

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Petar Suton

**Prognostička vrijednost izraženosti
koštanoga morfogenetskoga proteina 6 u
planocelularnim karcinomima usne
šupljine**

DISERTACIJA



Zagreb, 2016.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Petar Suton

**Prognostička vrijednost izraženosti
koštanoga morfogenskoga proteina 6 u
planocelularnim karcinomima usne
šupljine**

DISERTACIJA

Zagreb, 2016.

Disertacija je izrađena u Klinici za kirurgiju lica, čeljusti i usta Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu Kliničke bolnice Dubrava i Laboratoriju za mineralizirana tkiva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Voditelji rada: doc. dr. sc. Ivica Lukšić, prof. dr. sc. Lovorka Grgurević

POPIS OZNAKA I KRATICA KORIŠTENIH U TEKSTU

ACS	Američko društvo za rak (eng. <i>American Cancer Society</i>)
AJCC	Američko udruženje za rak (eng. <i>American Joint Committee on Cancer</i>)
BMPs	koštani morfogenetski proteini (eng. <i>bone morphogenetic proteins</i>)
cDNA	komplementarna DNA (eng. <i>complementary DNA</i>)
CI	interval pouzdanosti (eng. <i>confidence interval</i>)
DFS	preživljenje bez bolesti (eng. <i>disease-free survival</i>)
EGF	epidermalni čimbenik rasta (eng. <i>epidermal growth factor</i>)
EGFR	receptor epidermalnog čimbenika rasta (eng. <i>epidermal growth factor receptor</i>)
EMT	epitelno-mezenhimalni prijelaz (eng. <i>epithelial-mesenchymal transition</i>)
Gy	međunarodna jedinica za ionizirano zračenje (eng. <i>Grey</i>)
HPV	papiloma virus čovjeka (eng. <i>human papilloma virus</i>)
IMH	imunohistokemija
IMRT	liječenje zračenjem snopovima promjenjivog intenziteta (eng. <i>intensity-modulated radiation therapy</i>)
MET	mezenhimalno-epitelni prijelaz (eng. <i>mesenchymal-epithelial transition</i>)
MVD	gustoća mikrovaskularne mreže (eng. <i>microvessel density</i>)
OR	omjer izgleda (eng. <i>odds ratio</i>)
PS	opći status bolesnika (eng. <i>performans status</i>)
PBS	fosfatni pufer (eng. <i>phosphate buffer saline</i>)
PFS	preživljenje do progresije bolesti (eng. <i>progression-free survival</i>)
SAD	Sjedinjene Američke Države
SE	standardna pogreška (eng. <i>standard error</i>)

TGF- α	transformirajući čimbenik rasta alfa (eng. <i>transforming growth factor alpha</i>)
TGF- β	transformirajući čimbenik rasta beta (eng. <i>transforming growth factor beta</i>)
TNM	klasifikacija anatomske proširenosti zloćudnih tumora (eng. <i>Tumor-Node-Metastasis</i>)
TP 53	tumor protein p53 (eng. <i>tumor protein p53</i>)
VEGF	čimbenika rasta endotela krvnih žila (eng. <i>vascular endothelial growth factor</i>)
β	vrijednost regresijskog koeficijenta

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Karcinom usne šupljine	1
1.1.1. Epidemiologija	1
1.1.2. Etiološki čimbenici	1
1.1.3. Klinička slika	2
1.1.4. Dijagnostičke metode	3
1.1.5. Liječenje	4
1.1.5.1. Kirurško liječenje	5
1.1.5.2. Radioterapija	7
1.1.5.2.1. Doze zračenja i frakcioniranje	8
1.1.5.2.2. Frakcioniranje kod samostalne primjene radioterapije	8
1.1.5.2.3. Frakcioniranje kod konkomitantne radiokemoterapije	8
1.1.5.2.4. Hiperfrakcioniranje	9
1.1.5.2.5. IMRT	9
1.1.5.3. Kemoterapija	10
1.2. Metastaziranje karcinoma usne šupljine	11
1.2.1. Limfni sustav glave i vrata	11
1.2.2. Limfogeno metastaziranje karcinoma usne šupljine	12
1.2.3. Hematogeno metastaziranje karcinoma usne šupljine	12
1.3. Prognostički čimbenici u oboljelih od karcinoma usne šupljine	13
1.3.1. Prognostički čimbenici ovisni o bolesniku	13
1.3.1.1. Dob i spol	14
1.3.1.2. Opće stanje bolesnika	14
1.3.2. Prognostički čimbenici ovisni o tumoru	15
1.3.2.1. Lokalizacija primarnog tumora	15
1.3.2.2. Dubina invazije i debljina tumora	16
1.3.2.3. Volumen tumora	16
1.3.2.4. Stadij N	17
1.3.2.5. Histološke značajke primarnog tumora	19
1.3.2.5.1. Stupanj diferenciranosti	19
1.3.2.5.2. Perineuralna i limfovaskularna invazija	19
1.3.2.5.3. Neoangiogeneza	20
1.3.2.6. Biljezi potvrđeni metodom imunohistokemije	21
1.3.2.7. Koštani morfogogenetski proteini	22
1.3.2.7.1. Koštani morfogogenetski protein 6 (BMP6)	27
1.3.2.8. Molekularni biljezi	29

1.3.3. Prognostički čimbenici ovisni o liječenju	30
2. HIPOTEZA	32
3. CILJEVI RADA	33
3.1. Opći cilj.....	33
3.2. Specifični ciljevi	33
4. ISPITANICI I METODE	34
4.1. Ispitanici.....	34
4.2. Postupci istraživanja	34
4.2.1. Podatci o liječenju bolesnika.....	34
4.2.2. Histološka mjerenja.....	36
4.2.3. Određivanje proteina BMP6 metodom imunohistokemije.....	36
4.2.4. Dodatni podatci i definicije vezane uz istraživanje.....	37
4.2.5. Statistička obrada podataka.....	39
5. REZULTATI	41
6. RASPRAVA	60
6.1. Povezanost BMP6 s kliničkim i histološkim čimbenicima, pojavom recidiva bolesti i preživljenjem bolesnika.....	60
6.2. Dob, spol i preživljenje oboljelih od karcinoma usne šupljine	61
6.3. Kliničko značenje podlokalizacije tumora	62
6.4. Kliničko značenje dubine invazije i debljine tumora	62
6.5. Kliničko značenje zahvaćenosti periosta i kosti tumorom	63
6.6. Klinički značaj statusa ruba resekcije	63
6.7. Klinički značaj stupnja zrelosti tumora.....	64
6.8. Klinički značaj perineuralne i perivaskularne invazije	64
6.9. Klinički značaj statusa limfnih čvorova vrata.....	65
6.9.1. Klinički značaj proboja čahure limfnog čvora	65
6.9.2. Odstranjenje limfnih čvorova vrata.....	65
7. ZAKLJUČAK	67
8. SAŽETAK	68
9. SUMMARY	69
10. LITERATURA	70
11. ŽIVOTOPIS	94

1. UVOD

1.1. Karcinom usne šupljine

1.1.1. Epidemiologija

Karcinom usne šupljine najčešći je zloćudni tumor glave i vrata. Šesti je po učestalosti u svijetu i čini 2-3% svih zloćudnih tumora u Europi i SAD (1). Prema podacima Američkog društva za rak (ACS, od eng. *American Cancer Society*), u SAD se godišnje dijagnosticira približno 27500 novih slučajeva, a umre približno 5500 oboljelih (2). Najveća učestalost karcinoma usne šupljine je u Indiji, gdje predstavlja najčešći zloćudni tumor u muškaraca i treći po učestalosti u žena (3), zbog navike žvakanja i zadržavanja duhana i betela između zuba i sluznice obraza (3).

U SAD je, u razdoblju od 2003. do 2009. godine, gotovo trećina novodijagnosticiranih tumora bila lokalizirana (31%), dok su regionalne i udaljene metastaze bile prisutne u 47%, odnosno 17% novooboljelih (4). Dakle, približno polovica bolesnika u trenutku postavljanja dijagnoze ima lokalno uznapredovali karcinom. Prosječna dob oboljelih bila je 60 godina, a omjer muškaraca prema ženama bio je 1,5:1 do 3:1 (5-8).

Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, u 2012. godini je od karcinoma usne šupljine i ždrijela umrlo 387 osoba, zbog čega je deseti po učestalosti uzrok smrti u RH, u oboljelih od zloćudnih tumora (9). Prosječno petogodišnje preživljenje bolesnika je 62%; u oboljelih od lokaliziranih tumora 83%, a u bolesnika s tumorom koji se proširio na limfne čvorove vrata 59% (4).

1.1.2. Etiološki čimbenici

Pušenje i alkohol

Najznačajniji etiološki čimbenici za nastanak karcinoma usne šupljine su pušenje cigareta i konzumiranje alkoholnih pića. Učinak je sinergističan (10). Epidemiološke studije potvrđuju da pušači imaju 11 puta veći rizik razvoja karcinoma usne šupljine, a ukoliko istovremeno konzumiraju veće količine alkohola, rizik se, u odnosu na nepušače koji ne konzumiraju alkohol, povećava do 80 puta (11). Nadalje, pušači/alkoholičari imaju povećan rizik od nastanka drugog primarnog tumora aerodigestivnog sustava, što dodatno pogoršava ishod bolesti u ovih bolesnika (12). U ovih bolesnika rizik od razvoja drugog zloćudnog tumora iznosi 3,7% godišnje, odnosno 24% tijekom deset godina nakon uspješnog liječenja prvog tumora (13).

