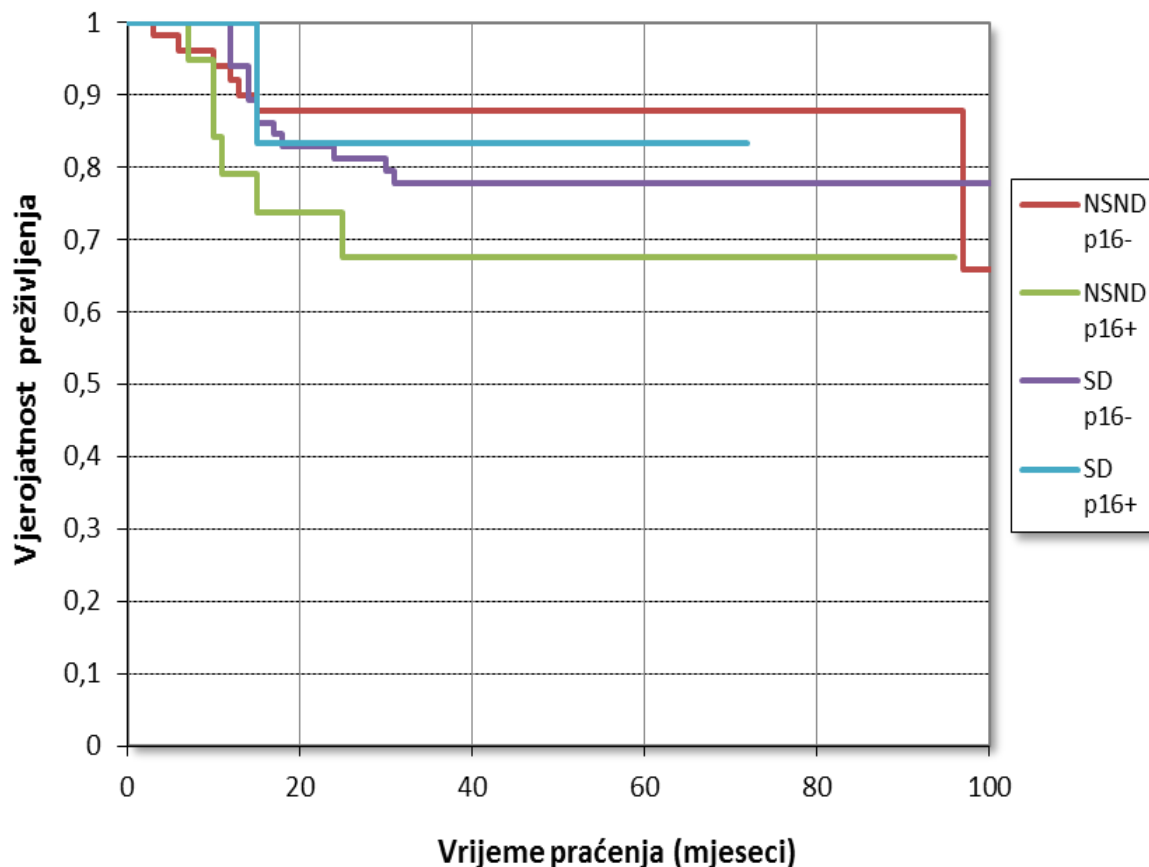
Grafikon 22. Krivulje specifičnog preživljenja p16INK4a+ (1) i p16INK4a- (0) karcinoma jezika, Log rank test (Cox mantel) $p=0,0026$

p16INK4a+ grupa bolesnika je statistički značajno manje pušila (Mann Whitney test $p=0,0503$) i konzumirala alkohol (Mann Whitney test $p=0,0123$).

Prema p16INK4a statusu i navikama bolesnici se mogu podijeliti u četiri skupine: p16INK4a+ ispitanici, p16INK4a- ispitanici, p16INK4a+ kontrole i p16INK4a- kontrole. Krivulje preživljenja se statistički nisu značajno razlikovale, iako i ovdje postoji tendencija da p16INK4a+ ispitanici imaju najlošije preživljenje a p16INK4a- ispitanici najbolje (Grafikoni 23 i 24).

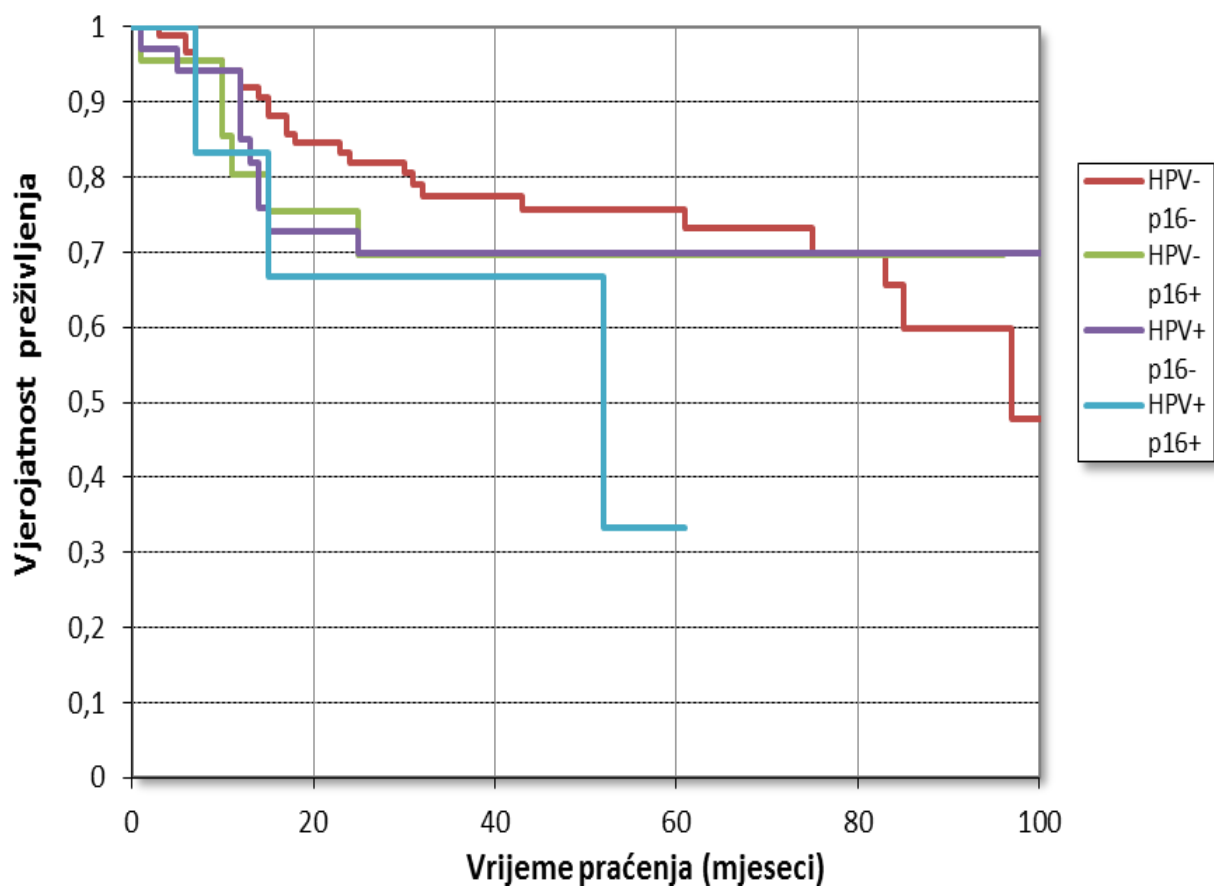


Grafikon 23. Krivulje sveukupnog preživljenja između p16INK4a+ ispitanika (NSND), p16INK4a- ispitanika (NSND), p16INK4a+ kontrola (SD) i p16INK4a- kontrola (SD), Log rank test (Cox mantel) $p=0,461$

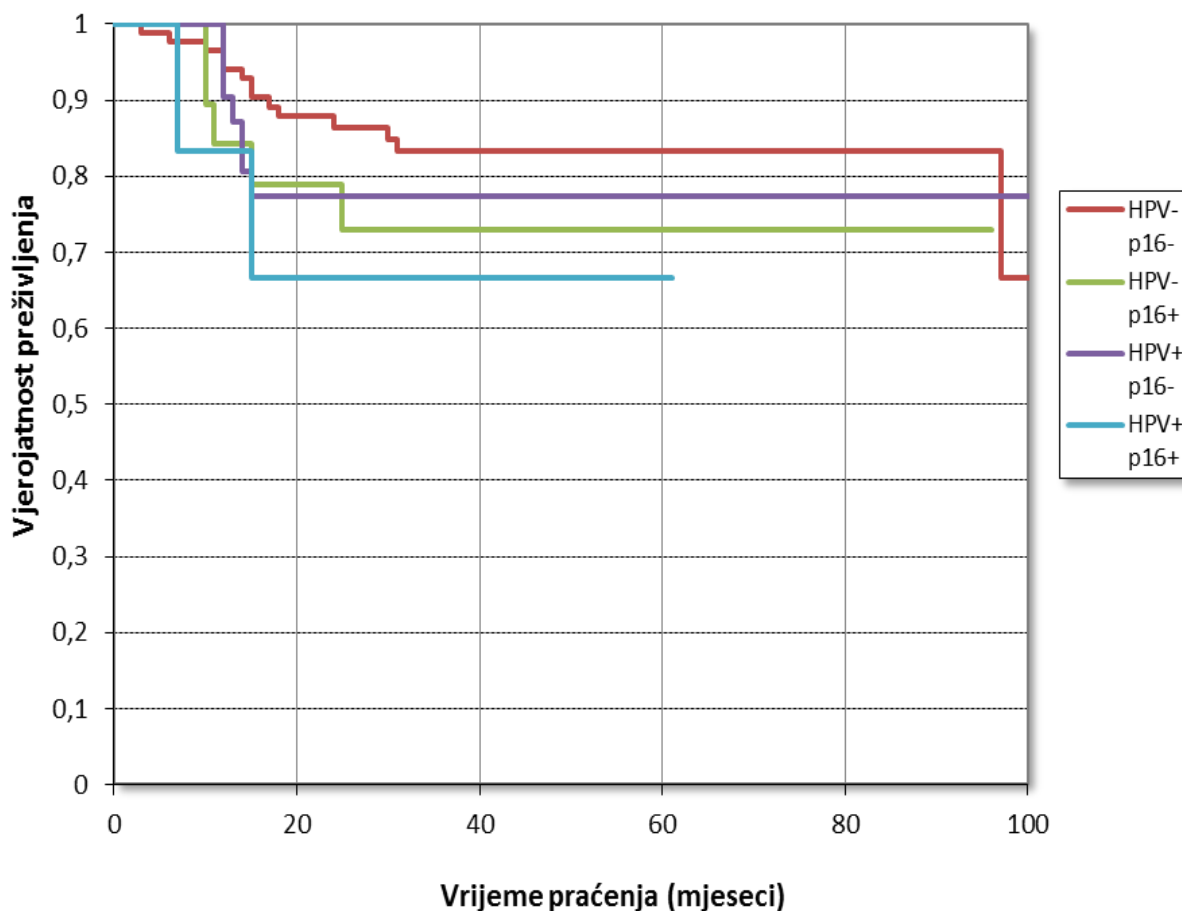


Grafikon 24. Krivulje specifičnog preživljenja između p16INK4a+ ispitanika (NSND), p16INK4a- ispitanika (NSND), p16INK4a+ kontrola (SD) i p16INK4a- kontrola (SD), Log rank test (Cox mantel) $p=0,352$

Ovisno o p16INK4a statusu i HPV statusu bolesnici se mogu podijeliti također u četiri skupine: p16INK4a+/HPV+, p16INK4a+/HPV-, p16INK4a-/HPV+ i p16INK4a-/HPV-. Krivulje preživljenja se nisu statistički značajno razlikovale mada je i ovdje tendencija da najlošije preživljenje imaju p16INK4a+/HPV+, a najbolje p16INK4a-/HPV- (Grafikoni 25 i 26).



Grafikon 25. Krivulje sveukupnog preživljenja između p16INK4a+/HPV+, p16INK4a+/HPV-, p16INK4a-/HPV+ i p16INK4a-/HPV- bolesnika, Log rank test (Cox mantel) $p=0,517$



Grafikon 26. Krivulje specifičnog preživljenja između p16INK4a+/HPV+, p16INK4a+/HPV-, p16INK4a-/HPV+ i p16INK4a-/HPV- bolesnika, Log rank test (Cox mantel) $p=0,494$

Napravljena je Coxova regresijska multivarijantna analiza za dob, spol, HPV, p16INK4a, stadij bolesti, alkohol i pušenje za cjelokupnu populaciju uključenu u ispitivanje (Tablica 21). Statistički značajne vrijednosti odnosno kao značajan prediktor preživljenja se pokazala jaka p16INK4a ekspresija te stadij bolesti.

Coxova regresijska analiza napravljena je i samo za nerizične ispitanike te su se isključili alkohol i pušenje kao potencijalni prediktivni čimbenici s obzirom da u toj skupini ta dva rizična čimbenika ne postoje. Statistički značajne vrijednosti kao prediktivnih čimbenika preživljenja su dobivene za jaku p16INK4a ekspresiju, HPV i stadij, dok spol i dob nisu utjecali na preživljenje (Tablica 22).

Tablica 21. Coxova regresijska multivarijantna analiza za cjelokupnu populaciju (significance level $p=0,0493$)

	Omjer rizika (HR)	95% CI	p
Dob	1,0120	0,9862 do 1,0385	0,3677
Spol			
M	1		
Ž	1,6007	0,6745 do 3,7985	0,2884
Stadij	1,5645	1,1132 do 2,1987	0,0103
HPV status			
HPV-	1		
HPV+	1,5699	0,8132 do 3,0306	0,1812
p16INK4a ekspresija			
Slaba ekspresija	1		
Jaka ekspresija	2,2204	1,0082 do 4,8903	0,0488
Pušenje (kutija na godinu)	0,9961	0,9801 do 1,0124	0,6377
Alkohol			
DA	1		
NE	0,6269	0,2213 do 1,7762	0,3820

Tablica 22. Coxova regresijska multivarijantna analiza za nerizične ispitanike (significance level $p=0,0047$)

	Omjer rizika (HR)	95% CI	p
Dob	1,0094	0,9798 do 1,0399	0,5397
Spol			
M	1		
Ž	0,9508	0,3391 do 2,6659	0,9239
Stadij	2,5104	1,5088 do 4,1770	0,0004
HPV status			
HPV-	1		
HPV+	2,8250	1,0806 do 7,3850	0,0351
p16INK4a ekspresija			
Slaba ekspresija	1		
Jaka ekspresija	2,9002	1,1414 do 7,3690	0,0260

6. RASPRAVA

Oslanjajući se na rezultate ispitivanja orofaringealnog karcinoma kod bolesnika bez tipičnih rizičnih čimbenika za karcinom glave i vrata, osmislili smo naše ispitivanje na karcinomima usne šupljine kod isto takve populacije bolesnika. Naime smatra se da je populacija bolesnika s karcinomom glave i vrata bez tipičnih rizičnih čimbenika vrlo usko povezana s prisutnošću visokorizičnih tipova HPV-a i predstavlja zasebnu kategoriju u smislu biološkog ponašanja tumora, prognoze, preživljenja, a moguće i liječenja.¹²⁹ Vrlo je malo studija koje su istraživale populaciju bolesnika samo s karcinomom usne šupljine, koji nisu bili pušači te nisu konzumirali alkohol na dnevnoj osnovi. One koje su se i bavile time često nisu analizirale biološko ponašanje takvih tumora, učestalost HPV-a i prognozu ovisno o prisutnosti ovog virusa.