Najčešće morfološke promjene sluznice usne šupljine koje su udružene s povećanim rizikom nastanka karcinoma, tzv. prekancerozne lezije, su: eritroplakija, leukoplakija, lihen ruber planus i određene bolesti ili sindromi (sideropenična disfagija, sindromi Plummer Vinson i Bloom, Fanconijeva anemija te kseroderma pigmentosum) (14). Eritroplakija je povezana s najvećim rizikom razvoja karcinoma usne šupljine. Histološke analize su pokazale da se čak u 51% eritroplakija nalaze žarišta invazivnog karcinoma, u 40% karcinom "in situ", a preostalih 9% posjeduje stanice s blagom do umjerenom displazijom (15).

Znatno manji rizik nastanka karcinoma od eritroplakije ima leukoplakija koja prelazi u karcinom usne šupljine u 1% do 18% slučajeva (16, 17).

Infekcija papiloma virusom čovjeka

Infekcija papiloma virusom čovjeka (HPV, od eng. *human papilloma virus*) poznati je etiološki čimbenik u nastanku planocelularnog karcinoma orofarinksa (18-24). Unatoč činjenici da su visokorizični genotipovi HPV prisutni u približno polovici bolesnika s karcinomom usne šupljine, nije poznato da li je infekcija ovim virusom dostatna za otpočinjanje zloćudne preobrazbe stanica usne šupljine (25). Zadnjih se godina u SAD bilježi porast incidencije karcinoma glave i vrata u kojima se nalazi HPV, dok je učestalost HPV-negativnih karcinoma u padu (26). Također, dokazano je povećanje učestalosti karcinoma oralnog dijela jezika u mlađih bolesnika za 1% godišnje. Etiologija ovog fenomena nije razjašnjena (27-29).

1.1.3. Klinička slika

Usna šupljina je sprijeda omeđena kožom i rubom crvenila gornje i donje usnice, a straga papilama cirkumvalatama stražnje strane jezika, spojem tvrdog i mekog nepca te prednjim nepčanim lukovima. Anatomski je čini sedam sastavnica: usnica, prednje dvije trećine jezika (intraoralni - pokretljivi dio jezika), dno usne šupljine, gingiva, retromolarno područje te sluznica obraza i tvrdo nepce (30).

Karcinom usne šupljine češće se javlja na jeziku, (36-43%, od čega gotovo isključivo ventralna strana i rub jezika), dnu usne šupljine (14-35%), gingivi mandibule i retromolarnom području (16-18%). Znatno je rjeđi na sluznici obraza (iznimku čine Indijci, zbog prethodno opisane navike žvakanja duhana) (8-10%) i tvrdom nepcu (3-4%) (30-32).

Klinički se najčešće manifestira kao ulcerozna, rjeđe papilarna, a samo ponekad kao infiltrativna lezija (33).

Najčešći znakovi bolesti su nelagoda u ustima, otežano i bolno gutanje, pečenje u ustima (osobito pri konzumiranju začinjene hrane), bol sa širenjem prema uhu, klimavost zubi ili zubne proteze te krvarenje iz usne šupljine (33). U približno jedne četvrtine bolesnika prvi znak karcinoma usne šupljine je čvor na vratu. Ovaj je simptom još češći u oboljelih od karcinoma baze jezika (orofarinksa) (33).

Karcinom usne šupljine predstavlja značajan klinički i javnozdravstveni problem. Iako je lako dostupan dijagnostičkoj obradi (inspekcija, palpacija, biopsija), ima lošu prognozu (3). To se objašnjava činjenicom da približno polovica bolesnika u trenutku postavljanja dijagnoze ima lokalno uznapredovali karcinom (stadiji T3 ili T4) (4, 5).

1.1.4. Dijagnostičke metode

Dijagnoza karcinoma usne šupljine postavlja se na temelju detaljne anamneze i fizikalnog pregleda, a potvrđuje histološkom analizom bioptičkog uzorka uzetog iz klinički promijenjenog područja (25). Proširenost bolesti određuje se radiološkom obradom (CT ili MR, rjeđe PET-CT). Na temelju dobivenih podataka određuje se klinički stadij bolesti, prema međunarodnoj klasifikaciji TNM (34, 35). U **tablici 1** prikazana je klasifikacija TNM iz 2002 godine.

Tablica 1. TNM klasifikacija karcinoma usne šupljine (35).

Stadij T		Primarni tumor
Tx	Primarni tumor se ne može dokazati	
T0	Nema vidljivog primarnog tumora	
Tis	Karcinom <i>in situ</i>	
T1	Tumor ≤ 2 cm	
T2	Tumor > 2 cm ≤ 4 cm	
T3	Tumor > 4 cm	
T4 Tumor se širi u okolne strukture*	T4a	* kortikalis mandibule, duboki mišići jezika (genioglosalni, hioglosalni, palatoglosalni, stiloglosalni mišić), maksilarni sinus, koža lica Površinska erozija kosti ili alveole zuba karcinomom gingive nije dovoljan kriterij za klasificiranje kao T4
	T4b	* mastikatorni prostor, pterigoidni nastavci, baza lubanje i/ili unutarnja karotidna arterija
Stadij N		Status regionalnih limfnih čvorova
Nx	Metastaza u limfnom čvoru se ne može dokazati	
N0	Nema metastaza u regionalnim limfnim čvorovima	
N1	Metastaza u ipsilateralnom limfnom čvoru ≤ 3 cm	
N2	N2a	Metastaza u ipsilateralnom limfnom čvoru > 3 cm ≤ 6 cm
	N2b	Dvije ili više metastaza u ipsilateralnim limfnim čvorovima ≤ 6 cm
	N2c	Metastaze obostrano (neovisno o veličini) ili u kontralateralnim limfnim čvorovima ≤ 6 cm
N3	Metastaza u limfnom čvoru > 6 cm	
Stadij M		Status udaljenih metastaza
Mx	Udaljene metastaze se ne mogu dokazati	
M0	Nema udaljenih metastaza	
M1	Udaljene metastaze postoje	

1.1.5. Liječenje

Liječenje je kirurško, samostalno ili u kombinaciji s radioterapijom, kemoterapijom i imunoterapijom (36). Izbor liječenja ovisi o lokalizaciji primarnog tumora, njegovoj proširenosti (stadij T), histološkom tipu, postojanju regionalnih i/ili udaljenih metastaza (stadij NM) te o općem stanju bolesnika (30).

1.1.5.1. Kirurško liječenje

Temelje moderne kirurške terapije postavio je još početkom 20. stoljeća američki kirurg George Crile koji je opisao "blok disekciju", odnosno resekciju primarnog tumora u usnoj šupljini u kontinuitetu s pripadajućim limfnim čvorovima i limfnim putevima (37, 38). Značajnu afirmaciju te kirurške metode (operacija "commando") učinio je "otac kirurgije glave i vrata" Hayes Martin polovicom prošlog stoljeća. Od tada do danas principi disekcije vrata nisu se značajno mijenjali (39).

U određenim se slučajevima, ovisno o lokalizaciji (najčešće u prednjim dijelovima usne šupljine) i veličini tumora (stadij T1 i T2, rjeđe T3), provodi intraoralna ekscizija kojom se odstranjuje samo primarni tumor. Indikacije za navedeni zahvat nisu do kraja definirane. Ne postoje niti strogo definirane smjernice koje bi definirale terapijski postupak u bolesnika bez klinički manifestnih metastaza u limfnim čvorovima vrata. Najveće proturječnosti u odluci o opsegu kirurškog liječenja predstavlja karcinom usne šupljine kliničkog stadija T2-3N0 koji je tehnički moguće odstraniti intraoralnim putem. U bolesnika bez klinički manifestnih metastaza u limfnim čvorovima vrata navode se tri mogućnosti kirurškog liječenja: a) intraoralna ekscizija s praćenjem bolesnika do pojave klinički manifestnih regionalnih metastaza (tzv. „konverzija vrata“), b) intraoralna ekscizija s profilaktičkom (elektivnom) disekcijom vrata i c) intraoralna ekscizija s profilaktičkim (elektivnim) zračenjem vrata (40).

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

O'Brien i sur. proveli su prospektivno istraživanje na 162 bolesnika s karcinomom usne šupljine i orofarinksa, stadija T1-T4 bez klinički manifestnih metastaza u limfnim čvorovima vrata (41). U 96 bolesnika učinjena je elektivna disekcija vrata, a 58 ih je praćeno, nakon resekcije primarnog tumora. Autori nisu našli statistički značajnu razliku u regionalnoj kontroli bolesti (94% prema 98%), niti u petogodišnjem preživljenju (86% prema 94%) između bolesnika kojima je učinjena elektivna disekcija vrata u odnosu na bolesnike koji su praćeni. Metodološki nedostatak navedene studije sastoji se u kriterijima odabira modaliteta liječenja. Naime, odluka o opsegu liječenja određena je u odnosu na lokalizaciju i stadij T primarnog tumora. Većina praćenih do "konverzije vrata" imala je početni intraoralni karcinom. U njih se i očekuje visoka stopa preživljenja i kontrola regionalne bolesti. Autori su zaključili da pažljivi odabir modaliteta liječenja u bolesnika bez klinički manifestnih

metastaza u limfnim čvorovima vrata na temelju lokalizacije i stadija bolesti omogućuje visoke stope regionalne kontrole bolesti.

U prospektivnoj multicentričnoj randomiziranoj studiji na 71 bolesniku s početnim intraoralnim karcinomom bez klinički manifestnih metastaza u limfnim čvorovima vrata, Yuen i sur. su dokazali da ne postoji statistički značajna razlika u petogodišnjem preživljenju između skupine bolesnika koji su operirani i praćeni u odnosu na bolesnike u kojih je učinjena i disekcija vrata (87% prema 89%) (42). Prva je skupina bolesnika praćena na način da im se učinio ultrazvučni pregled vrata svaka tri mjeseca te citološka punkcija limfnih čvorova sumnjivih na metastatski proces tijekom prve tri godine praćenja.

S druge strane, dvije su studije identificirale više stope ukupnog preživljenja i preživljenja bez bolesti (DFS, od eng. *disease-free survival*) u skupini bolesnika koji su bili inicijalno limfadenektomirani.

U retrospektivnoj studiji na 380 bolesnika s karcinomom jezika kliničkog stadija T1-2N0, 56 bolesnika je praćeno, a u 324 je učinjena elektivna disekcija vrata (supraomohoidna disekcija u 287, a modificirana radikalna disekcija u 37 bolesnika). U drugoj su skupini bolesnika okultne metastaze dokazane za karcinome T1 u 5,2%, a za T2 u 14,6% ($P=0,005$) oboljelih. Ukupno petogodišnje preživljenje bilo je statistički značajno duže u drugoj skupini bolesnika, pri čemu su bolesnici u kojih je učinjena modificirana radikalna disekcija vrata imali dulje (ne i statistički značajno), petogodišnje preživljenje u odnosu na bolesnike u kojih je učinjena supraomohoidna disekcija. Stoga su autori zaključili da bi elektivna disekcija vrata trebala biti rutinski zahvat u bolesnika s ranim stadijem karcinoma jezika u kojih ne postoje klinički manifestne metastaze u limfnim čvorovima vrata (43).

U studiji na 154 bolesnika s početnim intraoralnim karcinomom, Capote i sur. su dokazali statistički značajno rjeđu pojavu regionalnog recidiva te duže preživljenje bolesnika podvrgnutih elektivnoj disekciji vrata (44). Ovi su rezultati mogli biti dobiveni dijelom i zbog toga što su analizom bili obuhvaćeni samo podaci vezani uz bolesnike u kojih histološkom analizom nije bilo moguće dokazati postojanje metastaza u limfnim čvorovima vrata.

U nedavno objavljenoj prospektivnoj studiji na 596 bolesnika s početnim karcinomom usne šupljine, D'Cruz i sur. su dokazali statistički značajno duže ukupno preživljenje te DFS u bolesnika koji su bili podvrgnuti profilaktičkoj disekciji vrata (45). Preliminarni rezultati su uključili prvih 500 bolesnika koji su nasumično podijeljeni u dvije skupine. U 245 bolesnika je učinjena elektivna disekcija vrata dok je 255 bolesnika praćeno i podvrgnuto kurativnoj disekciji u slučaju pojave metastaza u limfnim čvorovima vrata tijekom praćenja. U prvoj je skupini 81 bolesnik razvio recidiv od kojeg je umrlo 50 bolesnika, dok je u skupini bolesnika

u kojih je učinjena kurativna disekcija zabilježeno 146 recidiva i 79 smrti od bolesti. Bolesnici podvrgnuti elektivnoj disekciji vrata su imali za 12,5% duže trogodišnje preživljenje te za 23,6% duže trogodišnje DFS (80% u odnosu na 67,5% za ukupno preživljenje, 69,5% u odnosu na 45,9% za DFS). Autori su stoga zaključili da provođenje elektivne disekcije vrata, u trenutku odstranjenja primarnog tumora, doprinosi dužem ukupnom preživljenju u bolesnika s početnim stadijem karcinoma usne šupljine.

U nedavno objavljenoj meta-analizi pet nasumično kontroliranih prospektivnih studija s ukupno 779 bolesnika, kojima su se uspoređivali prethodno spomenuti kirurški pristupi, autori su dokazali statistički značajno duže ukupno preživljenje i DFS u bolesnika kojima je u isto vrijeme odstranjen tumor i učinjena elektivna disekcija vrata (46).

Zagovornici elektivne disekcije vrata navode visoku učestalost okultnih regionalnih metastaza te rjeđu pojavu regionalnog recidiva i duže preživljenje u bolesnika bez klinički manifestnih metastaza u limfnim čvorovima vrata kad se vrat operira istovremeno s primarnim tumorom u usnoj šupljini. Isti autori zaključuju da liječenje okultnih regionalnih metastaza ima bolju prognozu od liječenja klinički evidentnih (47-52).

S druge strane, neki autori navode usporedive stope preživljenja između bolesnika kojima je učinjena intraoralna ekscizija u odnosu na bolesnike kojima je napravljena i elektivna disekcija vrata, naglašavajući nepotrebnost morbiditet i eventualne poslijeoperacijske komplikacije u slučajevima histološki negativnih limfnih čvorova vrata (41, 42, 53).

1.1.5.2. Radioterapija

Radioterapija je liječenje zračenjem koje uništava stanice ili onemogućuje njihovo dijeljenje. U liječenju karcinoma usne šupljine stadija I i II najčešće se koriste kirurško liječenje ili primarno zračenje, dok kod uznapredovalih tumora (stadij III i IV), združeni oblici liječenja (kirurško liječenje s radioterapijom ili radiokemoterapijom) daju najbolje izgleda za izliječenje (54, 55). Prvotno spomenutim pristupom liječenja izliječenje se postiže u 80-90% bolesnika, a kod uznapredovalog stadija, združenim oblicima liječenja, u 40-60% bolesnika (56, 57).

Radioterapijom se, kao samostalnim oblikom liječenja regionalne bolesti ne može postići izliječenje, no, ovisno o histološkom nalazu disektata vrata, radioterapija se može primijeniti nakon operacije (poslijeoperacijsko zračenje ili adjuvantna radioterapija) (58). Provodi se u bolesnika s tumorom histološkog stadija T3 i T4 (pT3 i pT4), pozitivnim rubom

resekcije, perineuralnom/limfovaskularnom invazijom, multiplim pozitivnim limfnim čvorovima vrata te u slučaju proboja čahure limfnog čvora (59).

Zanimljiva je i uloga profilaktičke (elektivne) radioterapije vrata u bolesnika s početnim intraoralnim karcinomom bez klinički manifestnih metastaza u limfnim čvorovima, kojom se smanjuje rizik razvoja regionalnog recidiva, iako ne postoje jasni dokazi da doprinosi dužem preživljenju i ne koristi se kao rutinski postupak u liječenju ovih bolesnika (60, 61).

1.1.5.2.1. Doze zračenja i frakcioniranje

Odabir ukupne doze zračenja ovisi o nekoliko čimbenika: veličini tumora, broju i veličini regionalnih metastaza, načinu frakcioniranja te eventualnoj primjeni kemoterapije. U slučajevima primarne radioterapije konvencionalnim frakcioniranjem, na visokorizična područja (primarni tumor i pozitivni limfni čvorovi) je potrebno primijeniti ukupno 66-70 Gy (2,0-2,2 Gy/dozi). Doze iznad 72 Gy nisu preporučljive s obzirom na visoke stope oštećenja okolnog tkiva (62-67). Kod hiperfrakcioniranja, za razliku od konvencionalnog frakcioniranja ukupna preporučena doza radioterapije iznosi 81,6 Gy (1,2 Gy/dozi) (62).

S druge strane, radioterapija nisko- i srednjerizičnih područja glave i vrata za širenje bolesti (neodstranjeni i histološki negativni limfni čvorovi) primjenjuje se u ukupnoj dozi od 40 (2,0 Gy/frakciji) do 63 Gy (1,6-1,8 Gy/frakciji), ovisno o načinu zračenja koji se koristi (3D konformalna radioterapija ili liječenje zračenjem snopovima promjenjivog intenziteta (IMRT, od eng. *intensity-modulated radiation therapy*) (68-70).

1.1.5.2.2. Frakcioniranje kod samostalne primjene radioterapije

Prema dosadašnjim istraživanjima, ne postoji način frakcioniranja koji je optimalan za sve tumore glave i vrata. Ako se primjenjuje samostalno, minimalna preporučena doza iznosi 10 Gy tjedno za planocelularni karcinom glave i vrata. U početnom karcinomu glotisa su dokazane više stope recidiva ako se primjenjuje dnevna doza zračenja manja od 2 Gy, odnosno, kumulativna tjedna doza ispod 10 Gy (71, 72).

1.1.5.2.3. Frakcioniranje kod konkomitantne radiokemoterapije

U odnosu na konkomitantnu radiokemoterapiju, većina studija analizirala je uspješnost konvencionalnog frakcioniranog zračenja (2 Gy/dnevno do ukupno 70 Gy kroz 7 tjedana) uz istodobnu primjenu cisplatine u visokoj dozi (100 mg/m² svaka 3 tjedna) (73).

Analizirani su i drugačiji protokoli frakcioniranja (npr 1,8 Gy), primjena cisplatine u različitim dozama ili drugih citostatika u monoterapiji, multimodalna kemoterapija, samostalno ili u kombinaciji. Brojne studije su pokazale da je izmijenjeno frakcioniranje s istovremenom primjenom kemoterapije učinkovitije od izmijenjenog samostalnog frakcioniranja (74-77).