6.1 Demografske karakteristike ispitanika i kontrolne skupine

U našem istraživanju utvrđena je značajna razlika u demografskim karakteristikama između nerizičnih ispitanika i kontrolne skupine. Naime u ispitivanoj skupini prevladavaju žene i to u omjeru 3:1, za razliku od kontrolne skupine gdje je omjer 10:1 u korist muškaraca. Iako se srednja dob u kojoj se pojavljuje karcinom ne razlikuje između dvije skupine, među ispitanicima je znatna dobna razlika. Raspon godina se kreće od 24 do 90, s time da su mlađa i starija dobna skupina zastupljenije nego u kontrolnoj skupini gdje je većina bolesnika u srednjoj životnoj dobi. Ovi rezultati su u skladu s ranije provedenim istraživanjima. Bachar i suradnici¹⁴⁸ su u svom istraživanju karcinoma jezika kod nerizične populacije utvrdili dominaciju ženske populacije od 67%. Srednja dob se isto tako nije razlikovala od kontrolne grupe s tipičnim rizičnim čimbenicima. Wey i suradnici¹³² te Bundgaard i suradnici¹³³ su u svojim istraživanjima na relativno malom uzorku nerizičnih bolesnika (23 i 14 bolesnika) s karcinomom usne šupljine također utvrdili dominaciju žena. Wiseman i suradnici¹³⁰ navode u svojoj studiji nerizičnih bolesnika sa svim sijelima karcinoma glave i vrata jednak omjer žena od 3:1 kao i mi u našem istraživanju. Farshadpour i suradnici¹²⁴ navode postotak od 73% žena što je također na tragu prethodnih istraživanja. Dahlstrom i suradnici¹²⁵ u velikoj retrospektivnoj studiji na 172 nerizična bolesnika, od čega ih je 73 bilo s karcinomom u usnoj šupljini, navode veći udio žena

te široki dobni raspon nerizične populacije, odnosno veći udio u mlađoj (<40 godina) ili starijoj (>70 godina) populaciji. Razlika je prema tipičnim bolesnicima gdje su većinom bili muškarci, grupirani u srednje staru populaciju. Ovi podaci se gotovo u potpunosti poklapaju s našima.

Iako postoji velika razlika u spolnoj raspodjeli između dvije skupine, nije bilo statistički značajnih razlika u preživljenju. Ako se gledaju samo ispitanici, specifično preživljenje žena je bilo gore nego muškaraca za skoro 10% (79% i 88%). Uspoređujući preživljenje žena između ispitanika i kontrola, zaključuje se da je i sveukupno i specifično preživljenje bilo gore kod žena koje nisu pušile niti konzumirale alkohol. Nijedna studija, koja se bavila s nerizičnim bolesnicima, ne spominje razliku u preživljenju između muškaraca i žena. Weyova¹³² studija uključuje među nerizičnima samo žene i tamo je preživljenje bilo bolje, ali se ono uspoređuje s cjelokupnom ostalom populacijom, a ne sa ženama s tipičnim rizičnim čimbenicima. Kod muškaraca gotovo da nije bilo razlike u sveukupnom preživljenju, ali su u specifičnom preživljenju nešto bolji bili muški ispitanici prema kontrolama. Spol se u multivarijantnoj Coxovoj analizi nije pokazao kao bitan čimbenik u prognozi.

S obzirom da je među ispitanicima velik udio mlađih bolesnika (18% prema 4%), možemo se osvrnuti na dugo prisutnu dogmu da je karcinom usne šupljine kod mlađe populacije (<40 ili <45) povezan s izrazito lošom prognozom. Prve podatke o karcinomu glave i vrata kod mladih je iznio Byers¹⁴⁹ 1975. kada je prikazao 11 bolesnika s karcinomom jezika s dvogodišnjim preživljenjem od svega 45%. Od tada mladi bolesnici s karcinomom glave i vrata nose negativan predznak, tj. uvijek ih se povezivalo s lošom prognozom i agresivnijim tijekom bolesti. Sarkaria i Harari¹⁵⁰, Lund i Howard¹⁵¹, Cusumano i Persky¹⁵², Garavello i suradnici¹⁵³ i Siriwardena i suradnici¹⁵⁴ objavljuju rezultate sukladno Byersu, odnosno obično su to bolesnici mlađi od 45 godina s karcinomom jezika bez rizičnih čimbenika s vrlo lošom prognozom. Nakon prvotnog Byersovog članka u literaturi se počelo javljati mnoštvo članaka sa suprotnim rezultatima. Schantz i Yu¹⁵⁵, Annertz i suradnici¹⁵⁶, Davidson i suradnici¹⁵⁷, Ho i suradnici¹⁵⁸, Warnakulasuriya i suradnici¹⁵⁹ pokazuju da je preživljenje mlađih bolesnika s karcinomom glave i vrata bolje nego kod kontrolne grupe. Na kraju velik broj autora (Verschuur i suradnici¹⁶⁰, Veness i suradnici¹⁶¹, Hart i suradnici¹⁶², Pytynia i suradnici¹⁶³, Friedlander i suradnici¹⁶⁴, Pitman i suradnici¹⁶⁵, Myers i suradnici¹⁶⁶, Popovtzer i suradnici¹⁶⁷, Atula i suradnici¹⁶⁸, Lipkin i

suradnici¹⁶⁹) navodi da nema razlike u preživljenju i prognozi između mladih i starije kontrolne populacije. U našem istraživanju nije bilo značajnih razlika u specifičnom i ukupnom preživljenju između pojedinih dobnih skupina među ispitanicima, što je sukladno zadnjim podacima iz literature. Ni Coxovom regresijskom analizom dob ili dobne skupine nisu se pokazale kao bitan prognostički čimbenik. Jedina veća razlika je bila u specifičnom petogodišnjem preživljenju gdje je dobna skupina mlađa od 45 imala najgore preživljenje (70% za razliku od srednje i starije s 83% i 86%), iako ono nije bilo statistički značajno.

6.2 Anatomske lokalizacije tumora u usnoj šupljini i biološko ponašanje tumora

Među tipičnim bolesnicima s karcinomom usne šupljine najzastupljeniji su sublingvalni karcinom (39%), karcinom jezika (34%) te karcinom retromolarnog područja (17%). Ovo su tipične lokalizacije u tzv. bazenu slina, gdje slina konstantno oplakuje sluznicu i time ju dovodi u produženi kontakt s karcinogenima koji se nalaze u slini. Značajne razlike su u pogledu anatomskih lokalizacija kod ispitanika. Najzastupljeniji je karcinom jezika (42%), zatim sublingvalni karcinom (17%) te gingiva maksile (13%) i mandibule (12%). Slični podaci dobiveni su i u studiji Dahlstroma i suradnika.¹²⁵ Karcinom jezika je također bio najzastupljeniji (58,9%), slijedio je karcinom gingive mandibule (16,9%), bukalni karcinom (9,6%), karcinom gingive maksile (8,2%). Jezik je bio najzastupljeniji kod nerizične populacije i prema rezultatima Kocha i suradnika¹³⁵, Tana i suradnika¹³¹, Wisemana i suradnika¹³⁰ te Pytinije i suradnika.¹²⁷ Jasno je da kod nerizičnih bolesnika udio sublingvalnog karcinoma i retromolarnog karcinoma nije tako velik jer nema štetnih karcinogena iz alkohola i cigareta u slini te tzv. bazen slina više ne utječe toliko na distribuciju tumora. Uzroci karcinoma kod nerizične populacije nisu toliko jasni.

Analizirali smo i preživljenje za dva najzastupljenija sijela karcinoma između ispitanika i kontrola. Jezik je imao nešto goru prognozu kod ispitanika nego kod kontrola dok je preživljenje bilo obrnuto za sublingvalni karcinom koji je imao bolje preživljenje kod ispitanika. Općenito je u literaturi malo podataka za nerizične bolesnike pa tako i usporedba preživljenja po anatomskim lokalizacijama u usnoj šupljini.

Kod ispitanika su prevladavali tumori koji su bili manji (T1 i T2, 66%) i bez regionalnih metastaza (N0, 77%) dok su kod kontrola tumori bili veći (T3 i T4, 47%) i sa češćim regionalnim metastazama (N1-3, 31%). Sukladno tome nešto više ispitanika je bilo u prva dva stadija (58% prema 51%), dok su kontrole bile nešto više zastupljene u uznapredovalijim stadijima III i IV (49% prema 42%). Ovo se može objasniti time što su nerizični bolesnici obično i boljeg socioekonomskog i obrazovnog statusa te se više brinu o svom zdravlju i javljaju se dok su promjene u ustima još relativno male. Tipični bolesnik s karcinomom usne šupljine je obično nižeg socioekonomskog statusa i obrazovanja te često ne brine o svom oralnom zdravlju, što se vidi i po obično vrlo lošem dentalnom statusu, ali i zdravlju općenito. Karcinom usne šupljine bi idealno, s obzirom na vizualno lako dostupno mjesto na kojem nastaje, trebao biti otkriven u T1 i T2 stadiju. Koch i suradnici¹³⁵ su u svom istraživanju došli do sličnih zaključaka te pretpostavljaju da možda tumori kod nerizičnih bolesnika sporije rastu pa se zato javljaju u ranijim stadijima. Dahlstrom i suradnici¹²⁵ su došli do statistički značajno veće učestalosti stadija I za karcinom usne šupljine kod nepušača što opet korelira s našim rezultatima.

Postotak recidiva se nije razlikovao između dvije skupine bolesnika (25% prema 23%) što bi govorilo da karcinom usne šupljine nije biološki agresivniji kod nerizičnih bolesnika. Isto tako nismo našli bitne razlike između recidiva ovisno o dobnoj skupini u kojoj se pojavljuju. Kod ispitanika 21% ih se javlja u mlađoj dobnoj skupini, a 31% u starijoj dobnoj skupini. Kod kontrola svega 11% ih se javlja u starijoj skupini, nijedan u mlađoj, a ostatak u srednjoj dobnoj skupini. Ove razlike možda proizlaze iz same distribucije bolesnika po dobnim skupinama, a ne biološke agresivnosti tumora kod nerizičnih bolesnika. Među ispitanicima ionako ima ukupno više mlađih i starijih bolesnika pa je i logično da se u tim dobnim skupinama javlja više recidiva nego kod kontrola.

Nije bilo razlike u pojavi drugih primarnih tumora između ispitanika i kontrola. Očekivalo bi se da ispitanici, koji ne puše i ne piju, imaju manje drugih primarnih tumora od kontrola, koje redovito konzumiraju alkohol i svakodnevno puše cigarete, zbog nedostatka kroničnog i dugotrajnog oštećenja sluznice cijelog gornjeg aerodigestivnog trakta navedenim karcinogenima. Štoviše, gotovo jednak broj bolesnika iz obje skupine je razvio drugi primarni tumor u području gornjeg aerodigestivnog trakta. Kao što je sluznica kod pušača i alkoholičara ukleta, tako je

očito ukleta i sluznica kod nerizičnih bolesnika samo što je još nepoznato koji je to čimbenik koji dovodi do toga. Wiseman i suradnici¹³⁰ su našli vrlo visoku stopu DPT-a kod nerizičnih bolesnika s karcinomom usne šupljine od 31%, što je više nego što je u istoj instituciji nađeno kod tipičnih bolesnika (18%) te za to nisu našli objašnjenje. Koch i suradnici¹³⁵, kao ni mi, nisu našli razlike u pojavi DPT-a između nerizičnih i rizičnih bolesnika. Chen i suradnici¹⁷⁰ u svom istraživanju također nisu našli razlike u pojavi DPT-a između rizičnih i nerizičnih bolesnika. Prema rezultatima većine studija ostaje dakle otvoreno pitanje DPT-a kod nerizične populacije. Prema našim rezultatima učestalost je otprilike ista kao i kod rizičnih bolesnika. Razlog ostaje nepoznat.

Sveukupno i specifično preživljenje se nije značajnije razlikovalo između dvije skupine bolesnika što bi značilo da alkohol i pušenje ne igraju ulogu u konačnoj prognozi. To je potvrđeno i Coxovom multivarijantnom regresijskom analizom gdje pušenje i alkohol gotovo da nisu nosili povećani rizik umiranja od bolesti. Slične studije, koje su se bavile preživljenjem nerizičnih bolesnika s karcinomom usne šupljine, uglavnom su navodile slično preživljenje ili nešto bolje preživljenje nerizičnih bolesnika. Harris i suradnici¹²⁶ navode bolje desetogodišnje sveukupno preživljenje mlađih od 45 godina za razliku od iste takve populacije koja je konzumirala alkohol i pušila. Pytina i suradnici¹²⁷ također javljaju bolje sveukupno i petogodišnje specifično preživljenje za nerizične bolesnike s karcinomom glave i vrata. Bolje preživljenje, u navedenom istraživanju, bi se moglo objasniti velikim postotkom (62%) orofaringealnog karcinoma kod nerizičnih bolesnika, s obzirom da je dokazano da orofaringealni karcinom kod nerizičnih bolesnika ima bolju prognozu i da je povezan s HPV-om. Wey i suradnici¹³² na svom malom uzorku od 14 nerizičnih žena navode preživljenje od 79%, što je bolje u odnosu na rizične bolesnike u istoj studiji koji su imali preživljenje od 63%. Interpretacija ovih rezultata je ograničena s obzirom na mali broj ispitanika u samom istraživanju i rezultate treba uzeti sa zadržkom. Koch i suradnici¹³⁵ i Bundgaard i suradnici¹³³ ne nalaze značajne razlike u sveukupnom ili specifičnom petogodišnjem preživljenju između nerizičnih bolesnika i onih sa tipičnim rizičnim čimbenicima. Wiseman i suradnici¹³⁰ ne uspoređuju preživljenje nerizičnih bolesnika s tipičnim bolesnicima, već samo navode preživljenje od 69%, što je vrlo slično općenito petogodišnjem preživljenju bolesnika s karcinomom usne šupljine.

U našem istraživanju dobili smo i vrijedne podatke o rizičnim navikama prosječnog tipičnog bolesnika s karcinomom usne šupljine. Prosječna ekspozicija pušenju je 45 kutija na godinu što bi značilo da 20 cigareta dnevno puši kroz 45 godina ili da 45 cigareta dnevno puši kroz 20 godina. Isti takav bolesnik obično konzumira svakodnevno alkohol kroz prosječno 33 godine. Dnevno konzumira 173 g etanola ili oko 11 pića (u jednom piću ima 15 g etanola te jedno piće odgovara 125 ml vina, ili 330 ml piva ili 36 ml žestokog pića). Količinski i po vrsti pića je to u prosjeku 0,8 l vina, 0,7 l piva te 0,12 l žestokog pića. Pušenje i konzumacija alkohola su obično povezani. Samo dva bolesnika su bili nepušači a svakodnevno su konzumirali alkoholna pića, a samo sedam su bili pušači ili bivši pušači koji nisu konzumirali alkohol. Od 57 aktivnih pušača samo dvoje nije konzumiralo i alkohol. Od 18 bivših pušača njih 15 je i dalje nastavilo sa svakodnevnom konzumiranjem alkohola. Castellsague i suradnici⁹ iznose podatke o rizičnim navikama za karcinom usne šupljine na temelju multicentrične studije provedene u Španjolskoj. Tako je prosječna ekspozicija pušenju bila 28 cigareta kroz 40 godina što bi iznosilo 56 kutija na godinu, dakle još više nego kod nas. Alkohol se svakodnevno konzumirao u prosjeku kroz 38 godina i to prosječno osam pića na dan. Ovi podaci iz Španjolske su i očekivani ako se uzme u obzir da je u Španjolskoj incidencija karcinoma usne šupljine među najvišima u Europi. Slični podaci za konzumaciju alkohola su i iz Italije gdje je 90% bolesnika konzumiralo više od 55 pića na tjedan, dakle više od osam dnevno.¹⁷¹ Relativni rizik za razvoj karcinoma usne šupljine prilikom konzumacije samo tri pića dnevno ili 50 g etanola dnevno je oko 3, za šest pića dnevno ili 100 g etanola je oko 8, a za osam pića dnevno ili 125 g etanola je oko 13.¹⁷² Najveći rizik nosi konzumiranje žestokih pića s obzirom da sadržavaju veći udio etanola u sebi. S obzirom na navedene podatke možemo reći da tipičan bolesnik s karcinomom usne šupljine u Hrvatskoj konzumira veće količine alkohola pri čemu smo sigurno među vodećima u Europi.

6.3 HPV PCR status

Kao što se virus HPV-a povezuje s karcinomom orofarinksa kod nerizične populacije ista stvar se može pretpostaviti i za karcinom usne šupljine. Sluznica usne šupljine je isto tako obložena višeslojnim pločastim epitelom za koji virus HPV-a ima afinitet kao i sluznica orofarinksa ili sluznica cerviksa maternice. Tom pretpostavkom smo se vodili prilikom kreiranja ovog istraživanja.