Akutna toksičnost konkomitantne radiokemoterapije veća je u odnosu na samo zračenje (78-80), a primjena multimodalne kemoterapije uz zračenje može još dodatno povećati štetne učinke liječenja (81).

1.1.5.2.4. Hiperfrakcioniranje

Osim konvencionalnog (standardnog) frakcioniranja (dnevna doza od 2 Gy, pet puta tjedno) koje je najčešći protokol zračenja u radioterapiji, u liječenju tumora glave i vrata koriste se i druge vrste frakcioniranja zračenja.

Hiperfrakcioniranje je oblik zračenja koji koristi 2-3 frakcije na dan u pojedinačnoj dozi 1-1,2 Gy, u minimalnom razmaku od četiri do šest sati (dnevno više od 2 Gy), u ukupnom vremenskom periodu od šest do osam tjedana.

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

Dvije randomizirane europske studije, pokazale su više stope lokoregionalne kontrole bolesti korištenjem promjenjivog frakcioniranja uz statistički neznačajno produženje ukupnog preživljenja u odnosu na konvencionalno frakcioniranje (82, 83).

1.1.5.2.5. IMRT

IMRT je liječenje zračenjem snopovima različitih intenziteta. Predstavlja napredan oblik radioterapije. Osim što se snopovi zračenja oblikuju i usmjeravaju u nekoliko različitih smjerova, svaki snop je također podijeljen na nekoliko manjih snopova različitog intenziteta zračenja. Na taj se način ostvaruje optimalna doza zračenja koja se primjenjuje na tkivo ili ležište tumora, uz istodobno smanjenje doze zračenja na okolna tkiva. Ukupno preživljenje bolesnika koji su liječeni IMRT je slično u usporedbi s onima koji su liječeni zračenjem standardnom konformalnom tehnikom (84-87).

Brojne studije faze II su pokazale da tehnika IMRT, primjenjena u liječenju različitih tumora, smanjuje učestalost kasnih komplikacija zračenja bez kompromitiranja lokalne kontrole bolesti. U novije se vrijeme istraživanjima s nasumičnim izborom bolesnika

pokazala prednost kliničke primjene IMRT u liječenju planocelularnog karcinoma glave i vrata u smislu manje učestalosti kserostomije te poštede očnog živca (85, 88, 89).

1.1.5.3. Kemoterapija

Najčešće primjenjivani citostatici u liječenju karcinoma usne šupljine su: cisplatina, karboplatina, 5-florouracil, metotreksat, paklitaksel, docetaksel i u zadnje vrijeme, cetuksimab (90).

Primjenjuju se na slijedeće načine: a) indukcijsko - prije primjene drugih oblika liječenja, (radioterapije, radiokemoterapije ili kirurškog liječenja); b) adjuvantno (nakon kurativnog kirurškog zahvata ili radioterapije, s ciljem eradikacije eventualno prisutnih subkliničkih metastaza) i c) palijativno, u bolesnika s neoperabilnim tumorom (90).

Dosadašnje studije nisu pokazale duže preživljenje ili bolju lokoregionalnu kontrolu bolesti u bolesnika u kojih je primjenjena indukcijska kemoterapija, u odnosu na konkomitantnu radiokemoterapiju (91-93).

Samostalno primjenjena, adjuvantna kemoterapija ne doprinosi dužem preživljenju, neovisno o tome da li joj je prethodio operacijski zahvat ili radioterapija (90).

U bolesnika s karcinomom usne šupljine zračenje se primjenjuje istovremeno s kemoterapijom (konkomitantna radioterapija) u slučajevima histološki pozitivnog ruba resekcije i/ili ekstrakapsularnog proboja tumora u limfne čvorove vrata (57). Učinak konkomitantne radiokemoterapije bio je predmet brojnih istraživanja kojima je pokazano da ovaj oblik liječenja dovodi do produženja ukupnog preživljenja u rasponu od 1 do 8%, u odnosu na liječenje samo radioterapijom (94, 95). Potvrđena je i prednost konkomitantne radiokemoterapije s obzirom na učestalost pojave lokalnog recidiva bolesti te DFS.

Cetuksimab je trenutačno jedini lijek registriran za ciljano liječenje planocelularnog karcinoma usne šupljine. Riječ je o himeričnom monoklonskom protutijelu koje se veže na izvanstanični dio EGFR, što za posljedicu ima inhibiciju rasta, invazije i metastaziranja stanica raka. Osim navedenih mehanizama, nedavno su potvrđeni i drugi mehanizmi kojima cetuksimab inhibira rast stanica karcinoma usne šupljine kao što su inhibiranje epitelno-mezenhimalnog prijelaza (EMT, od eng. *epithelial-mesenchymal transition*), te modulacija izraženosti integrina $\beta 5$ (96).

Objektivni odgovor na kemoterapiju najviše ovisi o stadiju bolesti, općem statusu bolesnika (PS, od eng. *performans status*) i prethodnom liječenju. Bolesnici s lokaliziranim tumorom imaju bolji odgovor na liječenje citostaticima u odnosu na bolesnike s udaljenim

metastazama. Isto vrijedi i za bolesnike dobrog PS te one koji nisu prethodno liječeni. Također, primarno radiorezistentni tumori pokazuju neosjetljivost na terapiju citostaticima (90).

1.2. Metastaziranje karcinoma usne šupljine

1.2.1. Limfni sustav glave i vrata

Osnovne kliničke karakteristike zloćudnih tumora invazivni rast i metastaziranje, posljedica su molekularnih događaja vezanih uz nekontroliranu proliferaciju zbog, gubitka funkcije proteina - supresora rasta, replikaciju i imortalnost, indukciju angiogeneze, izbjegavanje programirane stanične smrti (apoptoze), izbjegavanje imunološkog odgovora domaćina, indukciju upale, nestabilnost genoma/mutacije i deregulaciju energetskeg metabolizma stanice (**slika 1**).



Slika 1. Osnovna obilježja zloćudne stanice (97).

Metastaziranje je složeni proces obilježen gubitkom adhezije i posljedičnom migracijom stanica tumora kroz intersticijski matriks, njihovim ulaskom u limfni sustav ili krvni optok te

„naseljavanjem“ regionalnih limfnih čvorova i/ili udaljenih organa (98, 99). Stupanj zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova vrata je u većine solidnih tumora glave i vrata najvažniji prognostički čimbenik, koji vrlo često određuje odluku o načinu i opsegu liječenja (100). Iako je kliničko značenje zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova na ishod bolesti uglavnom poznato, molekularni mehanizmi odgovorni za metastatski potencijal zloćudnih tumora i dalje su predmet brojnih istraživanja (101-103).

1.2.2. Limfogeno metastaziranje karcinoma usne šupljine

Način na koji zloćudni tumori glave i vrata limfogeno metastaziraju objašnjavaju dvije glavne teorije: izravna ekstenzija (permeacija) i otkidanje dijelova tumora (embolizacija) (104). U potonjem slučaju, „otkinute“ stanice tumora limfom odlaze u regionalne limfne čvorove. Nakon toga, primarno invadiran metastatski limfni čvor postaje izvorom sekundarne embolizacije, za susjedni limfni čvor. Može se dogoditi i da daljnjom embolizacijom stanice tumora "preskoče" metastatski čvor (drenaža u niža područja vrata bez zahvaćenih viših područja) i bivaju odnesene u susjedne čvorove, tzv. "skip metastaze" (104). Nadalje, opsežne metastaze vrata nerijetko dovode do aberantnog tijeka limfe čime se objašnjava pojava neočekivanih (tzv. "nelogičnih metastaza") na suprotnoj strani vrata (105, 106).

1.2.3. Hematogeno metastaziranje karcinoma usne šupljine

Iako rijetke u trenutku postavljanja dijagnoze, udaljene metastaze u bolesnika s planocelularnim karcinomom glave i vrata važan su čimbenik u odabiru načina liječenja bolesti, a važne su i za procjenu preživljenja (107, 108).

Prema Lehmanu, manje od 5% bolesnika umire od izoliranih udaljenih metastaza ako je izliječena lokoregionalna bolest (109).

To su potvrdili i Liao i sur. u studiji na 889 bolesnika. Pokazali su učestalost izoliranih udaljenih metastaza u 6,6% bolesnika koji nisu razvili lokalni recidiv, odnosno u 21,4% bolesnika koji su ga razvili (110). Čimbenici rizika za nastanak udaljenih metastaza u prvoj skupini bolesnika su prisutnost metastaza u najmanje pet limfnih čvorova i proboj čahure, a u drugoj slabo diferencirani tumori, stadij bolesti >III te pojava recidiva u području vrata.

Iste je godine (2007), na 230 bolesnika, pokazano da se pojava izdvojenih udaljenih metastaza, koje su bile dokazane u 6% bolesnika, statistički značajno češće javljaju u osoba koje imaju bilateralne metastaze u limfnim čvorovima vrata (111).

Ako se u obradi bolesnika koristi proširena dijagnostička obrada (CT prsnog koša, scintigrafija kostiju i ultrazvuk abdomena) onda je udio bolesnika s udaljenim metastazama znatno veći (približno 17%) (112). Bolesnici s istovremenom pojavom lokoregionalnog recidiva i udaljenih metastaza imaju statistički značajno kraće petogodišnje preživljenje u odnosu na bolesnike s izoliranim udaljenim rasapom (0% prema 13%). Ovaj podatak dodatno naglašava važnost lokoregionalne kontrole bolesti (113).

Najčešća lokalizacija udaljenih metastaza su pluća. Ovaj organ može biti jedini organ u kojem je prisutan hematogeni rasap. I u slučaju rasapa metastaza u druge organe (jetra: 10-24%; kosti: 7-20%; koža: 13,3%; mozak: 3,3%) pluća su uvijek pogođena (114-116). Dakle, pluća su "prepreka" daljnjoj hematogenoj diseminaciji karcinoma usne šupljine, na sličan način kao što su limfni čvorovi vrata prepreka hematogenom rasapu u pluća (114, 117).

Većina studija pokazala je da su broj pozitivnih limfnih čvorova, ekstrakapsularno širenje, stupanj diferenciranosti tumora, stadij bolesti (>III), te lokoregionalni recidiv bolesti nezavisni prognostički čimbenici za pojavu udaljenih metastaza (110, 116).

1.3. Prognostički čimbenici u oboljelih od karcinoma usne šupljine

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

1. čimbenici ovisni o bolesniku,
2. čimbenici ovisni o tumoru,
3. čimbenici ovisni o liječenju (118, 119).

1.3.1. Prognostički čimbenici ovisni o bolesniku

Mnogi su čimbenici, ovisni o bolesniku, vrednovani kao „prognostički“: dob, spol, rasa, opći status, genetička predispozicija (na primjer, rizik za razvoj planocelularnog karcinoma glave i vrata je dvostruko veći ukoliko najbliži srodnik ima zloćudni tumor, a ukoliko ima tumor glave i vrata taj rizik raste na 3,65 puta) (120), imunološki status, navike, prisustvo drugih bolesti, lokalne ili sustavne komplikacije vezane uz prisustvo zloćudnog tumora, te socio-ekonomski status (121).

1.3.1.1. Dob i spol

Ishod bolesti u bolesnika s karcinomom usne šupljine pogoršava se sa starijom dobi. Analizom preživljenja 2339 bolesnika s Tajvana, Chang i sur. su korištenjem Cox-regresijskog modela dokazali da bolesnici stariji od 65 godina imaju statistički značajno lošije preživljenje u usporedbi s mlađim bolesnicima (122).

Dokazano je da bolesnici mlađi od 40 godina imaju značajno bolju prognozu obzirom na uspjeh liječenja i preživljenje (123). Prema nekim autorima, iznimku predstavlja karcinom oralnog dijela jezika u bolesnika mlađih od 40 godina koji je karakteriziran biološki agresivnijim ponašanjem. Sarkaria i sur. su, analizom podataka 152 oboljela od karcinoma usne šupljine i mlađa od 40 godina, pokazali da čak 57% ovih bolesnika razvija recidiv, a 47% umire od osnovne bolesti. Dokazali su da je u mlađih bolesnika s karcinomom jezika češći lokoregionalni recidiv te veća smrtnost u odnosu na starije bolesnike sa sličnim stadijem bolesti (124).

Hilly i sur. su u retrospektivnoj studiji na 78 bolesnika (16 bolesnika mlađih od 30 godina te 62 bolesnika starija od 60 godina) dokazali statistički značajno više stope regionalnog recidiva i udaljenih metastaza u bolesnika mlađih od 30 godina. Pojava recidiva, koji su čak u polovici mlađih bolesnika činile udaljene metastastaze, bila je povezana za smrtnih ishodom u svih bolesnika (125).

S druge strane, pojedini autori navode statistički značajno duže preživljenje u bolesnika s karcinomom jezika koji su mlađi od 45 godina (medijan ukupnog preživljenja 142 prema 34 mjeseca) (126), iako postoje i studije kojima ovo nije potvrđeno (127, 128).

Kao i u većine zloćudnih tumora glave i vrata, karcinom usne šupljine ima veću učestalost u muškaraca nego u žena te većina autora navodi bolju prognozu u žena (4-7).

1.3.1.2. Opće stanje bolesnika

U prospektivnoj studiji na 521 bolesniku s uznapredovalim planocelularnim karcinomom glave i vrata, Lee i sur. su dokazali veću učestalost lokoregionalnog recidiva te kraće preživljenje u bolesnika s niskom koncentracijom hemoglobina. U multivarijatnom modelu su T-stadij, status bolesnika izražen Karnofsky ljestvicom, N-stadij, ukupna doza zračenja te koncentracija hemoglobina dokazani kao nezavisni prognostički čimbenici preživljenja (129). I u bolesnika liječenih radiokemoterapijom je snižena razina hemoglobina (izmjerena prije početka liječenja) povezana s lošijim preživljenjem i višim stopama lokoregionalnog recidiva (129, 130).

Učinak liječenja anemije na ishod bolesti bio je predmet brojnih istraživanja. U dvostruko slijepoj, placebo kontroliranoj randomiziranoj studiji na 351 bolesniku, analiziran je utjecaj eritropoetina u bolesnika koji su liječeni zračenjem. Završna točka istraživanja bila je preživljenje do progresije bolesti (PFS, od eng. *progression-free survival*). Relativni rizik razvoja lokoregionalnog recidiva bio je 1,62 puta veći u skupini bolesnika koji su primili eritropoetin u usporedbi s bolesnicima koji su bili liječeni samo radioterapijom. Dodatno, bolesnici koji su primili eritropoetin imali su i statistički značajno kraće preživljenje (131).

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

Ishod bolesti je lošiji u bolesnika s karcinom usne šupljine lošijeg socio-ekonomskog statusa i obrazovanja, najvjerojatnije zbog lošije higijene usne šupljine te slabije dostupnosti medicinske skrbi (132).

Pridružene bolesti (komorbiditeti), na primjer - bolesti srca i perifernih krvnih žila, bubrega i pluća, mogu pogoršati tijek bolesti u bolesnika s karcinomom usne šupljine (133-135). Bolesnici koji razviju karcinom usne šupljine, a dobivaju imunosupresivnu terapiju, imaju kraće preživljenje u odnosu na bolesnike čiji imunološki sustav nije oslabljen (136).

Dodatno, neki su specifični simptomi (bolno gutanje, krvarenje iz usne šupljine te gubitak tjelesne težine), također povezani s kraćim preživljenjem (133).

1.3.2. Prognostički čimbenici ovisni o tumoru

1.3.2.1. Lokalizacija tumora

Prognoza oboljelih od planocelularnog karcinoma glave i vrata ovisi i o lokalizaciji tumora, primarno zbog toga što se opskrba krvlju i limfna drenaža razlikuju s obzirom na anatomsko područje. Na primjer, zbog bogate limfne drenaže te nepostojanje anatomskih zapreka, karcinom jezika češće metastazira u usporedbi s karcinomima drugih područja unutar usne šupljine (137). Također, limfni putevi oralnog dijela jezika prelaze središnju liniju i izravno se dreniraju u niža područja vrata. Zbog toga ovaj tumor prate obostrane i "preskačuće" metastaze vrata (npr. metastaza u području 3 ili 4 bez zahvaćenih viših područja vrata), u odnosu na druge podlokalizacije usne šupljine (138).

Rizik za pojavu regionalnih metastaza progresivno se povećava od usnice prema orofarinksu, u odnosu na smještaj primarnog tumora (132, 137).

1.3.2.2. Dubina invazije i debljina tumora

Iako se najveći promjer tumora (T-stadij) smatra prognostičkim u odnosu na pojavu regionalnih metastaza i preživljenje, brojne studije su potvrdile da debljina tumora/dubina invazije bolje korelira s prognozom ishoda bolesti u bolesnika s intraoralnim karcinomom (139, 140).

Iako su neki autori uspjeli dokazati su da je debljina tumora iznad četiri milimetra te invazija mišićnog sloja u ranom karcinomu usne šupljine negativan prognostički čimbenik, povezan s češćom pojavom regionalnih metastaza i kraćim preživljenjem (141, 142), postoje i podatci koji ovo ne potvrđuju. Postoje studije rezultatima kojih se nije moglo odrediti graničnu vrijednosti debljine tumora koja bi bila prognostička u odnosu na pojavu okultnih metastaza vrata u bolesnika s početnim karcinomom oralnog dijela jezika (143, 144).

Još uvijek nije poznata dubina invazije koja je kritična za pojavu regionalnih metastaza, za specifične lokalizacije primarnih tumora usne šupljine. Razlog tome su nedovoljno jasni kriteriji određivanja dubine invazije, odnosno debljine tumora.

1.3.2.3. Volumen tumora

Volumen tumora, određen s tri vrijednosti, bolje korelira s prognozom bolesti, u odnosu na T-stadij, koji je definiran jednom dimenzijom (najveći promjer) (145). Na 160 bolesnika s uznapredovalim karcinomom glave i vrata koji su bili liječeni primarnom radiokemoterapijom, Knegjens i sur. su pokazali da porastom volumena tumora raste i rizik lokalnog recidiva (146). U multivarijatnom modelu analize je volumen tumora pokazan, kao nezavisni prognostički čimbenik, povezan s pojavom lokoregionalnog recidiva te preživljenjem (147).

U nekim je studijama volumen tumora pokazan kao jedan od najznačajnijih čimbenika za preživljenje (146-148).