Prema rezultatima dobivenima PCR analizom parafinskih kocki, 27% svih bolesnika je bilo pozitivno na HPV. Nije bilo značajne razlike u prisutnosti virusa HPV-a između ispitanika i kontrola (22% prema 31%, $p=0,2740$). Suprotno našim očekivanjima, čak je nešto više bolesnika pozitivno na HPV u kontrolnoj grupi. Iako je teško dokazati da je nešto uzročni čimbenik, povećano prisustvo virusa HPV-a među ispitanicima, a u nedostatku drugih poznatih rizičnih čimbenika bi sigurno ukazivalo na povezanost HPV infekcije i nastanka karcinoma usne šupljine. I dalje je moguće da je jedan dio karcinoma usne šupljine, a osobito kod nerizičnih bolesnika, povezan s HPV-om dok kod pušača i alkoholičara HPV vjerojatno djeluje samo kao još jedan kofaktor u složenom mehanizmu karcinogeneze. Dobiven udio HPV pozitivnosti u cjelokupnom ispitivanom uzorku je u skladu s većinom studija koje su ispitivale učestalost HPV-a u karcinomima usne šupljine PCR metodom. Prema radu Terminea i suradnika⁶⁹, odnosno velikoj meta analizi radova objavljenih od 1988. do 2007. godine, gdje se uspoređivala učestalost HPV-a u parafinskim kockama karcinoma usne šupljine nasuprot ostalih dijelova glave i vrata, učestalost HPV-a je bila 38,1%. Ako se uzmu u obzir samo rezultati studija gdje je HPV dokazivan PCR metodom, onda je učestalost bila i nešto viša, 39,9%. Naši rezultati su sličniji onima koje su objavili Kreimer i suradnici⁶⁸ u svom sistematskom pregledu prevalencije HPV-a i pojedinih genotipova u tumorima glave i vrata. U tom radu prevalencija HPV-a je bila 23,5% u karcinomima usne šupljine, temeljeno na 35 studija i 2642 bolesnika. U svim studijama uključenim u ovaj pregled HPV je dokazivan PCR metodom. Međutim, većina studija je upotrebljavala svježe smrznute uzorke, a manji dio parafinske kocke. Autori navode da ta razlika nije imala utjecaj na konačni rezultat prevalencije HPV-a, iako bi rezultati dobiveni na parafinskim kockama trebali biti nešto manji zbog denaturacije DNA koja se događa i nemogućnosti izolacije virusne DNA. Miller i White⁸³ su u svojem preglednom radu upravo to i dokazali.

Učestalost HPV-a u svježim smrznutim uzorcima je bila čak 51,6%, a u parafinskim uzorcima 21,7% ($p < 0,001$).

Puno su oskudniji podaci za učestalost HPV-a kod nerizičnih bolesnika s karcinomom usne šupljine. Iako se provode brojne studije o učestalosti HPV-a u karcinomima glave i vrata, rijetko se navode razlike u dobivenim rezultatima što se tiče anatomske lokalizacije u području glave i vrata, ali i navika ispitivane populacije. Dahlstrom i suradnici¹²⁵ u svom istraživanju na 172 nerizična bolesnika i 1131 tipična bolesnika sa svim sijelima karcinoma glave i vrata, su između ostalog ispitivali prisutnost HPV-a serološki i PCR metodom na HPV tip 16. Ukupno je u istraživanje bilo uključeno 73 bolesnika s karcinomom u usnoj šupljini bez rizičnih čimbenika. Od toga je njih 30 bilo testirano serološki na HPV, a svega 20 PCR metodom na HPV 16. Od rizičnih bolesnika njih 135 s karcinomom u usnoj šupljini je bilo testirano serološki, a 57 PCR metodom. Nisu nađene statistički značajne razlike u HPV statusu između rizične i nerizične skupine bolesnika, bilo serološki, bilo PCR-om. Serološki je pozitivnu reakciju pokazalo 13% nerizičnih bolesnika, a PCR-om 30% dok je kod tipičnih bolesnika njih 11% bilo pozitivno serološki i 21% PCR metodom. Rezultate dobivene serološki ionako možemo uzeti sa zadržkom, s obzirom da je to indirektna metoda koja dokazuje samo da je osoba imala kontakt s virusom HPV-a, a ne i da se virus nalazi u samom tumoru ili u usnoj šupljini.

Dahlstrom i suradnici¹²⁸ su 2005. g. objavili istraživanje gdje uspoređuju HPV status serološki između 120 bolesnika s karcinomom glave i vrata (od toga 60 nepušača i 60 tipičnih bolesnika) i 120 kontrola. Serološki za usnu šupljinu nisu nađene statistički značajne razlike između nerizičnih i tipičnih bolesnika. Samo 8,3% slučajeva karcinoma usne šupljine je bilo pozitivno na HPV infekciju. Na 18 tumora usne šupljine se PCR metodom pokušalo identificirati HPV DNA. Rezultat je bio pozitivan u samo tri slučaja. Autori zaključuju da je HPV infekcija povezana sa značajno povišenim rizikom za orofaringealni, ali ne i karcinom usne šupljine te da nema razlike u HPV statusu između pušača i nepušača.

Andrews i suradnici¹²⁹ su u svoje istraživanje uključili 40 bolesnika, 22 kontrole s benignom biopsijom te svega 18 bolesnika bez rizičnih čimbenika. Od njih 18 samo dvoje je bilo s lokalizacijom tumora u usnoj šupljini. Ostatak je bio s karcinomom u području tonzile ili baze jezika. PCR analizom oba su tumora jezika bila HPV

pozitivna, međutim broj je premali da bi se mogli izvući nekakvi valjani zaključci. Visoka HPV pozitivnost nerizičnih bolesnika bila je vezana uz velik broj orofaringealnih karcinoma u studiji.

Koch i suradnici¹³⁵ su analizirali 24 nepušača i 24 bivša pušača od ukupno 308 bolesnika sa svim sijelima glave i vrata. Na HPV je bilo pozitivno 5 nepušača, 8 bivših pušača te 24 pušača. Nije bilo statistički značajne razlike u HPV statusu između pušača i nepušača. Svega tri karcinoma u usnoj šupljini su bila HPV pozitivna, sva tri kod teških pušača.

Fouret i suradnici¹³⁶ su u svom istraživanju dobili svega 5 HPV DNA pozitivnih nepušača, od 187 ispitanika. Nije poznato koliki je točno bio udio karcinoma usne šupljine. Iz svega navedenog ne zna se zapravo koliki je udio HPV pozitivnih među nerizičnim bolesnicima s karcinomom usne šupljine, odnosno broj bolesnika u pojedinim istraživanjima je bio vrlo mali. Naše istraživanje stoga predstavlja studiju s najvećim brojem nerizičnih ispitanika s karcinomom usne šupljine i analizom prisutnosti HPV-a kod takvih bolesnika. Najbliža je ona Dahlstroma i suradnika¹²⁵ gdje su uključena 73 nerizična bolesnika s karcinomom usne šupljine od čega se samo kod njih 20 PCR metodom ispitala prisutnost HPV-a. U našem istraživanju bilo je uključeno 77 nerizičnih bolesnika i kod svih je PCR-om dokazivan HPV.

Nije bilo značajne razlike u dobnoj raspodjeli između HPV pozitivnih i negativnih. Gledano po postotku u HPV pozitivnoj grupi ima nešto više mlađih, a u HPV negativnoj starijih bolesnika. Iako bi se moglo pretpostaviti da bi nešto veći udio HPV pozitivnih trebao biti u mlađoj dobnoj skupini s obzirom na manjak klasičnih rizičnih čimbenika i aktivan seksualni život te prakticiranje oralnog seksa, podaci iz literature su kontradiktorni. Kabeya i suradnici¹⁷³ su istraživali prevalenciju HPV-a kod mlađih od 40 godina s karcinomom jezika. PCR-om nije dokazan niti jedan virus HPV-a kod ukupno 32 ispitanika te zaključuju da kod mladih HPV ne igra ulogu u onkogenezi. Van Monsjou i suradnici¹⁷⁴ su također istraživali prevalenciju HPV-a kod mlađih od 40 godina s karcinomima glave i vrata. Samo 5% karcinoma usne šupljine se pokazalo PCR-om pozitivno na HPV, a isto tako nisu našli povezanost HPV-a s prisustvom ili odsustvom rizičnih navika, tj. pušenja i alkohola. Harris i suradnici¹⁷⁵ su kod samo dva mlada bolesnika s karcinomom jezika našli HPV DNA PCR metodom od ukupno 25 bolesnika. Kaminagakura i suradnici¹⁷⁶ su došli do zaključka

da HPV ima ulogu kod karcinoma usne šupljine mlađe populacije. Ukupno je 19% slučajeva bilo HPV PCR pozitivno od čega je 68% bilo u mlađoj populaciji, a 32% u populaciji starijoj od 50 godina ($p=0,001$). S obzirom da je većina istraživanja na relativno malom uzorku, za konačne rezultate bi bilo potrebno provesti meta analizu svih studija. Gledano po preživljenju, HPV pozitivni status po dobnim skupinama nije imao značajnijeg utjecaja. Najgore je specifično preživljenje imala srednja dobnja skupina koja je bila HPV pozitivna (69%) za razliku od mlađe (83%) i starije (86%) dobne skupine.

U HPV+ grupi je bilo više muškaraca nego žena (68% prema 32%) te su oni, gledajući specifično preživljenje, imali nešto goru prognozu nego žene (72% prema 83%). Uzimajući u obzir cjelokupnu skupinu ispitanika, preživljenje (sveukupno i specifično) između muškaraca i žena se nije znatnije razlikovalo. U studijama koje su se bavile HPV povezanim orofaringealnim karcinomom, također su prevladavali muškarci i to uglavnom bez rizičnih navika. U našem istraživanju prevladavaju HPV pozitivni muškarci koji konzumiraju alkohol i puše. Samo 17% ih je bez rizičnih navika. Kod žena pozitivnih na HPV je upravo obrnuto. Samo jedna je pušila i konzumirala alkohol svakodnevno (7%). Kada se gleda cijela grupa HPV pozitivnih, onda se ova razlika u navikama među spolovima izgubi. Ako se uspoređuje pušenje i alkohol ovisno o HPV statusu, onda nema značajnih razlika, iako bi se očekivalo da je HPV više pozitivan kod onih bez rizičnih čimbenika. U našem istraživanju pušači čine 63% HPV pozitivne i 55% HPV negativne grupe, a alkohol redovito konzumira 61% HPV pozitivnih i 55% HPV negativnih. Koch i suradnici¹³⁵ također nisu našli povezanost HPV-a s pušenjem i alkoholom. Duray i suradnici¹⁷⁷ te Smith i suradnici¹⁷⁸ isto tako nisu našli veću prevalenciju HPV-a kod nepušača i nealkoholičara. Uglavnom je ista kao i kod onih koji piju i puše. U nekim drugim studijama, poput Fouret i suradnika¹³⁶, sugerirano je da je HPV povezan s nedostatkom pušenja i alkohola. Polovica od 10 nerizičnih bolesnika je bilo HPV pozitivno, a među rizičnima samo 8%. Naočigled je ovo ogromna razlika (50% prema 8%), ali radi se o vrlo malom uzorku od svega 10 nerizičnih bolesnika pa rezultate, odnosno zaključak koji proizlazi, treba uzeti sa zadržkom.

Nijedna anatomska lokalizacija tumora nije pokazala veću razliku u učestalosti između HPV pozitivnih i negativnih bolesnika. U obje skupine najčešći tumor je bio karcinom jezika s gotovo jednakim postotkom (38% i 37%), a nakon njega

sublingvalni karcinom što je bilo iznenađujuće. Sublingvalni karcinom je inače snažno povezan s konzumiranjem alkohola i pušenjem jer se nalazi na centralnom mjestu u tzv. bazenu slina i za očekivati je bilo da neće biti toliko povezan sa HPV-om. Međutim, prema našim rezultatima zastupljen je čak s 34% u HPV pozitivnoj grupi, a s 26% u HPV negativnoj, suprotno našim očekivanjima. Ovo samo potvrđuje maloprije rečeno da je HPV pozitivnost neovisna o (ne)konzumaciji alkohola i (ne)pušenju. Na trećem mjestu nalazi se retromolarni karcinom kod HPV negativnih, dakle isti je poredak kao i kod pušača i alkoholičara, dok je kod HPV pozitivnih na trećem mjestu gingiva mandibule. Može se zaključiti da virus HPV ne pokazuje veći ili manji afinitet prema nijednoj anatomske lokalizaciji tumora u usnoj šupljini već je raspodjela tumora gotovo jednaka kao i kod tipične populacije bolesnika s karcinomom usne šupljine. Za razliku od orofaringealnog karcinoma, gdje je HPV uglavnom povezan s tonzilom, u usnoj šupljini virus HPV-a je raspoređen gotovo podjednako. U svakoj pojedinoj anatomske lokalizaciji u usnoj šupljini HPV pozitivno je oko 25% tumora (+ ili - 8%) te lokalizacije.

U literaturi većina studija se bavi analizom HPV-a među karcinomima jezika jer je obično ta lokalizacija tumora najčešća u usnoj šupljini, ali i zato jer je u zadnjim desetljećima zabilježen porast karcinoma jezika unatoč smanjenom pušenju i konzumaciji alkohola pa se pokušalo to povezati s virusom HPV-a.^{179,180} Kao što je navedeno ranije, Kabeya i suradnici¹⁷³ te Harris i suradnici¹⁷⁵ nisu našli poveznicu između HPV-a i karcinoma jezika kod mladih. Liang i suradnici¹⁸¹ su našli svega jedan HPV pozitivan karcinom jezika kod 51 ispitanog te odbacuju sumnju da je za rastući trend karcinoma jezika odgovoran HPV. Slične rezultate dobili su i Siebers i suradnici.¹⁸² Na sedam bolesnika s karcinomom jezika, koji nisu pušili i konzumirali alkohol, nije izolirao niti jednu HPV DNA iz parafinskih blokova. S druge strane, Kozomara i suradnici¹⁸³ navode postotak od 64% HPV pozitivnih karcinoma usne šupljine, od čega je većina bio jezik, a da Silva i suradnici¹⁸⁴ navode čak 74% pozitivnih karcinoma jezika. Naši su rezultati negdje u sredini, vjerojatno na tragu Kreimerove meta analize.⁶⁸ Jezik je bio HPV pozitivan kod 26% svih bolesnika s karcinomom jezika, odnosno među svim HPV pozitivnima je bio zastupljen s 37%. Iako se krivulje preživljenja ne razlikuju statistički značajno, karcinom jezika koji je HPV pozitivan pokazuje nešto bolje specifično preživljenje nego HPV negativan karcinom jezika. Rezultate slične našima, što se tiče karcinoma jezika i HPV statusa,

objavili su Lee i suradnici¹⁸⁵ koji su pronašli 35% HPV pozitivnih karcinoma jezika koji su imali bolju prognozu nego HPV negativni iako ne statistički značajno ($p=0,24$). Na lošiju prognozu povezanu s HPV-om ukazuju Kozomara i suradnici¹⁸³, iako su bolesnici u njihovoj studiji uglavnom karcinomi jezika i sublingvalni karcinomi.

Zanimljivo je da u literaturi gotovo nema zasebnih analiza sublingvalnog karcinoma i virusa HPV-a, iako je u našem istraživanju čak trećina svih sublingvalnih karcinoma bila pozitivna na HPV. Analizom krivulja preživljenja nije bilo razlike u preživljenju sublingvalnih karcinoma ovisno o HPV statusu. Vjerojatno se razlog nezainteresiranost istraživača prema ovoj tumorskoj lokalizaciji krije u činjenici što nije zabilježen porast u incidenciji, kao što je slučaj s karcinomom jezika i tonzile. Uspjeli smo naći svega jedno istraživanje na ovu temu gdje je postotak pozitivnih sublingvalnih tumora bio 17% te je zaključeno da HPV vjerojatno ne igra značajnu ulogu kod ove lokalizacije tumora.¹⁸⁶ Naši podaci govore upravo suprotno. Trećina HPV pozitivnih tumora čini značajan udio među sublingvalnim karcinomima i zaslužuje daljnje ispitivanje.