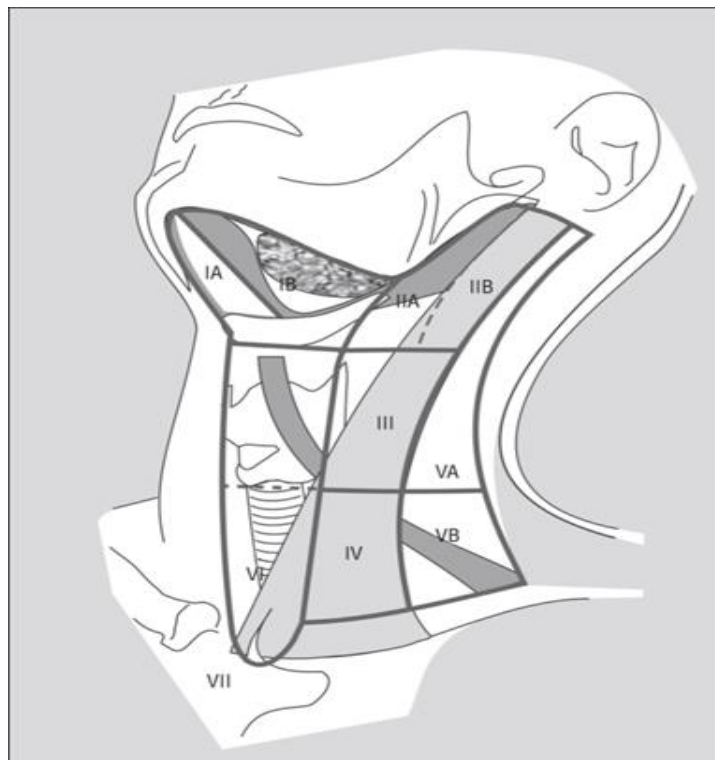
U studiji koja je obuhvatila 295 bolesnika s karcinomom usne šupljine, orofarinksa i hipofarinksa, autori su pokazali da u karcinomu usne šupljine dimenzije tumora (najveći promjer, debljina i volumen tumora) bolje koreliraju s pojavom metastaza u vratu i preživljenjem u usporedbi s biološkim ponašanjem i karakteristikama tumora (perineuralna/limfovaskularna invazija, stupanj diferencijacije). Ovi su čimbenici važniji za procjenu metastatskog potencijala karcinoma orofarinksa i hipofarinksa (148).

1.3.2.4. Stadij N

Za sada ne postoji dovoljno specifična i pouzdana dijagnostička metoda kojom je moguće dokazati mikrometastaze u regionalnim limfnim čvorovima (149). Zbog toga će, unatoč negativnom nalazu kliničkog pregleda i radioloških metoda, dio bolesnika razviti regionalnu bolest.

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

Status limfnih čvorova je najvažniji prognostički čimbenik u oboljelih od karcinoma usne šupljine (55, 56). Prisutnost regionalnih metastaza značajno smanjuje stopu preživljenja bolesnika (približno 50%), a uz njih se dvostruko češće javljaju i udaljene metastaze (150). Stoga je precizno određivanje statusa limfnih čvorova vrata neophodno za planiranje i uspješno provođenje liječenja.



Slika 2. Područja limfnih čvorova vrata (151).

Tablica 2. Anatomski smještaj limfnih čvorova vrata

Anatomsko područje	Skupina limfnih čvorova	Omeđenja anatomskih područja
Područje I	1. Submentalni limfni čvorovi 2. Submandibularni limfni čvorovi	Područje submentalnog i submandibularnog trokuta: 1. trokut između prednjeg trbuha digastričnog mišića i jezične kosti (IA) 2. trokut omeđen prednjim i stražnjim trbuhom digastričnog mišića te donjim rubom mandibule (IB)
Područje II	Gornji jugularni limfni čvorovi	Područje unutarnje jugularne vene: Od baze lubanje do visine račvišta karotide, te jezične kosti, ispred lateralnog ruba sternokleidomastoidnog mišića, a iza lateralnog ruba sternohioidnog mišića. Akcesorni živac je razdjelnica medijalnog (IIA) i lateralnog (IIB) dijela područja II
Područje III	Srednji jugularni limfni čvorovi	Područje unutarnje jugularne vene: Od visine hioidne kosti do omohioidnog mišića i donjeg ruba krikoidne hrskavice, straga do lateralnog ruba sternokleidomastoidnog mišića, a naprijed do lateralnog ruba sternohioidnog mišića
Područje IV	Donji jugularni limfni čvorovi	Područje unutarnje jugularne vene: Od donjeg ruba krikoidne hrskavice do ključne kosti, straga do lateralnog ruba sternokleidomastoidnog mišića, a naprijed do lateralnog ruba sternohioidnog mišića
Područje V	Limfni čvorovi stražnjeg trokuta vrata	Područje stražnjeg trokuta vrata: Od stražnjeg ruba sternokleidomastoidnog mišića, prednji ruba trapezoidnog mišića i ključna kost. Projekcija donjeg ruba krikoidne hrskavice dijeli područje na gornje (VA) i donje (VB) podpodručje
Područje VI	Pretrahealni, paratrahealni, prekrikoidni i peritiroidni limfni čvorovi	Područje središnjeg dijela vrata: Donji rub jezične kosti čini gornju granicu područja, a gornji rub prsne kosti donju, dok karotidne arterije čini lateralne granice
Područje VII	Limfni čvorovi gornjeg medijastinuma	Područje gornjeg medijastinuma: Od gornjeg ruba sternuma do arterije inoimate

Ishod bolesti dodatno pogoršava zahvaćenost više od jednog limfnog čvora kao i proboj čahure limfnog čvora (ekstrakapsularno širenje) (152).

U retrospektivnoj studiji kojom je bilo obuhvaćeno 380 bolesnika, pokazano je značajno kraće preživljenje u bolesnika kod kojih se tumor proširio ekstrakapsularno, u usporedbi s bolesnicima u kojih nije došlo do proboja čahure regionalnih limfnih čvorova (152). Slično je pokazano i na skupini od dodatnih 400 bolesnika; ekstrakapsularno širenje trostruko povećava rizik od nastanka regionalnog recidiva, i udvostručuje rizik od istovremenog pojavljivanja lokalnog recidiva i udaljenih metastaza (153).

1.3.2.5. Histološke značajke primarnog tumora

1.3.2.5.1. Stupanj diferenciranosti

Podatci o utjecaju stupnja diferenciranosti tumorskih stanica na ishod bolesti u bolesnika s karcinomom usne šupljine su proturječni.

Kurokawa i sur. su dokazali stupanj diferenciranosti karcinoma jezika u stadijima I i II kao nezavisan prognostički čimbenik za pojavu regionalnih metastaza (N=50; p=0,039) (154). Bolesnici s umjereno diferenciranim karcinomom imali su češću pojavu odgođenih metastaza u vratu pod uvjetom da je debljina tumora bila najmanje četiri milimetra.

Analizom različitih kliničkih i histoloških čimbenika u 45 bolesnika s karcinom jezika u stadijima T1/T2N0, Sparano i sur. su pokazali da su T2-stadij, slaba diferenciranost tumora, infiltrativni način rasta s infiltracijom u mišić, perineuralna/limfovaskularna invazija prediktori za pojavu okultnih metastaza vrata (155).

Postoje i oprečni podaci, prema kojima stupanj diferencijacije stanica karcinoma jezika u stadijima I i II nije prediktivni čimbenik za pojavu metastaza u limfnim čvorovima vrata (156, 157).

Proturječni podaci mogu se, barem dijelom, objasniti činjenicom da je određivanje i interpretacija stupnja diferenciranosti stanica tumora subjektivna procjena patologa. Dodatno, analizirani rezovi tkiva ne moraju nužno odražavati sliku diferencijacije cijelog tumora.

1.3.2.5.2. Perineuralna i limfovaskularna invazija

Perineuralna invazija je posljedica tropizma tumorskih stanica prema živčanim snopovima u stromi (158) i povezana je s agresivnim biološkim ponašanjem, sklonošću recidivu i kraćim preživljenjem (159). Dokazuje se prisutnošću stanica tumora u najmanje 1/3 opsega živca. Praćena je bolom, trncima, atrofijom mišića u slučaju denervacije, slabošću mišića za izražaj lica i žvakanje ako su invadirani facijalni ili trigeminalni živac te pojavom odgođenih metastaza (160). Ove su kliničke osobitosti pokazane u oboljelih od melanoma, karcinoma

prostate i tumora žlijezda slinovnica (adenoidni cistični karcinom i slabo diferencirani adenokarcinom) (161-163). Nerijetko, bolesnici s perineuralnom invazijom mogu biti bez simptoma.

Matsushita i sur. su pokazali da je perineuralna invazija statistički značajno povezana s većom učestalošću regionalnih metastaza te kraćim preživljenjem u bolesnika s karcinomom jezika (164).

Jardim i sur. su multivarijatnom analizom dokazali da je perineuralna invazija statistički značajan, nezavisan prognostički čimbenik preživljenja i DFS u 161 bolesnika s uznapredovalim karcinomom jezika i dna usne šupljine (165). Tai i sur. su došli do sličnih zaključaka: perineuralna invazija karcinoma jezika i bukalne sluznice stadija T1 i T2 jest negativan prognostički čimbenik povezan s povećanom debljinom tumora (perineuralna invazije tumora debljih od 6 mm je imala prognostičku vrijednost za pojavu regionalnih metastaza), višim stopama regionalnih metastaza i regionalnog recidiva te kraćeg preživljenja i preporuka je za elektivnu disekciju vrata (166). S druge strane, Chen i sur. nisu potvrdili prognostičku važnost perineuralne i limfovaskularne invaziju za ishod bolesti u retrospektivnoj studiji koja je obuhvatila 442 bolesnika s početnim karcinomom usne šupljine (167).

Naprotiv, bolesnici s perineuralnom invazijom podvrgnuti elektivnoj disekciji vrata imaju statistički značajno duže petogodišnje preživljenje u odnosu na bolesnike liječene intraoralnom ekscizijom (168), što dodatno potvrđuje perineuralnu invaziju kao statistički neovisan čimbenik za pojavu metastaza u vratu i regionalnog relapsa, bez utjecaja na pojavu lokalnog recidiva.

Postoje dokazi da je preživljenje čak kraće kod primjene zračenja u skupini bolesnika s planocelularnim karcinomom glave i vrata kojima je dokazana perineuralna invazija (169).

Limfovaskularna invazija je također negativni prognostički čimbenik, povezan s pojavom regionalnih metastaza (170, 171).

1.3.2.5.3. Neoangiogeneza

Neoangiogeneza je proces nastanka novih krvnih žila, iz postojećih. Njihov se nastanak smatra ključnim za invazivni rast i metastaziranje tumora (172-174). Čini se da gustoća mikrovaskularne mreže (MVD, od eng. *microvessel density*), posredni pokazatelj tumorske angiogeneze, može imati prognostičku vrijednost u karcinomu usne šupljine.

Pazouki i sur. pokazali su pojačanu neovaskularizaciju tijekom postupne transformacije zdrave sluznice: displazija → karcinom *in situ* → invazivni karcinom (175). U nekoliko je studija dokazana značajna povezanost između MVD i veličine planocelularnog karcinoma usne šupljine, recidiva bolesti i prisutnosti metastaza u vratu (176-181). Nadalje, čini se da promjer novostvorenih krvnih žila određuje stupanj agresivnosti tumora; veći je promjer povezan s višim stopama metastatske bolesti (182).

Postoje i studije kojima nije potvrđena ova korelacija (183-185). Ove je proturječne rezultate djelomično moguće objasniti nestandardiziranim načinom evaluacije neoangiogeneze kao i „bukom“ koju stvara bogata vaskularizacija sluznice usne šupljine, što dodatno otežava razlikovanje postojećih od novostvorenih krvnih žila.

S obzirom na to da su se u spomenutim studijama koristili različiti biljezi za MVD (faktor VIII, CD31, p53) na relativno malenom broju uzoraka tkiva tumora (19 - 57 bolesnika) koji su bili biološki raznoliki, dobiveni su rezultati teško usporedivi.

Marioni je, na primjer, određivao CD125 metodom imunohistokemije, u 28 uzoraka početnog karcinoma jezika. Povezao je povećanu CD125-MVD imunoreaktivnost (arbitrarno postavljena granica 167 „žilica“/mm²) s češćom pojavom recidiva i kraćim DFS (186).

Benevenuto i sur., su uspoređivali ispoljavanje Ki-67 (indeks proliferacije) i čimbenika von-Willenbrand (MVD) u 20 mlađih i 20 starijih bolesnika oboljelih od karcinoma jezika. Nisu dokazali povezanost proliferacije stanica i indeksa angiogeneze sa stadijem bolesti ili stupnjem diferencijacije stanica karcinoma (187).

Osim metodom imunohistokemije, vaskularizacija se može odrediti i na druge načine. Yokobori i sur. su, koristeći prijeoperacijsku pozitron emisijsku tomografiju na 27 bolesnika s karcinomom oralnog dijela jezika, pokazali povezanost vrijednosti indeksa SUV (od eng. *standardised uptake value*) i češće pojave perivaskularne invazije i pojačane gustoće MVD (188).

1.3.2.6. Biljezi potvrđeni metodom imunohistokemije

Identifikacija i razumijevanje značaja ispoljenih biljega za predviđanje biološkog ponašanja karcinoma osnova je za primjenu metode imunohistokemije (IMH) u kliničkoj medicini. Ovom se metodom određuje ispoljenost i smještaj ciljnih proteina u tkivu, koristeći specifična protutijela (189). Zahvaljujući IMH, koja se može izvesti na arhivskim, formalinom fiksiranim parafinskim uzorcima, napravljene su mnoge korisne kliničke retrospektivne studije (190). Metodom IMH identificiran je velik broj biljega koji su povezani s prognozom

oboljelih od karcinoma usne šupljine. Rezultati su ponekad proturječni. Razlike u rezultatima između studija moguće je objasniti složenošću procesa karcinogeneze, kao i razlikama u metodama procjene izraženosti molekulskih biljega te ograničenjima vezanima uz primjenu metode (190).

Da bi se odredila prognostička snaga biljega potrebno je pažljivo osmisliti studiju i jasno definirati kriterije za „pozitivni“ ili „negativni“ rezultat, za svaki pojedini biljeg. S druge strane, postoji značajna heterogenost između eksperimentalnih postupaka, i u literaturi se ne nalaze jedinstvene preporuke vezane za definiranje vrijednosti koje se smatraju pozitivnim (eng. *cut-off value*). U nedostatku jedinstvenih kriterija, kriteriji procjene obojenja u reakcijama IMH najčešće se određuju arbitrarno. Moguće je da neusuglašeni kriteriji određivanja pozitiviteta, mijenjaju i izračune vezane uz preostale parametre, što dodatno otežava procjenu prognostičke vrijednosti biljega određenog ovom metodom (190).

1.3.2.7. Koštani morfogenetski proteini

Koštani morfogenetski proteini (BMP, od eng. *bone morphogenetic proteins*) su čimbenici rasta i diferencijacije. Prvobitno su izdvojeni iz kosti, kao molekule koje potiču ektopično stvaranje kosti i hrskavice *in vivo* (191, 192). Članovi obitelji BMP su velika obitelj citokina unutar nadobitelji transformirajućeg čimbenika rasta tipa beta (TGF- β , od eng. *transforming growth factor β*). Do danas je u sisavaca otkriveno više od 20 koštanih morfogenetskih proteina koji su uključeni u embrionalni razvoj i diferencijaciju različitih tkiva (193, 194). Osim u kosti, postojanje molekula BMP dokazano je u mnogobrojnim parenhimnim organima. Uključeni su u reguliranje fizioloških procesa stanice. Stoga se njihova uloga u stanici smatra iznimno pleiotropnom (195). Značajna uloga koštanih morfogenetskih proteina potvrđena je u razvoju koštanog i živčanog sustava, očiju, bubrega i srca (196).

Koštani morfogenetski proteini sintetiziraju se kao velike prekursorske molekule koje su tri do četiri puta veće od zrelog proteina. Sastoje se od hidrofobnih sekrecijskih vodećih sljedova i osnovnog propeptidnog područja. Zreli dio molekule, unutar kojega se nalazi sedam molekula cisteina, nalazi se na karboksiterminalnom dijelu molekule propeptida. Zreli koštani morfogenetski protein sadrži dva polipeptida, najčešće homodimera, povezana disulfidnim vezama, molekulske mase između 30-36 kDa. U reducirajućim je uvjetima vidljivo da dimere čine dvije glikozilirane podjedinice, molekularnih masa 18 kDa i 16 kDa. Kemijski i enzimatski deglikozilirani dimeri imaju molekulsku masu od 27 kDa. Osim kao homodimeri, molekule BMP pokazuju mogućnost stvaranja heterodimera, dimerizacije dvaju

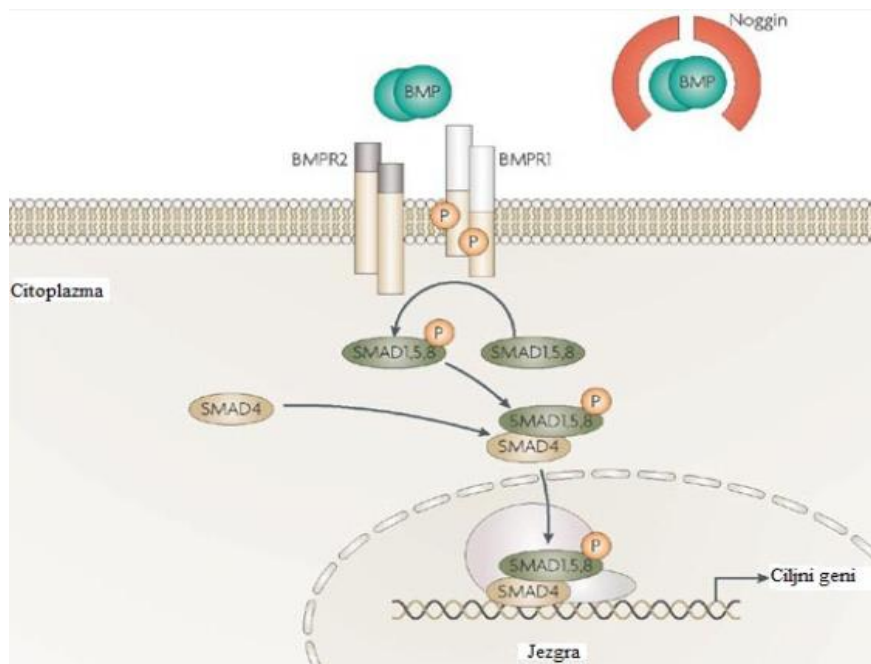
različitih proteina te jednoga koštanog morfogenetskog proteina s drugim članom nadobitelji TGF β .

Izlučeni koštani morfogenetski protein, koji se sastoji od dvije prodomene koje ostaju nekovalentno povezane s disulfidno povezanim zrelim oblikom molekule, ima molekularnu masu od 110-120 kDa.