Razlike u pojavi drugih primarnih tumora između HPV pozitivnih i negativnih bolesnika gotovo da i nije bilo. Ako znamo da je za većinu DPT-a krivo kronično oštećenje gornjeg aerodigestivnog trakta uzrokovano alkoholom i pušenjem, i ako pogledamo rezultate prema kojima je gotovo jednak broj pušača i konzumenata alkohola među HPV pozitivnima i negativnima, onda je vrlo logično da između te dvije grupe nema razlike. Odnosno, bilo bi razlike da HPV nekim mehanizmom uzrokuje kronično oštećenje sluznice i doprinosi pojavi DPT-a, ali to vjerojatno nije tako. Većina objavljenih studija nije iznosila podatke o drugim primarnim tumorima među HPV pozitivnim i negativnim bolesnicima.

HPV pozitivni tumori su bili manji (T1 i T2, 71%), ali su češće imali regionalne metastaze (N1-N3, 39%), nego HPV negativni tumori koji su bili veći (T3 i T4, 42%), ali su češće bili bez regionalnih metastaza (N0, 77%). Razlika u regionalnim metastazama između HPV pozitivnih i negativnih je bila i statistički značajna ($p=0,0327$). Ovo bi se moglo objasniti time da su HPV pozitivni tumori agresivniji od početka, odnosno iako su tumori u usnoj šupljini relativno mali, već u ranoj fazi daju regionalne metastaze. Ovo se reflektira i na sveukupnom i specifičnom petogodišnjem

preživljenju. HPV pozitivni bolesnici imaju nešto lošije preživljenje nego HPV negativni, iako razlike nisu statistički značajne. Iako se HPV općenito kod karcinoma glave i vrata povezuje s boljom prognozom odnosno preživljenjem, prema našem istraživanju kod karcinoma usne šupljine preživljenje povezano s HPV-om je lošije. Još nekoliko radova potkrepljuje naše rezultate. Duray i suradnici¹⁷⁷ su našli visok postotak HPV pozitivnih tumora u usnoj šupljini, čak 70% (44% visokorizični i 26% niskorizični HPV genotipovi). HPV pozitivni ispitanici su imali petogodišnje preživljenje od 40% dok su HPV negativni imali preživljenje od 76% ($p=0,007$). Kozomara i suradnici¹⁸³ su u svom uzorku od 50 bolesnika s karcinomima jezika i sublingvalno našli 60% HPV pozitivnih bolesnika koji su imali lošije preživljenje nego HPV negativni. Brandwein i suradnici¹⁸⁷ su na uzorku od 64 bolesnika s karcinomom usne šupljine došli umnogome do sličnih rezultata kao i mi. Prevladavali su muškarci iako ne statistički značajno. HPV pozitivno je bilo 25% bolesnika. Nije bilo anatomske lokalizacije tumora intraoralno gdje bi HPV bio zastupljeniji. Srednja dob HPV pozitivnih i negativnih bolesnika je bila slična. Nije bilo više nepušača među HPV pozitivnima. Preživljenje HPV pozitivnih bolesnika je bilo lošije nego HPV negativnih. Ragin i Taioli¹⁸⁸ su napravili 2007. g. pregledni članak i meta analizu studija na temu preživljenja kod karcinoma glave i vrata u odnosu na HPV infekciju. Bolju prognozu HPV pozitivnih tumora, nego negativnih tumora, su pokazale 24 uključene studije, iako ono kod više od polovice studija nije bilo i statistički značajno. Gotovo sve ove studije uključivale su bolesnike s raznim sijelima karcinoma glave i vrata (usna šupljina, farinks, larinks). Deset uključenih studija nije pokazalo razlike u preživljenju između HPV pozitivnih i negativnih, a uključivale su uglavnom isto tako populaciju s pomiješanim raznim sijelima karcinoma glave i vrata. Samo tri studije su pokazale lošije preživljenje HPV pozitivnih tumora, od čega su dvije bile samo s bolesnicima s karcinomom usne šupljine, a jedna s hipofaringealnim i laringealnim karcinomom. Ono što je zanimljivo je da ako se gleda ukupan broj bolesnika s pojedinom lokalizacijom tumora, onda u studijama gdje je prognoza povezana s HPV-om bolja, prevladavaju preko 50% bolesnici s karcinomom orofarinksa. U studijama gdje nema razlike u preživljenju, prevladavaju tumori usne šupljine i larinksa, a u studijama gdje je preživljenje povezano s HPV-om lošije, preko 50% bolesnika čine oni s karcinomom u usnoj šupljini. Autori zaključuju da bi preživljenje povezano s HPV statusom moglo ovisiti o anatomskej lokalizaciji

tumora, dakle HPV pozitivni karcinom orofarinksa je povezan s boljom prognozom, a HPV pozitivni karcinom usne šupljine ili laringealni s lošijom ili jednakom. Isayeva i suradnici⁷⁵ u sistematskom pregledu literature o HPV-u kod ne-orofaringealnih karcinoma navode da za HPV i karcinom usne šupljine ne postoji značajna povezanost između prisutnosti HPV-a i bolje prognoze.

Bolja prognoza je zapravo povezana s HPV tipom 16 koji je snažno povezan s karcinomima orofarinksa dok pokazuje slabu povezanost s karcinomom usne šupljine i laringealnim karcinomom.¹⁸⁹ Ovo je također u skladu s našim rezultatima što se tiče otkrivenih genotipova HPV-a. Prema Kreimeru i suradnicima⁶⁸ u orofaringealnim karcinomima HPV tip 16 čini 86,7% svih HPV pozitivnih, a HPV tip 18 2,8% dok su ostali tipovi (6, 11, 33) zastupljeni s još manjim postotkom. U karcinomima usne šupljine HPV tip 16 čini 58% svih pozitivnih karcinoma, tip 18 čini 34% dok su ostali tipovi (6, 11, 33, 31) zastupljeni u još manjem postotku. U našem istraživanju HPV tip 16 je bio najčešći (45%). Zanimljivo HPV tip 18 nije bio na drugom mjestu već na četvrtom s 5%. Na drugom mjestu je bio tip 31 s 11%, a na trećem niskorizični tip 6 s 8%. Od ostalih tipova svi su bili visokorizični (tip 33, 45, 51, 52, 53, 58) osim jednog niskorizičnog (tip 43). U jednom istraživanju iz Francuske HPV tip 16 i u usnoj šupljini čini čak 95% svih genotipova.¹⁹⁰ U Kreimerovom članku⁶⁸, gdje su u tablicama poredane studije i genotipovi HPV-a po zemljopisnim lokacijama, vidljivo je da veća zastupljenost genotipa 31 nije bila u nijednoj studiji izvan Europe. Jedino je kod Fouret i suradnika¹³⁶ tip 31 bio najzastupljeniji, a u još jednoj studiji iz Italije¹⁹¹ se pojavljuje među češćim genotipovima. Vrlo je vjerojatno da učestalost pojedinih genotipova u karcinomima usne šupljine ovisi o zemljopisnoj dužini i širini i epidemiološkim značajkama populacije na toj lokaciji. Ono što je zajedničko svim studijama je dominacija HPV tipa 16, ali je postotak različit i kreće se od 30% do 100%, dok je nešto veća varijabilnost u zastupljenosti ostalih tipova, kako visokorizičnih, tako i niskorizičnih.

HPV pozitivni bolesnici su imali češće recidive (32%), za razliku od HPV negativnih (21%), što se očituje u nešto lošijoj krivulji preživljenja za HPV pozitivne bolesnike. U studijama gdje je preživljenje HPV pozitivnih bilo lošije, i recidivi su bili češći kod HPV pozitivnih, što je sasvim logično. U većini drugih studija ili nije bilo razlike, ili je recidiva bilo manje.

Ako analiziramo rezultate Coxove regresijske multivarijantne analize, onda HPV nije statistički značajno utjecao na preživljenje u cjelokupnoj populaciji što se podudara i s log rank testom Kaplan Meierovih krivulja. Međutim rizik (HR, *hazard ratio*) umiranja od bolesti, u cjelokupnoj populaciji studije, ako je HPV pozitivan, ipak je bio povećan (1,56). Još je veći rizik od umiranja povezan s HPV-om u ispitivanoj populaciji te iznosi 2,8 što je bilo i statistički značajno ($p=0,0351$). Možemo zaključiti da iako HPV u odnosu na kontrole nije bio češći u ispitivanoj populaciji bez rizičnih čimbenika, on ipak nosi za tu populaciju povećani rizik od umiranja, odnosno lošiju prognozu te je HPV važan kao prognostički čimbenik.

6.4 p16INK4a status

U cjelokupnom istraživanju 19% tumora je pokazalo pozitivnu reakciju na p16INK4a. Prema jednom pregledu literature od 12,8% do 100% karcinoma usne šupljine pokazuje povišenu ekspresiju proteina p16INK4a.¹⁹² Rezultati većine studija temelje se na malim uzorcima (najčešće od 10 do 30 ispitanika). Samo dvije studije imaju više od 100 ispitanika. Naše istraživanje bi predstavljalo skoro najveću studiju s ispitivanjem p16INK4a ekspresije u karcinomu usne šupljine (154 ispitanika). Jedina veća je ona Karsaija i suradnika¹⁹³ koja je uključivala 156 ispitanika, u kojoj je lošije preživljenje bilo povezano sa smanjenom ekspresijom p16INK4a.

Preživljenje se nije statistički razlikovalo s obzirom na p16INK4a status, iako su p16INK4a pozitivni bolesnici imali lošije i sveukupno i specifično preživljenje nego p16INK4a negativni (71% i 81%). Prema jačini ekspresije proteina p16INK4a preživljenje je bilo i statistički lošije ($p=0,05$) za one koji su jače eksprimirali navedeni protein. Također značajna statistička razlika je dobivena između p16INK4a negativnih i izrazito p16INK4a pozitivnih bolesnika u pojavi recidiva ($p=0,0463$). Čak 43% p16INK4a pozitivnih je imalo ili recidive, ili udaljenu metastazu (prema 21% p16INK4a negativnih). To objašnjava lošije preživljenje bolesnika sa snažnijom ekspresijom p16INK4a u našem istraživanju. Iako je već ranije navedeno da je p16INK4a povezan s boljom prognozom i karcinomima orofarinksa, iz našeg istraživanja je vidljivo da to isto ne mora vrijediti i za karcinom usne šupljine, odnosno p16INK4a se ponaša isto kao i HPV, tj. povezan je sa nešto lošijom prognozom i nešto češćim recidivima. Chandarana i suradnici¹⁹⁴ nisu utvrdili vezu

između preživljenja i p16INK4a statusa za karcinom usne šupljine koja bi bila statistički značajna. U istoj studiji je p16INK4a bio povezan s boljim preživljenjem za orofaringealni karcinom. Duray i suradnici¹⁷⁷ također nisu utvrdili statistički značajnu razliku u preživljenju između p16INK4a+ i p16INK4a- kod karcinoma usne šupljine. Ovi rezultati su različiti od nekih iz literature, gdje se p16INK4a i kod karcinoma usne šupljine povezuje s boljom prognozom. Chen i suradnici¹⁷⁰ su na Tajvanu utvrdili da su p16INK4a pozitivni tumori usne šupljine povezani s boljom prognozom. Suzuki i suradnici¹⁹⁵ isto javljaju statistički značajno bolje preživljenje karcinoma usne šupljine koji je povezan s povećanom ekspresijom p16INK4a. Vidljivo je da vrlo malo studija može potkrijepiti naše rezultate za p16INK4a i preživljenje. Naime ni mi, kao ni neki autori, nismo utvrdili statistički značajnu razliku u preživljenju s obzirom na p16INK4a status, ali je ona postala statistički značajna kada smo bolesnike podijelili prema jačini ekspresije p16INK4a, što autori prethodnih studija nisu radili. Možda bi u tom slučaju rezultat bio sličan. Lošije preživljenje povezano s jačom p16INK4a ekspresijom u našem istraživanju potvrdila je i Coxova multivarijantna regresijska analiza. Naime za cjelokupnu ispitivanu populaciju je snažnija p16INK4a ekspresija (++ i +++) predstavljala statistički značajnu razliku u preživljenju ($p=0,0488$) i rizik umiranja od bolesti povezan s p16INK4a je bio 2,22 puta veći nego kod p16INK4a negativnih ili slabo pozitivnih(+) bolesnika. Još snažnija povezanost se pokazala za skupinu ispitanika gdje je rizik umiranja od bolesti bio 2,9 puta veći za p16INK4a pozitivne ispitanike u odnosu na p16INK4a negativne ili slabo pozitivne(+) ($p=0,026$).

Najčešća lokalizacija tumora u usnoj šupljini koja je pokazala povećanu ekspresiju p16INK4a proteina bio je jezik (45% svih p16INK4a pozitivnih). Zanimljiv rezultat se dobio analizirajući preživljenje karcinoma jezika kod pozitivnog i negativnog p16INK4a. p16INK4a+ karcinom jezika ima statistički lošije sveukupno i specifično preživljenje ($p=0,0576$ i $p<0,002$) dok je onaj povezan s HPV-om imao bolje preživljenje. Gonzales Moles i suradnici¹⁹⁶ nisu utvrdili razlike u preživljenju karcinoma jezika s obzirom na p16INK4a status, ali su našli veliki broj p16INK4a pozitivnih karcinoma jezika (68%). Suprotno ovome Harris i suradnici¹⁷⁵ su kod mladih bolesnika s karcinomom jezika našli bolje preživljenje povezano s p16INK4a pozitivnošću. U svjetlu ranije spomenute korelacije p16INK4a i HPV statusa, autori su našli 11 pozitivnih na p16INK4a od 25, a svega 2 od 25 pozitivna na HPV PCR

metodom. Dakle opet značajan udio p16INK4a+/HPV-, čak devet. Bova i suradnici¹⁹⁷ su isto tako kod bolesnika s karcinomom jezika i povišenom razinom p16INK4a proteina utvrdili bolje preživljenje. Nažalost malo studija je objavilo rezultate preživljenja oslanjajući se samo na p16INK4a, već su uvijek rezultati ovisno o HPV statusu dokazanom PCR-om ili ISH. U dostupnoj literaturi do sada nije bilo objavljeno statistički lošije preživljenje karcinoma jezika povezano s povišenom ekspresijom proteina p16INK4a.

Statistički granična značajnost je bila kod retromolarnog karcinoma ovisno o p16INK4a statusu ($p=0,0896$). Naime niti jedan retromolarni karcinom (0/16) nije pokazao pozitivnu reakciju na p16INK4a. Gotovo da i nema u literaturi specifičnih članaka o retromolarnom karcinomu i njegovoj povezanosti s HPV-om ili p16INK4a ekspresijom. Sve studije o karcinomu usne šupljine i HPV-u i/ili p16INK4a se temelje uglavnom na karcinomu jezika.

U analizi krivulja preživljenja između ispitanika i kontrola, ovisno o p16INK4a statusu, vidi se da postoji tendencija u sveukupnom i specifičnom preživljenju, da ispitanici koji su p16INK4a pozitivni imaju goru prognozu od ostalih. Ispitanici koji su p16INK4a negativni imaju najbolju prognozu, dok su krivulje preživljenja za kontrole i p16INK4a pozitivne i negativne gotovo slične. Može se zaključiti da p16INK4a status igra ulogu u prognozi kod nerizičnih bolesnika, dok kod kontrola, koje konzumiraju alkohol i puše, p16INK4a nije značajan u prognozi ishoda bolesti. Ova razlika u preživljenju možda proizlazi iz veće učestalosti p16INK4a pozitivnih među ispitanicima, nego među kontrolama. Negativni trend povezan s p16INK4a pozitivnim ispitanicima je vidljiv i u cjelokupnoj populaciji koja je p16INK4a pozitivna.

Između ispitanika i kontrolne grupe postojala je statistički značajna razlika u imunohistokemijskom p16INK4a statusu ($p=0,0134$), odnosno značajno veći broj nepušača i nekonzumenata alkohola je bio p16INK4a pozitivan. Ako shvatimo protein p16INK4a kao surogat marker HPV infekcije i one bolesnike koji pokazuju ekspresiju navedenog proteina kao HPV pozitivne, onda ovo potkrepljuje hipotezu našeg istraživanja, odnosno da je HPV infekcija češća kod nerizičnih bolesnika i potvrđuje ono što je poznato za orofaringealni karcinom. Međutim ova teza se nije potvrdila i PCR testiranjem parafinskih preparata. Svega sedam bolesnika, koji su bili p16INK4a

pozitivni, bili su ujedno i HPV PCR pozitivni. Veliki broj od 91 bolesnika koji je bio p16INK4a negativan je bio i PCR HPV negativan, a 34 bolesnika koji su bili p16INK4a negativni bili su pozitivni na HPV PCR-om. Ovo se može objasniti time da je HPV kod tih bolesnika vjerojatno bio transkripcijski neaktivan, odnosno nije vršio sintezu svojih proteina pa nije došlo do pozitivne imunohistokemijske reakcije na protein p16INK4a. Kod 22 bolesnika, koji su pokazali pozitivnu imunohistokemijsku reakciju na p16INK4a, suprotno očekivanome, nije se uspjelo PCR-om detektirati HPV DNA. Postoje dva objašnjenja pozitivnih p16INK4a i negativnih HPV PCR rezultata. S obzirom da smo istraživanje radili na parafinskim blokovima, moguće je da se DNA u preparatima toliko denaturirala i križno povezala da se HPV DNA, koja je možda i bila prisutna, nije mogla detektirati čak ni s početnicom male veličine i visoke specifičnosti. Drugo objašnjenje je da povišena prisutnost proteina p16INK4a nije povezana s HPV-om i da je posljedica općenito onkogenog staničnog stresa. Kod anogenitalnih karcinoma dokazana je jasna povezanost između povišene razine proteina p16INK4a i HPV infekcije.¹⁹⁸⁻²⁰⁰ Čak je i kod orofaringealnih/tonzilarnih karcinoma dokazana čvrsta povezanost pozitivne p16INK4a reakcije i HPV-a.^{201,202} Kod karcinoma usne šupljine nekoliko studija nije uspjelo dokazati povezanost između HPV infekcije i ekspresije p16INK4a. Weinberger i suradnici²⁰³ su istražujući p16INK4a ekspresiju kod orofaringealnih karcinoma prvi ukazali na postojanje 3 skupine bolesnika HPV+/p16INK4a+, HPV+/p16INK4a-, HPV-/p16INK4a-. HPV+/p16INK4a+ skupina bolesnika je bila povezana s izrazito boljom prognozom. U toj studiji samo jedan tumor je bio pozitivan na p16INK4a, a HPV negativan te nije uvršten u analizu rezultata. Možda je tu napravljena greška jer, kako vidimo, u studiji su samo orofaringealni karcinomi, a postoji značajan broj posebice neorofaringealnih tumora koji pokazuju povećanu ekspresiju p16INK4a, a HPV PCR su negativni. Hoffman i suradnici²⁰⁴ su među raznim tumorima glave i vrata pronašli 13 slučajeva p16INK4a pozitivnih, a HPV PCR negativnih tumora. U studiju je bilo uključeno osam karcinoma u usnoj šupljini (sve karcinomi jezika) od čega je jedan bio HPV+/p16INK4a+, jedan HPV+/p16INK4a- a čak tri HPV-/p16INK4a+, što bi značilo da je čak 37% karcinoma usne šupljine bilo p16INK4a+ a HPV-. Razlog povišenog proteina p16INK4a u odsustvu HPV-a autori vide u nekim drugim razlozima staničnog stresa koji uzrokuje povišenu ekspresiju navedenog proteina. Klingenberg i suradnici²⁰⁵ su analizirajući prisutnost HPV-a i razinu ekspresije

p16INK4a u zdravim tonzilama nakon tonzilektomije, pronašli samo 1% HPV pozitivnih tonzila, a čak 28% ih je pokazalo pozitivnu reakciju na p16INK4a. Iz svega su zaključili da povišena razina p16INK4a ne mora biti povezana s HPV-om već i s nekim drugim čimbenicima. Nemes i suradnici⁹⁸ su analizirali povezanost HPV infekcije i ekspresije proteina p16INK4a, p53 i Rb u karcinomima usne šupljine. HPV DNA je nađena u 41% slučajeva te, kao ni u našem istraživanju, HPV status nije bio povezan s odsustvom pušenja i alkohola. p16INK4a je bio pozitivan kod 13% HPV pozitivnih tumora te kod 20% HPV negativnih tumora. Autori zaključuju da je ekspresija proteina p16INK4a neovisna o HPV statusu kod karcinoma usne šupljine te da se karcinomi usne šupljine razlikuju od anogenitalnih po molekularnim karakteristikama i karcinogenim mehanizmima. Slične podatke smo dobili i mi u našem istraživanju. p16INK4a je bio pozitivan kod 17% HPV pozitivnih i 19% HPV negativnih ($p=0,9180$) te bi isto tako mogli zaključiti da je p16INK4a neovisan o HPV statusu. Lingen i suradnici²⁰⁶ nisu u čak 27 slučajeva, koji su bili p16INK4a pozitivni, našli HPV DNA. Navode da je pozitivna prediktivna vrijednost p16INK4a imunohistokemije relativno niska (41%) te predlažu da p16INK4a ne bi trebao biti surogat marker HPV infekcije kod karcinoma usne šupljine. Duray i suradnici¹⁷⁵ također nisu našli povezanost HPV-a i ekspresije p16INK4a u karcinomima usne šupljine. Kabeya i suradnici¹⁷³ su kod 32 karcinoma jezika imunohistokemijski našli pozitivnu reakciju na p16INK4a kod šest bolesnika, a s obzirom da kod nijednog od 32 PCR-om i ISH nije dokazan HPV, zaključuju da ekspresija proteina p16INK4a nije pouzdan marker HPV infekcije kod karcinoma jezika. Elango i suradnici²⁰⁷ su također kod karcinoma jezika našli nepodudarnost u HPV (48% pozitivnih) i p16INK4a statusu (33% pozitivnih). Čak 15% p16INK4a pozitivnih nije imalo dokazan HPV te autori zaključuju da se radi o ne-HPV induciranoj ekspresiji ili aktivaciji alternativnih puteva prema onkogenezi. Laco i suradnici²⁰⁸ su proveli istraživanje slično našem. Kod 48 karcinoma usne šupljine i 44 orofaringealna, od čega su polovica bili nepušači, ispitala se prisutnost HPV-a i ekspresija p16INK4a. Među karcinomima usne šupljine p16INK4a je bio pozitivan kod 35% (17/48), a HPV kod 15% (7/48) bolesnika što znači da je najmanje 10 bolesnika bilo p16INK4a+/HPV-. Autori nisu dalje razrađivali ovaj rezultat u svom članku. Za orofaringealne karcinome podudarnost p16INK4a i HPV DNA je bila velika, p16INK4a+ je bilo 82% (36/44), a HPV+ 80% (35/44). Dakle kod orofaringealnih karcinoma samo jedan je bio

p16INK4a+/HPV-, slično kao i u originalnom Weinbergerovu istraživanju.²⁰³ Iz ovih rezultata se može zaključiti da je p16INK4a pouzdaniji kod orofaringealnog karcinoma kao marker HPV infekcije, nego kod karcinoma usne šupljine. Preživljenje je bilo bolje za HPV pozitivne, ali ako se zna da je u toj skupini bilo 7 karcinoma usne šupljine i 35 orofaringealnih, onda taj podatak ne začuđuje.

Čak 82% HPV pozitivnih bolesnika u našem istraživanju bi bilo negativno da se koristio predloženi algoritam detekcije HPV-a u tumorima glave i vrata (Smeets, 2007)¹¹⁷ prema kojem se inicijalno radi imunohistokemijsko testiranje na p16INK4a, a otkrivanje HPV DNA samo kod onih koji pokazuju pozitivnu reakciju na p16INK4a. Čak je i sam Smeets¹¹⁷ u svom originalnom članku imao slučajeve HPV-, a p16INK4a+ (svi su bili karcinomi usne šupljine), gdje ni dodatnim testiranjem nije identificirao HPV DNA. Zaključio je da bi se u tom slučaju ti rezultati trebali tretirati kao lažno pozitivni rezultati za p16INK4a imunohistokemiju.

Čak i kada bismo prihvatili ovo tumačenje, tada bi, prema rezultatima našeg istraživanja, svega šest p16INK4a+/HPV- tumora pokazalo slabu ekspresiju p16INK4a i opet ostaje 16 p16INK4a+/HPV- tumora koji su pokazali umjerenu ili snažnu ekspresiju p16INK4a što se svakako ne može smatrati lažno pozitivnim rezultatom. Iz svega navedenog možemo zaključiti da u Weinbergerovu klasifikaciju²⁰³ svakako treba uključiti i četvrtu skupinu HPV-/p16INK4a+. Razlozi za povećanu razinu p16INK4a, a odsustvo HPV-a (detektirano PCR-om) može biti u parafinskim preparatima odnosno denaturiranoj DNA, dakle lažno negativan PCR rezultat, ili neki drugi stanični stresor koji bi uzrokovao povišenu ekspresiju p16INK4a, ili kombinacija oba razloga. p16INK4a kao isključivi ili inicijalni indirektni marker HPV infekcije, barem za karcinom usne šupljine, nije pouzdan za razliku od orofaringealnog karcinoma gdje pokazuje dobru i pouzdanu korelaciju s HPV statusom.

Ako se analiziraju krivulje sveukupnog i specifičnog preživljenja za četiri moguće kombinacije HPV i p16INK4a, onda se, iako nema statistički značajnih razlika, dolazi do također zanimljivih spoznaja. HPV-/p16INK4a- imaju najbolje preživljenje, a HPV+/ p16INK4a+ najgore preživljenje dok su ostale moguće kombinacije između ove dvije krivulje. U originalnom Weinbergerovom članku²⁰³ HPV+/p16INK4a+ su imali daleko najbolje preživljenje, a HPV-/p16INK4a-

najlošije. Međutim u toj studiji se radilo o orofaringealnim karcinomima. Može se zaključiti da iako p16INK4a možda za karcinom usne šupljine nije dobar kao surogat marker HPV infekcije, ipak prognostički gledano ima važnost te bi imunohistokemijsko određivanje p16INK4a svakako trebalo zadržati u kliničkoj praksi.

Iz ovih krivulja preživljenja, gdje HPV i p16INK4a udruženo pokazuju najgoru prognozu, samo se potvrđuju ranije izneseni rezultati Coxove regresijske analize prema kojima neovisno p16INK4a i HPV negativno djeluju na prognozu. Snažnija p16INK4a ekspresija nosi 2,66 puta povećani rizik umiranja od bolesti, a HPV pozitivnost 1,54 puta veći rizik. Sve ovo još je izraženije za bolesnike bez alkohola i pušenja u anamnezi (HR 2,9 i 2,82).

7. ZAKLJUČCI

- Bolesnici koji imaju karcinom usne šupljine, a ne puše i ne konzumiraju alkohol su u velikoj većini žene.
- Bolesnici bez tipičnih rizičnih čimbenika su u većini slučajeva mlađi od 45 godina ili stariji od 70 godina.
- Kod bolesnika bez rizičnih čimbenika prevladavaju karcinomi jezika, gingivalni karcinomi (maksile ili mandibule) te sublingvalni karcinomi.
- Kod bolesnika koji puše i konzumiraju alkohol prevladavaju sublingvalni karcinomi, karcinomi jezika i retromolarni karcinomi.
- U TNM stadiju bolesti, recidivima, drugim primarnim tumorima i preživljenju nema razlike između bolesnika sa i bez tipičnih rizičnih čimbenika.
- Tipičan bolesnik s karcinomom usne šupljine koji puši i svakodnevno konzumira alkohol u prosjeku puši 45 kutija na godinu te pije u prosjeku 33 godine svakodnevno 173 g etanola što je oko 11 pića dnevno (u jednom piću ima 15 g etanola te jedno piće odgovara 125 ml vina, ili 330 ml piva ili 36 ml žestokog pića).
- Između bolesnika s karcinomom usne šupljine koji puše i konzumiraju alkohol i onih koji to ne rade, nema statistički značajne razlike u učestalosti HPV-a (31% prema 22%; $p=0,2740$).
- Iako nema razlike u učestalosti HPV-a između ispitanika i kontrola, kod ispitanika je rizik od umiranja čak 2,82 puta veći za HPV pozitivne nego za HPV negativne te za tu grupu predstavlja bitan prognostički čimbenik.
- Nešto više od četvrtine (27%) svih karcinoma usne šupljine je povezano s virusom HPV-a dokazanog PCR-om neovisno o alkoholu i pušenju.
- Najčešći su visokorizični genotipovi HPV-a (85%) i to tip 16 (45,7%), tip 31 (11,4%), tipovi 18, 52 i 58 (svaki po 5,7%), te tipovi 33, 45, 51, 52 i 53 (svaki po 2,9%).
- Od niskorizičnih HPV genotipova najčešći je tip 6 (8,57%), tip 43 i 54 (svaki sa po 2,9%).
- Bolesnici s HPV pozitivnim i negativnim karcinomima se bitno ne razlikuju po dobi, spolu, anatomskim lokalizacijama tumora intraoralno, veličini primarnog tumora, stadiju, pojavi drugih primarnih tumora.

- Bolesnici s HPV pozitivnim karcinomima češće imaju regionalne metastaze ($p=0,0327$).
- Bolesnici s HPV pozitivnim karcinomima češće imaju recidive (32%) u odnosu na HPV negativne (21%).
- Sveukupno i specifično petogodišnje preživljenje HPV pozitivnih i negativnih se statistički bitno ne razlikuje iako je preživljenje HPV pozitivnih nešto lošije (65% i 75% prema 74% i 81%).
- Svi HPV pozitivni bolesnici imaju 1,56 puta veći rizik od umiranja od bolesti u odnosu na HPV negativne bolesnike.
- Bolesnici koji nemaju rizičnih čimbenika imaju značajnije povišenu ekspresiju proteina p16INK4a (27% prema 10%; $p=0,0134$) u karcinomima usne šupljine.
- Malo manje od petine (19%) svih bolesnika s karcinomom usne šupljine ima povišenu ekspresiju proteina p16INK4a.
- Nema razlike po dobi, spolu, anatomskim lokalizacijama, HPV statusu, TNM stadiju i drugim primarnim tumorima između p16INK4a pozitivnih i negativnih.
- Recidivi su češći kod bolesnika koji imaju snažniju ekspresiju proteina p16INK4a ($p=0,0463$).
- Snažnija ekspresija proteina p16INK4a kod karcinoma usne šupljine povezana je i sa značajno lošijim specifičnim preživljenjem ($p=0,0501$).
- Rizik umiranja od bolesti povezan sa snažnijom p16INK4a ekspresijom je 2,22 za cjelokupnu populaciju, a čak 2,9 za ispitanike i predstavlja bitan prognostički čimbenik.
- Izrazito lošije specifično preživljenje ima karcinom jezika koji je pozitivan na p16INK4a ($p=0,002$).
- Korelacija između povišene ekspresije p16INK4a i prisutnosti HPV-a u karcinomu usne šupljine je slaba, kod 75% pozitivnih na p16INK4a ne može se PCR-om dokazati HPV DNA.
- Protein p16INK4a kao surogat marker u karcinomu usne šupljine nije pouzdan te ne može služiti kao jedina ili metoda probira u dokazivanju HPV-a kod karcinoma usne šupljine, već se mora kombinirati s drugim osjetljivijim (PCR) ili specifičnijim metodama (ISH).

- Bitno je odrediti i p16INK4a status imunohistokemijski i HPV status nekom od direktnih metoda, pogotovo za bolesnike bez tipičnih rizičnih čimbenika, jer ova dva parametra predstavljaju bitan prognostički čimbenik.

8. SAŽETAK

Karcinom u usnoj šupljini obično nastaje kao posljedica dugogodišnjeg konzumiranja alkohola i pušenja cigareta. Samo u oko 10% slučajeva nalazimo karcinom usne šupljine kod bolesnika koji ne konzumiraju alkohol i ne puše cigarete. Unatoč smanjenom trendu pušenja i konzumiranja alkohola primjećen je porast karcinoma usne šupljine. Humani papiloma virus (HPV) je već povezan s orofaringealnim karcinomom, pogotovo kod nepušača i nealkoholičara. Takva povezanost još uvijek nije sa sigurnošću utvrđena za karcinom usne šupljine kod nerizične populacije.

Hipoteza istraživanja je da je učestalost visokorizičnih tipova HPV-a, poglavito tipova 16 i 18, veća kod nerizične populacije s karcinomom usne šupljine nego kod bolesnika s tipičnim rizičnim čimbenicima, što bi ukazalo na povezanost HPV-a i karcinoma usne šupljine kod nerizične populacije.

Svi uključeni bolesnici su primarno kirurški liječeni na Klinici za kirurgiju lica, čeljusti i usta, KB Dubrava, Zagreb od 1995. g. do 2010. g. i imali su histološki dokazan planocelularni karcinom u usnoj šupljini. Podijeljeni su u dvije grupe: oni koji svakodnevno konzumiraju alkohol i/ili puše više od 10 kutija na godinu (kontrola) i oni koji nemaju te rizične navike u anamnezi (ispitanici). Obje skupine bolesnika su uspoređene s obzirom na HPV status, dob i spol, preživljenje, pojavu drugih primarnih tumora, recidiva te lokalizacije u usnoj šupljini gdje se karcinom pojavljuje. U dokazivanju prisutnosti HPV-a koristili smo se indirektnim dokazivanjem imunohistokemijskom metodom usmjereno na protein p16INK4a te direktnim dokazivanjem PCR genotipizacijom virusa metodom amplifikacije i analize DNA.

Bilo je 77 ispitanika i 77 randomiziranih kontrola. Među ispitanicima su prevladavale žene (75%), dok su među kontrolama prevladavali muškarci (90%) te je razlika bila statistički značajna ($p < 0,001$). Raspon dobi među ispitanicima je bio veći. Najmlađi bolesnik je imao 24 a najstariji 90 godina te su, gledano po dobnim skupinama, nešto više od polovice činili mlađi od 45 i stariji od 70 godina. Među kontrolama su pak prevladavali bolesnici srednjih godina (79%). Ispitanici su imali i nešto drugačiju raspodjelu karcinoma u usnoj šupljini. Najčešći je bio jezik (42%),

zatim sublingvalno (17%) te gingiva maksile (13%) i mandibule (12%) dok su kontrole imale najčešće sublingvalni karcinom (39%), karcinom jezika (34%), retromolarni karcinom (17%). Ispitanici su se nešto češće javljali s manjim tumorima (T1 i T2) bez regionalnih metastaza (N0). Nije bilo razlike u stadiju, broju recidiva ili drugih primarnih tumora.

Suprotno hipotezi nije bilo statistički značajne razlike u HPV PCR statusu. Čak su kontrole bile pozitivnije na HPV od ispitanika (31% prema 22%). Ukupno je 27% bolesnika s karcinomom usne šupljine bilo pozitivno na HPV. Muškarci su češće bili HPV pozitivni (68%). HPV pozitivni su bili nešto mlađi od negativnih, ali ne statistički značajno (56 prema 60 godina). HPV pozitivni bolesnici su češće imali regionalne metastaze (39% prema 23%). U veličini primarnog tumora, ukupnom stadiju i drugim primarnim tumorima nije bilo značajne razlike. Iako su u pojavi recidiva i preživljenju HPV pozitivni bolesnici imali nešto lošiji ishod, nije bilo statistički značajne razlike.

Ako shvatimo ekspresiju p16INK4a kao indirektni pokazatelj HPV infekcije onda se hipoteza istraživanja potvrdila, odnosno p16INK4a je bio pozitivan kod 27% ispitanika te 10% kontrola ($p=0,0064$), tj. HPV je u karcinomu usne šupljine češći kod nepušača i onih koji ne konzumiraju alkohol. Međutim rezultati PCR analize nisu ovo potvrdili niti u velikoj mjeri korelirali s rezultatima imunohistokemijskog ispitivanja. Svi koji su p16INK4a pozitivni bi trebali biti i HPV pozitivni PCR-om. To je bio slučaj kod samo sedam bolesnika dok ih je 22 bilo p16INK4a pozitivno, a HPV negativno. Može se dakle zaključiti da za karcinom usne šupljine p16INK4a imunohistokemijsko dokazivanje nije pouzdan indirektni test za HPV. Nije bilo statistički značajnih razlika između p16INK4a pozitivnih i negativnih u spolu, dobi, dobnim skupinama, anatomskim lokalizacijama tumora, TNM stadiju, broju drugih primarnih tumora ili HPV statusu. Značajno su više recidiva imali oni koju pokazivali jaču ekspresiju p16INK4a i bili su povezani sa značajno lošijim preživljenjem, a pogotovo karcinomi jezika.

I HPV i p16INK4a imaju određenu prediktivnu ulogu u preživljenju. Kada su pozitivna oba, preživljenje je najlošije za razliku od slučaja kada su oba negativna. Osobito negativni prognostički predznak nose za bolesnike bez rizičnih čimbenika. Rizik od umiranja je čak 2,8 puta veći ako je HPV pozitivan, a 2,9 puta veći ako

tumor pokazuje izrazitu p16INK4a ekspresiju. S obzirom da prema ovoj studiji ne koreliraju, trebalo bi u kliničkoj praksi određivati i HPV direktnom metodom (PCR ili ISH) i p16INK4a imunohistokemijski jer time možemo dobiti vrijedne podatke o prognozi bolesnika.

9. SUMMARY

Oral cavity cancer is usually the result of heavy smoking and longstanding alcohol consumption. Only around 10% of oral cancer patients neither smoke nor drink. In western countries, there is a rising trend in oral cancer in those who neither smoke nor drink alcohol. Human papilloma virus (HPV) has already been linked to oropharyngeal cancer, especially in those who neither drink nor smoke. This relationship between HPV and oral cancer has not yet been established, with previous results being controversial.

We have hypothesised that the frequency of high risk HPV types, especially types 16 and 18, is increased in non smokers non drinkers (NSND) who develop oral cancer. This would therefore link HPV involvement in oral carcinogenesis in this population.

Only patients with oral squamous cell carcinoma treated primarily with surgery in the Department of Maxillofacial Surgery, University Hospital Dubrava, Zagreb, from 1995 to 2010 were included in the study. Patients were divided into two groups. The first group consisted of smokers of more than 10 pack/year who were also daily drinkers. The second group consisted of NSND and included those of less than 10 pack/year active smokers. HPV status, age, gender, anatomic locations of the tumour, stage, second primary tumours, recurrence and survival were compared between the two groups. HPV was detected directly with PCR method and indirectly with p16INK4a immunohistochemistry.

There were 77 non smokers non drinkers and 77 controls (smokers and drinkers, SD). Women were more frequent among NSND group (75%) versus more males among SD (90%), $p < 0,001$. The age range was greater among NSND, with the youngest patient 24 years old and the oldest one 90 years old. More than half of the patients were younger than 45 or older than 70 years. The SD group were middle aged (45-69 years) in 79%. The tongue was the most frequent tumour site in oral cavity among NSND (42%) followed by the sublingual region (17%), upper gum (13%) and lower gum (12%). In the control group (smokers and drinkers), sublingual cancer was the most frequent site (39%), followed by tongue cancer (34%) and then retromolar cancer (17%). The NSND group had smaller cancers (T1 and T2) without regional

metastasis (N0), although there was no statistical significance. No difference in recurrence or second primary tumour (SPT) was observed between the two patient groups.

HPV detected by PCR was less frequent among the NSND group. Only 22% of NSND were positive for HPV, compared with 31% of SD. HPV was positive in 27% of all oral cancer patients which is similar to previous published results. Men were more frequently HPV positive (68%) than women. HPV positive patients tended to be younger than HPV negative patients (56 years vs 60 years) but without statistical significance. Regional metastasis (N) correlated significantly more with HPV positivity (39% vs 23%) although there was no difference in primary tumour (T) or stage. Similar rate of SPT was observed between the two groups. HPV positive patients had a greater incidence of recurrences and worse survival, but this was not statistically significant.

If p16INK4a expression is considered as surrogate marker of HPV infection, we have confirmed the hypothesis of the study that high risk HPV groups are more frequently seen in NSND oral cancer patients than in SD patients with oral cancer. p16INK4a was positive in 27% of NSND and only 10% of SD ($p=0,0064$). However, PCR results did not support the above hypothesis and the overall correlation between p16INK4a and HPV was weak. All p16INK4a positive patients should be HPV positive if it is sensitive as a surrogate marker, but this was the case in only 7 out of 29 patients. 22 out of 29 patients were p16INK4a positive and HPV negative. Based on our findings and those of other studies, we cannot support the use of p16INK4a immunostaining as the only test for HPV in oral cancer.

No statistically significant difference was observed between p16INK4a positive and negative patients according to age, sex, anatomic tumour locations, stage, SPT or HPV status. A higher rate of recurrences was associated with stronger p16INK4a expression, and this trend was also observed in survival curves. Stronger p16INK4a expression had worse survival outcomes, particularly among tongue cancers.

Both HPV PCR and p16INK4a may be extrapolated for survival and prognostic purposes. When both are positive, survival outcomes are worse while best survival is associated with negative HPV PCR and p16INK4a. NSND that is HPV positive has 2.8 hazard ratio and strong p16INK4a expression carries 2.9 hazard ratio for the same

population. According to this study, correlation between HPV and p16INK4a is very weak. In clinical practice, patients should be routinely tested for HPV using PCR and p16INK4a immunohistochemistry in order to give us valuable information regarding their prognosis.

10. POPIS LITERATURE

1. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision, <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2010/en>
2. Howlader N, Noone AM, Krapcho M i sur. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009 (Vintage 2009 populations). Bethesda, Maryland: National Cancer Institute; 2012.
3. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2012. Atlanta: American Cancer Society; 2012.
4. Dikshit R, Gupta PC, Ramasundarahettige C i sur. Cancer mortality in India: a nationally representative survey. *Lancet* 2012;379:1807-16.
5. Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Instituto Nacional de Câncer, Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estimativas 2010: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA: 2010. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=tabelaestados.asp&UF=BR>
6. International Agency for Research on Cancer. Tobacco smoking. IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum 38. Lyon: IARC; 1986.
7. Lazarus P, Stern J, Zwiebel N, Fair A, Richie JP Jr, Schantz S. Relationship between p53 mutation incidence in oral cavity squamous cell carcinomas and patient tobacco use. *Carcinogenesis* 1996;17:733-9.
8. Jaber MA, Porter SR, Gilthorpe MS, Bedi R, Scully C. Risk factors for oral epithelial dysplasia - the role of smoking and alcohol. *Oral Oncol* 1999;35:151-6.
9. Castellsagué X, Quintana MJ, Martínez MC i sur. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *Int J Cancer* 2004;108:741-9.
10. National Institutes of Health Consensus Development Conference statement: health implications of smokeless tobacco use. January 13-15, 1986. *CA Cancer J Clin* 1986;36:310-6.
11. Boffetta P, Hecht S, Gray N, Gupta P, Straif K. Smokeless tobacco and cancer. *Lancet Oncol* 2008;9:667-75.
12. Bagnardi V, Blangiardo M, La Vecchia C, Corrao G. A meta-analysis of alcohol drinking and cancer risk. *Br J Cancer* 2001;85:1700-5.

13. Znaor A, Brennan P, Gajalakshmi V i sur. Independent and combined effects of tobacco smoking, chewing and alcohol drinking on the risk of oral, pharyngeal and esophageal cancers in Indian men. *Int J Cancer* 2003;105:681–6.
14. Macan D. Uloga alkohola u nastanku karcinoma usne šupljine (disertacija). Zagreb: Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 1999.
15. Goldstein BY, Chang SC, Hashibe M, La Vecchia C, Zhang ZF. Alcohol consumption and cancers of the oral cavity and pharynx from 1988 to 2009: an update. *Eur J Cancer Prev* 2010;19:431-65.
16. Silverberg E. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 1985;35:19-35.
17. Betel-quid and areca-nut chewing. *IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum* 1985;37:137-202.
18. Moore MA, Ariyaratne Y, Badar F i sur. Cancer epidemiology in South Asia - past, present and future. *Asian Pac J Cancer Prev* 2010;11Suppl2:49-66.
19. Lee CH, Lee KW, Fang FM i sur. The neoplastic impact of tobacco-free betel-quid on the histological type and the anatomical site of aerodigestive tract cancers. *Int J Cancer* 2012;131:e733-43.
20. Shah SM, Merchant AT, Luby SP, Chotani RA. Addicted schoolchildren: prevalence and characteristics of areca nut chewers among primary schoolchildren in Karachi, Pakistan. *J Paediatr Child Health* 2002;38:507–10.
21. Gandini S, Negri E, Boffetta P, La Vecchia C, Boyle P. Mouthwash and oral cancer risk quantitative meta-analysis of epidemiologic studies. *Ann Agric Environ Med* 2012;19:173-80.
22. Larsson LG, Sandström A, Westling P. Relationship of Plummer-Vinson disease to cancer of the upper alimentary tract in Sweden. *Cancer Res* 1975;35:3308-16.
23. Levi F, Pasche C, La Vecchia C, Lucchini F, Franceschi S, Monnier P. Food groups and risk of oral and pharyngeal cancer. *Int J Cancer* 1998;77:705-9.
24. Homann N, Tillonen J, Rintamäki H, Salaspuro M, Lindqvist C, Meurman JH. Poor dental status increases acetaldehyde production from ethanol in saliva: a possible link to increased oral cancer risk among heavy drinkers. *Oral Oncol* 2001;37:153-8.
25. Velly AM, Franco EL, Schlecht N i sur. Relationship between dental factors and risk of upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncol* 1998;34:284-91.

26. Negri E, Boffetta P, Berthiller J i sur. Family history of cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Int J Cancer* 2009;124:394–401.
27. Pindborg JJ. *Oral cancer and precancer*. Bristol: John Wright & Sons Ltd; 1980, str. 15–19.
28. Kramer IR, Lucas RB, Pindborg JJ, Sobin LH. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1978;46:518–39.
29. van der Wall I. Potentially malignant disorders of the oral mucosa and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol* 2009;45:317–23.
30. Liu W, Wang YF, Zhou HW, Shi P, Zhou ZT, Tang GY. Malignant transformation of oral leukoplakia: a retrospective cohort study of 218 Chinese patients. *BMC Cancer* 2010;10:685.
31. van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; present concepts of management. *Oral Oncol* 2010;46:423-5.
32. Amagasa T, Yamashiro M, Ishikawa H. Oral leukoplakia related to malignant transformation. *Oral Sci Int* 2006;3:45-55.
33. Amagasa T. Oral premalignant lesions. *Int J Clin Oncol* 2011;16:1-4.
34. Reichart PA, Philipsen HP. Oral erythroplakia - a review. *Oral Oncol* 2005;41:55-61.
35. Bermejo-Fenoll A, Sanchez-Siles M, López-Jornet P, Camacho-Alonso F, Salazar-Sanchez N. Premalignant nature of oral lichen planus. A retrospective study of 550 oral lichen planus patients from south-eastern Spain. *Oral Oncol* 2009;45:e54-6.
36. Angadi PV, Rao S. Management of oral submucous fibrosis: an overview. *Oral Maxillofac Surg* 2010;14:133-42.
37. Greene FL, Page DL, Fleming ID i sur, ur. *AJCC Cancer Staging Manual*. 6. izd. New York, NY: Springer; 2002.
38. Moore C, Flynn MB, Greenberg A. Evaluation of size in prognosis of oral cancer. *Cancer* 1986;58:158-62.

39. Takes RP, Rinaldo A, Silver CE i sur. Distant metastases from head and neck squamous cell carcinoma. Part I. Basic aspects. *Oral Oncol* 2012;48:775-9.
40. Shah JP. Patterns of cervical lymph node metastasis from squamous carcinomas of the upper aerodigestive tract. *Am J Surg* 1990;160:405-9.
41. Reiner B, Siegel E, Sawyer R, Brocato RM, Maroney M, Hooper F. The impact of routine CT of the chest on the diagnosis and management of newly diagnosed squamous cell carcinoma of the head and neck. *AJR Am J Roentgenol* 1997;169:667-71.
42. Shah JP. *Head and neck surgery and oncology*. 3. izd. St. Louis: Mosby; 2003.
43. Ariyan S, ur. *Cancer of the head and neck*. St. Louis: Mosby; 1987, str. 197-250.
44. Martin HE, ur. *Surgery of head and neck tumors*. New York: Hoeber-Harper; 1957, str. 9-10.
45. Stanley RB. Mandibular lingual releasing approach to oral and oropharyngeal carcinomas. *Laryngoscope* 1984;94:596-600.
46. Spiro RH, Gerold FP, Strong EW. Mandibular "swing" approach for oral and oropharyngeal tumors. *Head Neck Surg* 1981;3:371-8.
47. Jacobs C, Makuch R. Efficacy of adjuvant chemotherapy for patients with resectable head and neck cancer: A subset analysis of the Head and Neck Contracts Program. *J Clin Oncol* 1990;8:838-47.
48. Munoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol* 2000;19:1-5.
49. Hadžisejdić I, Grce M, Grahovac B. Humani papiloma virus i karcinom cerviksa: mehanizmi karcinogeneze, epidemiologija, dijagnostika i profilaksa. *Medicina Fluminensis* 2010;46:112-23.
50. Yugawa T, Kiyono T. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Rev Med Virol* 2009;19:97-113.
51. Yim EK, Park JS. The role of HPV E6 and E7 oncoproteins in HPV-associated cervical carcinogenesis. *Cancer Res Treat* 2005;37:319-24.
52. zur Hausen H, Meinhof W, Scheiber W, Bornkamm GW. Attempts to detect virus-specific DNA sequences in human tumors: nucleic acid by hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer* 1974;13:650-6.

53. zur Hausen H. Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res* 1976;36:530.
54. zur Hausen H. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol* 1977;78:1-30.
55. Carbone M, Klein G, Gruber J, Wong M. Modern criteria to establish human cancer etiology. *Cancer Res* 2004;64:5518-24.
56. Faridi R, Zahra A, Khan K, Idrees M. Oncogenic potential of Human Papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. *Viol J* 2011;8:269.
57. Syrjänen KJ, Syrjänen SM, Lamberg MA, Pyrhönen S. Human papillomavirus (HPV) involvement in squamous cell lesions of the oral cavity. *Proc Finn Dent Soc* 1983;79:1-8.
58. Chang F, Syrjänen S, Nuutinen J, Kärjä J, Syrjänen K. Detection of human papillomavirus (HPV) DNA in oral squamous cell carcinomas by in situ hybridization and polymerase chain reaction. *Arch Dermatol Res* 1990;282:493-7.
59. Shin KH, Min BM, Cherrick HM, Park NH. Combined effects of human papillomavirus-18 and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine on the transformation of normal human oral keratinocytes. *Mol Carcinog* 1994;9:76-86.
60. zur Hausen H, de Villiers EM, Gissmann L. Papillomavirus infections and human genital cancer. *Gynecol Oncol* 1981;12:124-8.
61. El-Mofty SK. Human papillomavirus (HPV) related carcinomas of the upper aerodigestive tract. *Head Neck Pathol* 2007;1:181-5.
62. Pai SI, Westra WH. Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment. *Annu Rev Pathol* 2009;4:49-70.
63. Frisch M, Hjalgrim H, Jaeger AB, Biggar RJ. Changing patterns of tonsillar squamous cell carcinoma in the United States. *Cancer Causes Control* 2000;11:489-95.
64. Shiboski CH, Schmidt BL, Jordan RC. Tongue and tonsil carcinoma: increasing trends in the U.S. population ages 20–44 years. *Cancer* 2005;103:1843-9.
65. Näsman A, Attner P, Hammarstedt L i sur. Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: an epidemic of viral-induced carcinoma? *Int J Cancer* 2009;125:362-6.

66. Syrjänen S. HPV infections, tonsillar carcinoma. *J Clin Pathol* 2004;57:449-55.
67. Hammarstedt L, Lindquist D, Dahlstrand H i sur. Human papillomavirus as a risk factor for the increase in incidence of tonsillar cancer. *Int J Cancer* 2006;119:2620-3.
68. 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.
69. Termine N, Panzarella V, Falaschini S i sur. HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988–2007). *Ann Oncol* 2008;19:1681-90.
70. Andrews E, Seaman WT, Webster-Cyriaque J. Oropharyngeal carcinoma in non-smokers and non-drinkers: a role for HPV. *Oral Oncol* 2009;45:486-91.
71. Hemminki K, Dong C, Frisch M. Tonsillar and other upper aerodigestive tract cancers among cervical cancer patients and their husbands. *Eur J Cancer Prev* 2000;9:433-7.
72. Gillison ML, Koch WM, Capone RB 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.
73. Fakhry C, Westra WH, Li S i sur. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:261-9.
74. Gillison ML. HPV and prognosis for patients with oropharynx cancer. *Eur J Cancer* 2009;45Suppl1:383-5.
75. Isayeva T, Li Y, Maswahu D, Brandwein-Gensler M. Human papillomavirus in non-oropharyngeal head and neck cancers: a systematic literature review. *Head Neck Pathol* 2012;6Suppl1:104-20.
76. Larson DA, Derkay CS. Epidemiology of recurrent respiratory papillomatosis. *APMIS* 2010;118:450-4.
77. Lawson W, Schlecht NF, Brandwein-Gensler M. The role of the human papillomavirus in the pathogenesis of Schneiderian inverted papillomas: an analytic overview of the evidence. *Head Neck Pathol* 2008;2:49-59.

78. Hafed L, Farag H, Shaker O, El-Rouby D. Is human papilloma virus associated with salivary gland neoplasms? An in situ-hybridization study. *Arch Oral Biol* 2012;57:1194-9.
79. Vageli D, Sourvinos G, Ioannou M, Koukoulis GK, Spandidos DA. High-risk human papillomavirus (HPV) in parotid lesions. *Int J Biol Markers* 2007;22:239-44.
80. Atula T, Grénman R, Klemi P, Syrjänen S. Human papillomavirus, Epstein-Barr virus, human herpesvirus 8 and human cytomegalovirus involvement in salivary gland tumours. *Oral Oncol* 1998;34:391-5.
81. Syrjänen S, Syrjänen K . HPV infections of the oral mucosa. U: Syrjänen K, Syrjänen S, ur. *Papillomavirus infections in human pathology*. New York: J. Wiley & Sons; 2000, str. 379-412.
82. Kreimer AR, Bhatia RK, Messegue AL, Gonzalez P, Herrero R, Giuliano AR. Oral human papillomavirus in healthy individuals: a systematic review of the literature. *Sex Transm Dis* 2010;37:386-91.
83. Miller CS, White DK. Human papillomavirus expression in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma: a retrospective review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996;82:57-68.
84. Miller CS, Johnstone BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;91:622-35.
85. Rivero ER, Nunes FD. HPV in oral squamous cell carcinomas of a Brazilian population: amplification by PCR. *Pesqui Odontol Bras* 2006;20:21-4.
86. Young SK, Min KW. In situ DNA hybridization analysis of oral papillomas, leukoplakias, and carcinomas for human papillomavirus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1991;71:726-9.
87. Zeuss MS, Miller CS, White DK. In situ hybridization analysis of human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1991;71:714-20.
88. Koyama K, Uobe K, Tanaka A. Highly sensitive detection of HPV-DNA in paraffin sections of human oral carcinomas. *J Oral Pathol Med* 2007;36:18-24.

89. Sugiyama M, Bhawal UK, Kawamura M i sur. Human papillomavirus-16 in oral squamous cell carcinoma: clinical correlates and 5-year survival. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2007;45:116-22.
90. González-Moles MA, Ruiz-Avila I, González-Moles S, Martinez I, Ceballos A, Nogales F. Detection of HPV DNA by in situ hybridization in benign, premalignant and malignant lesions of the oral mucosa. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol* 1994;37:79–85.
91. Gichki AS, Buajeeb W, Doungudomdacha S, Khovidhunkit SO. Detection of human papillomavirus in normal oral cavity in a group of Pakistani subjects using real-time PCR. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13:2299-304.
92. Shindoh M, Chiba I, Yasuda M i sur. Detection of human papillomavirus DNA sequences in oral squamous cell carcinomas and their relation to p53 and proliferating cell nuclear antigen expression. *Cancer* 1995;76:1513-21.
93. Mao EJ, Schwartz SM, Daling JR, Oda D, Tickman L, Beckmann AM. Human papilloma viruses and p53 mutations in normal pre-malignant and malignant oral epithelia. *Int J Cancer* 1996;69:152-8.
94. Wen S, Tsuji T, Li X, Mizugaki Y, Hayatsu Y, Shinozaki F. Detection and analysis of human papillomavirus 16 and 18 homologous DNA sequences in oral lesions. *Anticancer Res* 1997;17:307-11.
95. Badaracco G, Venuti A, Morello R, Muller A, Marcante ML. Human papillomavirus in head and neck carcinomas: prevalence, physical status and relationship with clinical/pathological parameters. *Anticancer Res* 2000;20:1301-5.
96. Nagpal JK, Patnaik S, Das BR. Prevalence of high-risk human papilloma virus types and its association with P53 codon 72 polymorphism in tobacco addicted oral squamous cell carcinoma (OSCC) patients of Eastern India. *Int J Cancer* 2002;97:649-53.
97. Fregonesi PA, Teresa DB, Duarte RA, Neto CB, de Oliveira MR, Soares CP. p16(INK4A) immunohistochemical overexpression in premalignant and malignant oral lesions infected with human papillomavirus. *J Histochem Cytochem* 2003;51:1291-7.

98. Nemes JA, Deli L, Nemes Z, Marton IJ. Expression of p16(INK4A), p53, and Rb proteins are independent from the presence of human papillomavirus genes in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102:344-52.
99. Kojima A, Maeda H, Sugita Y, Tanaka S, Kameyama Y. Human papillomavirus type 38 infection in oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2002;38:591-6.
100. Zhang ZY, Sdek P, Cao J, Chen WT. Human papillomavirus type 16 and 18 DNA in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004;33:71-4.
101. Deng Z, Hasegawa M, Matayoshi S i sur. Prevalence and clinical features of human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma in Okinawa, southern Japan. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2011;268:1625-31.
102. Koppikar P, deVilliers EM, Mulherkar R. Identification of human papillomaviruses in tumors of the oral cavity in an Indian community. *Int J Cancer* 2005;113:946-50.
103. Chen PC, Kuo C, Pan CC, Chou MY. Risk of oral cancer associated with human papillomavirus infection, betel quid chewing, and cigarette smoking in Taiwan - an integrated molecular and epidemiological study of 58 cases. *J Oral Pathol Med* 2002;31:317-22.
104. Zhu C, Ling Y, Dong C, Zhou X, Wang F. The relationship between oral squamous cell carcinoma and human papillomavirus: a meta-analysis of a Chinese population (1994-2011). *PLoS One* 2012;7:e36294.
105. Kansky AA, Poljak M, Seme K i sur. Human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas and normal oral mucosa. *Acta Virol* 2003;47:11-6.
106. van Rensburg EJ, van Heerden WF, Venter EH, Raubenheimer EJ. Detection of human papillomavirus DNA with in situ hybridisation in oral squamous carcinoma in a rural black population. *S Afr Med J* 1995;85:894-6.
107. van Rensburg EJ, Engelbrecht S, Van Heerden WF, Raubennheimer EJ, Schoub BD. Human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas from an African population sample. *Anticancer Res* 1996;16:969-73.

108. Boy S, van Rensburg EJ, Engelbrecht S, Dreyer L, van Heerden M, van Heerden W. HPV detection in primary intraoral squamous cell carcinomas - commensal, aetiological agent or contamination? *J Oral Pathol Med* 2006;35:86-90.
109. Ibrahim SO, Bertelsen B, Kalvenes MB i sur. Expression of keratin 13, 14 and 19 in oral squamous cell carcinomas from Sudanese snuff dippers: lack of association with human papillomavirus infection. *APMIS* 1998;106:959-69.
110. Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomavirus in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004;68:362-72.
111. Herrero R, Castellsagué X, Pawlita M i sur. IARC Multicenter Oral Cancer Study Group. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:1772-83.
112. Agoston ES, Robinson SJ, Mehra KK i sur. Polymerase chain reaction detection of HPV in squamous carcinoma of the oropharynx. *Am J Clin Pathol* 2010;134:36-41.
113. Snijders PJ, Heideman DA, Meijer CJ. Methods for HPV detection in exfoliated cell and tissue specimens. *APMIS* 2010;118:520-8.
114. Nuovo GJ. In situ detection of human papillomavirus DNA after PCR-amplification. *Methods Mol Biol* 2011;688:35-46.
115. Lörincz AT. Molecular methods for the detection of human papillomavirus infection. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1996;23:707-30.
116. Garland SM, Tabrizi S. *Methods for HPV Detection: Polymerase Chain Reaction Assays*. U: Monsonego J, ur. *Emerging Issues on HPV Infections: From Science to Practice*. Basel: Karger; 2006, str. 63–72.
117. Smeets SJ, Hesselink AT, Speel EJ i sur. A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *Int J Cancer* 2007;121:2465-72.
118. Molden T, Kraus I, Skomedal H, Nordstrøm T, Karlsen F. PreTect HPV-Proofer: real-time detection and typing of E6/E7 mRNA from carcinogenic human papillomaviruses. *J Virol Methods* 2007;142:204-12.
119. Lee WT, Tubbs RR, Teker AM i sur. Use of in situ hybridization to detect human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma patients without a history of alcohol or tobacco use. *Arch Pathol Lab Med* 2008;132:1653-6.
120. Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature* 1995;374:131-4.

121. Klussmann JP, Gultekin E, Weissenborn SJ i sur. Expression of p16 protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. *Am J Pathol* 2003;162:747-53.
122. Witkiewicz AK, Knudsen KE, Dicker AP, Knudsen ES. The meaning of p16(ink4a) expression in tumors: functional significance, clinical associations and future developments. *Cell Cycle* 2011;10:2497-503.
123. Meschede W, Zumbach K, Braspenning J i sur. Antibodies against early proteins of human papillomaviruses as diagnostic markers for invasive cervical cancer. *J Clin Microbiol* 1998;36:475-80.
124. Farshadpour F, Hordijk GJ, Koole R, Slootweg PJ. Non-smoking and non-drinking patients with head and neck squamous cell carcinoma: a distinct population. *Oral Dis* 2007;13:239-43.
125. Dahlstrom KR, Little JA, Zafereo ME, Lung M, Wei Q, Sturgis EM. Squamous cell carcinoma of the head and neck in never smoker-never drinkers: a descriptive epidemiologic study. *Head Neck* 2008;30:75-84.
126. Harris SL, Kimple RJ, Hayes DN, Couch ME, Rosenman JG. Never-smokers, never-drinkers: Unique clinical subgroup of young patients with head and neck squamous cell cancers. *Head Neck* 2010;32:499-503.
127. Pytynia KB, Grant JR, Etzel CJ, Roberts DB, Wei Q, Sturgis EM. Matched-pair analysis of survival of never smokers and ever smokers with squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* 2004;22:3981-8.
128. Dahlstrom KR, Adler-Storthz K, Etzel CJ i sur. Human papillomavirus type 16 infection and squamous cell carcinoma of the head and neck in never-smokers: a matched pair analysis. *Clin Cancer Res* 2003;9:2620-6.
129. Andrews E, Seaman WT, Webster-Cyriaque J. Oropharyngeal carcinoma in non-smokers and non-drinkers: a role for HPV. *Oral Oncol* 2009;45:486-91.
130. Wiseman SM, Swede H, Stoler DL i sur. Squamous cell carcinoma of the head and neck in nonsmokers and nondrinkers: an analysis of clinicopathologic characteristics and treatment outcomes. *Ann Surg Oncol* 2003;10:551-7.
131. Tan EH, Adelstein DJ, Droughton ML, Van Kirk MA, Lavertu P. Squamous cell head and neck cancer in nonsmokers. *Am J Clin Oncol* 1997;20:146-50.

132. Wey PD, Lotz MJ, Triedman LJ. Oral cancer in women nonusers of tobacco and alcohol. *Cancer* 1987;60:1644-50.
133. Bundgaard T, Wildt J, Elbrønd O. Oral squamous cell cancer in non-users of tobacco and alcohol. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 1994;19:320-6.
134. Agudelo D, Quer M, Leon X, Diez S, Burguez J. Laryngeal carcinoma in patients without history of tobacco and alcohol use. *Head Neck* 1997;19:200-4.
135. Koch WM, Lango M, Sewell D, Zahurak M, Sidransky D. Head and neck cancer in nonsmokers: a distinct clinical and molecular entity. *Laryngoscope* 1999;109:1544-51.
136. Fouret P, Monceaux G, Temam S, Lacourreye L, St Guily JL. Human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinomas in nonsmokers. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1997;123:513-6.
137. Lingen M, Sturgis EM, Kies MS. Squamous cell carcinoma of the head and neck in nonsmokers: clinical and biologic characteristics and implications for management. *Curr Opin Oncol* 2001;13:176-82.
138. Fioretti F, Bosetti C, Tavani A, Franceschi S, Vecchia CL. Risk factors for oral and pharyngeal cancer in never smokers. *Oral Oncol* 1999;35:375-8.
139. Rimm DL, Camp RL, Charette LA, Costa J, Olsen DA, Reiss M. Tissue microarray: a new technology for amplification of tissue resources. *Cancer J* 2001;7:24-31.
140. Wang SS, Trunk M, Schiffman M i sur. Validation of p16INK4a as a marker of oncogenic human papillomavirus infection in cervical biopsies from a population-based cohort in Costa Rica. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:1355-60.
141. Grce M, Husnjak K, Magdić L i sur. Detection and typing of human papillomaviruses by polymerase chain reaction in cervical scrapes of Croatian women with abnormal cytology. *Eur J Epidemiol* 1997;13:645-51.
142. Lesnikova I, Lidang M, Hamilton-Dutoit S, Koch J. Rapid, sensitive, type specific PCR detection of the E7 region of human papillomavirus type 16 and 18 from paraffin embedded sections of cervical carcinoma. *Infect Agent Cancer* 2010;5:2.
143. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ i sur. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 2000;38:357-61.

144. de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 1995;76:1057-62.
145. de Sanjose S, Quint WG, Alemany L i sur. Retrospective International Survey and HPV Time Trends Study Group. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol* 2010;11:1048-56.
146. Milutin-Gasperov N, Sabol I, Halec G, Matovina M, Grce M. Retrospective study of the prevalence of high-risk human papillomaviruses among Croatian women. *Coll Antropol* 2007;31Suppl 2:89-96.
147. Kleter B, van Doorn LJ, ter Schegget J i sur. Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. *Am J Pathol* 1998;153:1731-9.
148. Bachar G, Hod R, Goldstein DP i sur. Outcome of oral tongue squamous cell carcinoma in patients with and without known risk factors. *Oral Oncol* 2011;47:45-50.
149. Byers RM. Squamous cell carcinoma of the oral tongue in patients less than thirty years of age. *Am J Surg* 1975;130:475-8.
150. 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.
151. Lund VJ, Howard DJ. Head and neck cancer in the young: a prognostic conundrum? *J Laryngol Otol* 1990;104:544-8.
152. Cusumano RJ, Persky MS. Squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx in young adults. *Head Neck Surg* 1988;10:229-34.
153. Garavello W, Spreafico R, Gaini RM. Oral tongue cancer in young patients: a matched analysis. *Oral Oncol* 2007;43:894-7.
154. Siriwardena BS, Tilakaratne A, Amaratunga EA, Tilakaratne WM. Demographic, aetiological and survival differences of oral squamous cell carcinoma in the young and the old in Sri Lanka. *Oral Oncol* 2006;42:831-6.

155. Schantz SP, Yu GP. Head and neck cancer incidence trends in young Americans, 1973-1997, with a special analysis for tongue cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002;128:268-74.
156. Annertz K, Anderson H, Biörklund A i sur. Incidence and survival of squamous cell carcinoma of the tongue in Scandinavia, with special reference to young adults. *Int J Cancer* 2002;101:95-9.
157. Davidson BJ, Root WA, Trock BJ. Age and survival from squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Head Neck* 2001;23:273-9.
158. Ho HC, Lee MS, Hsiao SH i sur. Squamous cell carcinoma of the oral cavity in young patients: a matched-pair analysis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2008;265Suppl1:57-61.
159. Warnakulasuriya S, Mak V, Möller H. Oral cancer survival in young people in South East England. *Oral Oncol* 2007;43:982-6.
160. Verschuur HP, Irish JC, O'Sullivan B, Goh C, Gullane PJ, Pintilie M. A matched control study of treatment outcome in young patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Laryngoscope* 1999;109:249-58.
161. Veness MJ, Morgan GJ, Sathiyaseelan Y, GebSKI V. Anterior tongue cancer: age is not a predictor of outcome and should not alter treatment. *ANZ J Surg* 2003;73:899-904.
162. Hart AK, Karakla DW, Pitman KT, Adams JF. Oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma in young adults: a report on 13 cases and review of the literature. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1999;120:828-33.
163. Pytynia KB, Grant JR, Etzel CJ, Roberts D, Wei Q, Sturgis EM. Matched analysis of survival in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck diagnosed before and after 40 years of age. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;130:869-73.
164. Friedlander PL, Schantz SP, Shaha AR, Yu G, Shah JP. Squamous cell carcinoma of the tongue in young patients: a matched-pair analysis. *Head Neck* 1998;20:363-8.
165. Pitman KT, Johnson JT, Wagner RL, Myers EN. Cancer of the tongue in patients less than forty. *Head Neck* 2000;22:297-302.

166. Myers JN, Elkins T, Roberts D, Byers RM. Squamous cell carcinoma of the tongue in young adults: increasing incidence and factors that predict treatment outcomes. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000;122:44-51.
167. Popovtzer A, Shpitzer T, Bahar G, Marshak G, Ulanovski D, Feinmesser R. Squamous cell carcinoma of the oral tongue in young patients. *Laryngoscope* 2004;114:915-7.
168. Atula S, Grénman R, Laippala P, Syrjänen S. Cancer of the tongue in patients younger than 40 years. A distinct entity? *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1996;122:1313-9.
169. Lipkin A, Miller RH, Woodson GE. Squamous cell carcinoma of the oral cavity, pharynx, and larynx in young adults. *Laryngoscope* 1985;95:790-3.
170. Chen YW, Kao SY, Yang MH. Analysis of p16(INK4A) expression of oral squamous cell carcinomas in Taiwan: prognostic correlation without relevance to betel quid consumption. *J Surg Oncol* 2012;106:149-54.
171. La Vecchia C, Tavani A, Franceschi S, Levi F, Corrao G, Negri E. Epidemiology and prevention of oral cancer. *Oral Oncol* 1997;33:302-12.
172. Tramacere I, Negri E, Bagnardi V i sur. A meta-analysis of alcohol drinking and oral and pharyngeal cancers. Part 1: overall results and dose-risk relation. *Oral Oncol* 2010;46:497-503.
173. Kabeya M, Furuta R, Kawabata K, Takahashi S, Ishikawa Y. Prevalence of human papillomavirus in mobile tongue cancer with particular reference to young patients. *Cancer Sci* 2012;103:161-8.
174. van Monsjou HS, van Velthuysen ML, van den Brekel MW, Jordanova ES, Melief CJ, Balm AJ. Human papillomavirus status in young patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2012;130:1806-12.
175. Harris SL, Thorne LB, Seaman WT, Hayes DN, Couch ME, Kimple RJ. Association of p16(INK4a) overexpression with improved outcomes in young patients with squamous cell cancers of the oral tongue. *Head Neck* 2011;33:1622-7.
176. Kaminagakura E, Villa LL, Andreoli MA i sur. High-risk human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma of young patients. *Int J Cancer* 2012;130:1726-32.

177. Duray A, Descamps G, Decaestecker C i sur. Human papillomavirus DNA strongly correlates with a poorer prognosis in oral cavity carcinoma. *Laryngoscope* 2012;122:1558-65.
178. Smith EM, Rubenstein LM, Haugen TH, Hamsikova E, Turek LP. Tobacco and alcohol use increases the risk of both HPV-associated and HPV-independent head and neck cancers. *Cancer Causes Control* 2010;21:1369-78.
179. Brown LM, Check DP, Devesa SS. Oral cavity and pharynx cancer incidence trends by subsite in the United States: changing gender patterns. *J Oncol* 2012;2012:649498.
180. Moore SR, Johnson NW, Pierce AM, Wilson DF. The epidemiology of tongue cancer: a review of global incidence. *Oral Dis* 2000;6:75-84.
181. Liang XH, Lewis J, Foote R, Smith D, Kademani D. Prevalence and significance of human papillomavirus in oral tongue cancer: the Mayo Clinic experience. *J Oral Maxillofac Surg* 2008;66:1875-80.
182. Siebers TJ, Merckx MA, Slootweg PJ, Melchers WJ, van Cleef P, de Wilde PC. No high-risk HPV detected in SCC of the oral tongue in the absolute absence of tobacco and alcohol - a case study of seven patients. *Oral Maxillofac Surg* 2008;12:185-8.
183. Kozomara R, Jović N, Magić Z, Branković-Magić M, Minić V. p53 mutations and human papillomavirus infection in oral squamous cell carcinomas: correlation with overall survival. *J Craniomaxillofac Surg* 2005;33:342-8.
184. da Silva CE, da Silva ID, Cerri A, Weckx LL. Prevalence of human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the tongue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;104:497-500.
185. Lee SY, Cho NH, Choi EC i sur. Relevance of human papilloma virus (HPV) infection to carcinogenesis of oral tongue cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2010;39:678-83.
186. Simonato LE, Garcia JF, Sundefeld ML, Mattar NJ, Veronese LA, Miyahara GI. Detection of HPV in mouth floor squamous cell carcinoma and its correlation with clinicopathologic variables, risk factors and survival. *J Oral Pathol Med* 2008;37:593-8.

187. Brandwein M, Zeitlin J, Nuovo GJ i sur. HPV detection using "hot start" polymerase chain reaction in patients with oral cancer: a clinicopathological study of 64 patients. *Mod Pathol* 1994;7:720-7.
188. Ragin CC, Taioli E. Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: review and meta-analysis. *Int J Cancer* 2007;121:1813-20.
189. Hobbs CG, Sterne JA, Bailey M, Heyderman RS, Birchall MA, Thomas SJ. Human papillomavirus and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Otolaryngol* 2006;31:259-66.
190. St Guily JL, Jacquard AC, Prétet JL i sur. Human papillomavirus genotype distribution in oropharynx and oral cavity cancer in France - The EDiTH VI study. *J Clin Virol* 2011;51:100-4.
191. Badaracco G, Venuti A, Morello R, Muller A, Marcante ML. Human papillomavirus in head and neck carcinomas: prevalence, physical status and relationship with clinical/pathological parameters. *Anticancer Res* 2000;20:1301-5.
192. Pérez-Sayáns M, Suárez-Peñaranda JM, Gayoso-Diz P, Barros-Angueira F, Gándara-Rey JM, García-García A. p16(INK4a)/CDKN2 expression and its relationship with oral squamous cell carcinoma is our current knowledge enough? *Cancer Lett* 2011;306:134-41.
193. Karsai S, Abel U, Roesch-Ely M i sur. Comparison of p16(INK4a) expression with p53 alterations in head and neck cancer by tissue microarray analysis. *J Pathol* 2007;211:314-22.
194. Chandarana SP, Lee JS, Chanowski EJ i sur. Prevalence and predictive role of p16 and epidermal growth factor receptor in surgically treated oropharyngeal and oral cavity cancer. *Head Neck* 2012; doi: 10.1002/hed.23087.
195. Suzuki H, Sugimura H, Hashimoto K. p16INK4A in oral squamous cell carcinomas - a correlation with biological behaviors: immunohistochemical and FISH analysis. *J Oral Maxillofac Surg* 2006;64:1617-23.
196. González-Moles MA, Rodríguez-Archilla A, Ruiz-Avila I, Martínez AB, Morales-García P, González-Moles S. p16 expression in squamous carcinomas of the tongue. *Onkologie* 2002;25:433-6.

197. Bova RJ, Quinn DI, Nankervis JS i sur. Cyclin D1 and p16INK4A expression predict reduced survival in carcinoma of the anterior tongue. *Clin Cancer Res* 1999;5:2810-9.
198. Lu DW, El-Mofty SK, Wang HL. Expression of p16, Rb, and p53 proteins in squamous cell carcinomas of the anorectal region harboring human papillomavirus DNA. *Mod Pathol* 2003;16:692-9.
199. Sano T, Masuda N, Oyama T, Nakajima T. Overexpression of p16 and p14ARF is associated with human papillomavirus infection in cervical squamous cell carcinoma and dysplasia. *Pathol Int* 2002;52:375-83.
200. Keating JT, Cviko A, Riethdorf S i sur. Ki-67, cyclin E, and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2001;25:884-91.
201. Singhi AD, Westra WH. Comparison of human papillomavirus in situ hybridization and p16 immunohistochemistry in the detection of human papillomavirus-associated head and neck cancer based on a prospective clinical experience. *Cancer* 2001;116:2166-73.
202. Klussmann JP, Gültekin E, Weissenborn SJ i sur. Expression of p16 protein identified a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. *Am J Pathol* 2003;162:747-53.
203. Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG i sur. Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus-associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. *J Clin Oncol* 2006;24:736-47.
204. Hoffmann M, Tribius S, Quabius ES i sur. HPV DNA, E6*I-mRNA expression and p16INK4A immunohistochemistry in head and neck cancer - how valid is p16INK4A as surrogate marker? *Cancer Lett* 2012;323:88-96.
205. Klingenberg B, Hafkamp HC, Haesevoets A i sur. p16 INK4A overexpression is frequently detected in tumour-free tonsil tissue without association with HPV. *Histopathology* 2010;56:957-67.
206. Lingen MW, Xiao W, Schmidt A i sur. Low etiologic fraction for high-risk human papillomavirus in oral cavity squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2013;49:1-8.

207. Elango KJ, Suresh A, Erode EM i sur. Role of human papilloma virus in oral tongue squamous cell carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* 2011;12:889-96.

208. Laco J, Nekvindova J, Novakova V i sur. Biologic importance and prognostic significance of selected clinicopathological parameters in patients with oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma, with emphasis on smoking, protein p16(INK4a) expression, and HPV status. *Neoplasma* 2012;59:398-408.

11. ŽIVOTOPIS

Zovem se Emil Dediol i rođen sam 16. veljače 1979. u Dubrovniku. Osnovnu školu pohađao sam i završio u rodnom Orebiću, a opću gimnaziju u Korčuli. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisao sam 1997. gdje sam i diplomirao 2003. s prosjekom ocjena 4,71. S pripravničkim stažem sam započeo 2003. na KBC Zagreb.

Mjesto znanstvenog novaka-asistenta na Katedri za maksilofacijalnu kirurgiju u KB Dubrava sam dobio 2004. Iste godine upisao sam Doktorski poslijediplomski studij Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Do 2007. sam odslušao i položio sve ispite.

Sa specijalizacijom iz maksilofacijalne kirurgije započeo sam 2005., a specijalistički ispit sam položio 2009. Tijekom specijalističke edukacije usavršavao sam se u Glasgowu (mikrovaskularna kirurgija) i Dresdenu (maksilofacijalna traumatologija). Dobio sam 2008. godine Hugo Obwegeser stipendiju Europskog društva za kraniomaksilofacijalnu kirurgiju (EACMFS - European Association for Cranio- Maxillo- Facial Surgery) u sklopu koje sam boravio dva mjeseca na stručnom usavršavanju u University College Hospital u Londonu 2009. godine. Subspecijalizaciju iz plastične kirurgije glave i vrata započeo sam 2010., a 2012. sam uspješno položio subspecijalistički ispit.

Trenutno radim kao maksilofacijalni kirurg na Klinici za kirurgiju lica, čeljusti i usta, KB Dubrava.

Aktivno sam sudjelovao na brojnim domaćim i svjetskim kongresima. Autor sam više članaka objavljenih u časopisima indeksiranim u Current Contents iz područja kirurgije glave i vrata.

Član sam Hrvatskog društva za maksilofacijalnu, plastičnu i rekonstrukcijsku kirurgiju glave i vrata i Europskog društva za kraniomaksilofacijalnu kirurgiju.