U osteoinduktivnim ekstraktima kosti goveda izdvojeno je sedam molekula koštanih morfogenetskih proteina, BMP1-BMP7. Poznavanje djelomičnog slijeda aminokiselina omogućilo je kvalitetno sintetiziranje specifičnih oligonukleotidnih proba, koje su upotrijebljene za dobivanje komplementarnih molekula DNA (cDNA, od eng. *complementary DNA*), za svaki koštani morfogenetski protein zasebno. U čovjeka su cDNA za BMP1, -2, -4, -5 i -7 dobivene iz genske banke stanične linije mikrocelularnog karcinoma pluća H128, a klonovi za BMP6 dobiveni su iz osteoblastične stanične linije osteosarkoma U-2 OS (197). Za nekoliko članova obitelji koštanih morfogenetskih proteina određena je lokalizacija na kromosomima čovjeka: BMP1 (kromosom 8), BMP2 (kromosom 20), BMP3 (kromosom 4), BMP4 (kromosom 14), BMP5 (kromosom 6), BMP6 (kromosom 6), BMP7 (kromosom 20), BMP8 (kromosom 1), BMP14 (kromosom 22), BMP13 (kromosom 8), BMP12 (kromosom 2) i BMP15 (kromosom X) (198-200). Slijed aminokiselina molekula BMP pokazuje evolucijski snažnu očuvanost primarne strukture. Na primjer, sljedovi BMP6 i BMP7 u miša su slični onima u čovjeka, s razlikom u samo jednoj (BMP7) ili dvije (BMP6) aminokiseline u području cisteina.

Mutacije gena za *BMP* povezane su s nastankom nekoliko razvojnih anomalija. Poremećaj razvoja zuba, dentinogenesis imperfecta tipa II, povezan je s mutacijom gena za *BMP3*. Mutacija gena za *BMP2* povezuje se s nastankom sindroma Holt-Oram, koji je obilježen nestabilnošću kostura i lomovima kostiju u oboljelih. Sindrom se očituje i poremećajem razvoja srca i kostura, što rezultira i atrijskim septalnim defektom te deformitetima gornjih udova (201). Mutacije u genima skupine *BMP* nerijetko čine molekulsku podlogu za nastanak sindroma progresivne osificirajuće fibrodisplazije, zbog poremećaja osteogeneze. To je iznimno rijedak genetski poremećaj obilježen okoštavanjem skeletnih mišića i poremećajem razvoja nožnih prstiju. Pretpostavlja se da bi u nastanak ovog poremećaja mogli biti uključeni geni za *BMP2*- ili *4*. Bolest može biti posljedica greške u regulaciji BMP gena, poremećaju receptora ili poremećaju regulacije signalnog puta (202).

Regulacija prijenosa signala posredovana proteinima BMP započinje već izvan stanica, na razini aktiviranja molekule iz prekusorskih nezrelih kompleksa, te njihovim međudjelovanjem s drugim specifičnim veznim proteinima i receptorima. U prijenos signala posredovan BMP uključeni su transmembranski receptori: serin/treonin kinaze tipa I i II koje sadrže kratko izvanstanično područje s 10-12 cisteina koji veže ciljni protein, transmembranskog područja i unutarstaničnog dijela sa serin/treonin kinaznom aktivnošću (196). Nakon vezanje BMP za ciljni receptor (kompleks ligand-receptor), dolazi do unutarstaničnog prijenosa signala heterooligomernim kompleksima Smad koji, aktivirani fosforilacijom, odlaze u jezgru samostalno ili u kompleksu s drugim proteinima. U jezgri utječu na brojne aktivatore i represore transkripcije kao i čimbenike remodeliranja kromatina čime reguliraju aktivnost ciljnih gena (196). Na ovaj način molekule BMP mogu istovremeno regulirati aktivnost nekoliko gena, što rezultira tkivno-specifičnim učincima.



Slika 3. BMP-posredovan signalni put (203).

Poznato je da molekule BMP mehanizmom negativne povratne sprege mogu regulirati vlastitu aktivnost. Ponekada, ovaj proces nije dostatan, zbog čega dolazi do modulacije signalnog prijenosa BMP preko njihovih antagonista. Negativni regulatori aktivnosti BMP klasificiraju se kao pseudoreceptori (transmembranski proteini s izvanstaničnom domenom koja je slična receptorima za BMP), inhibitori kompleksa Smad (na primjer Smad 6 i 7), te

čimbenici koji potiču proteolizu molekula Smad (na primjer Smurf 1 i 2). Također, postoji i velik broj izvanstaničnih molekula poput nogina, kordina, folistatina, ventropina i Tsg (od eng. *twisted gastrulation*) koji onemogućuju vezanje molekule BMP za receptor na staničnoj membrani (204).

Izraženost molekula BMP, njihovih receptora te regulatora unutarstaničnog prijenosa signala posredovanog s BMP promijenjeni su u brojnim tumorima, u usporedbi sa zdravim tkivima. Promijenjena izraženost BMP dokazana je i u tumorima epitelnog (pluća, dojka), i u tumorima mezodermalnog (kost, bubreg) podrijetla. Korištenjem analize kvantitativne izraženosti gena određivanjem mRNA, Reinholz i sur. su dokazali da je ekspresija *BMP2* molekule snižena u neinvazivnom, lokalno invazivnom i metastatskom karcinomu dojke, u usporedbi s zdravim tkivom dojke (205).

S druge strane, nedavno je potvrđena i dvojaka uloga BMP2. U karcinomu jajnika, BMP2 koči rast stanica raka *in vitro*, dok *in vivo* potiče rast stanica tumora te rezistenciju na terapiju citostaticima (206).

Povećana izraženost BMP5, -6 i -7, koje su strukturno najbližnje molekule, pokazana je u tkivu većine zloćudnih tumora (207). Iznimku predstavlja BMP7, čija je izraženost smanjena u tkivu nefroblastoma, uz proturječne rezultate za karcinom prostate (208-210).

U studiji iz 2015, dodatak BMP7 u liniju stanica glioblastoma sprječava rast tumora, smanjuje izraženost biljega zloćudnog potencijala te povećava izraženost inhibitora staničnog ciklusa. Autori su zaključili da ovaj protein ima potencijal za primjenu u kliničkim uvjetima, u kombinaciji s drugim oblicima citoreduktivnog liječenja poput radiokemoterapije (211). Slično, u preliminarnoj studiji *in vitro*, Lappin i sur. su potvrdili protutumorski, o primijenjenoj dozi ovisan, učinak BMP7 u liniji stanica planocelularnog karcinoma usne šupljine. U isto vrijeme, BMP7 nije utjecao na biološka svojstva keratinocita izdvojenih iz usne šupljine. Autori su zaključili da BMP7 ima antineoplastični učinak kojeg je potrebno potvrditi *in vivo* (212). Naprotiv, visoka izraženost BMP7 zajedno s biljezima CD4 i CD25 na T-limfocitima u karcinomu debelog crijeva, povezana je s pojavom regionalnih metastaza, važnim čimbenikom kraćeg preživljenja oboljelih (213).

Povezanost molekula BMP s invazijom, i metastaziranjem tumora predmet je brojnih istraživanja. Povećana izraženost molekula BMP dokazana je u tkivu i linijama stanica raka prostate. Povećana izraženost BMP6 u stanicama raka prostate povezana je s češćom pojavom udaljenih metastaza koje pokazuju sličnu izraženost ovog proteina u usporedbi s primarnim

tumorom (214). Također, pojačana BMP6 imunoreaktivnost povezuje se češćom pojavom recidiva te kraćim preživljenjem u ovih bolesnika (215). Slično, BMP7 pokazuje povećanu aktivnost i u primarnom tumoru i područjima metastaza. Lee i sur. dokazali su da povećano stvaranje BMP2,-4 i -6 utječe na nastanak osteoblastičnih lezija u kosti miša nakon implantacije LAPC-9 stanica podrijetlom od karcinoma prostate koji stvara osteoblastične metastaze (216).

Jin i sur. dokazali su povišene vrijednosti BMP2,-4 i -5 u metastatski promijenjenim regionalnim limfnim čvorovima što se smatra važnim procesom u daljnjoj diseminaciji raka i nastanku udaljenih metastaza (217).

U staničnoj liniji raka pluća, BMP2 potiče migraciju i invaziju te potiče neoangiogenezu aktiviranjem čimbenika rasta endotela krvnih žila (VEGF, od eng. *vascular endothelial growth factor*) (218, 219). Također, visoka izraženost BMP2 u kombinaciji sa smanjenim izražajem ili gubitkom funkcije protein kinaze LKB1, koja je negativni regulator BMP-potaknutih signalnih puteva, novi je mehanizam povezan s proliferacijom i invazijom u karcinomu pluća ne-malih stanica (220).

Pojedine molekule (BMP2 i 7) potiču EMT, tijekom kojeg epitelne stanice poprimaju obilježja mezenhimalnih. Jedna od važnih osobitosti prijelaza je gubitak međustanične adhezije, zbog čega se pojačavaju pokretljivost, invazija i diseminaciju stanica raka (221, 222). S druge strane, BMP6 i 7 mogu potaknuti reverzibilni mezenhimalno-epitelni prijelaz (MET, od eng. *mesenhyimal-epithelial transition*), koji obilježava, smanjena biološka aktivnost stanica tumora (223, 224). Nedavni dokazi pokazuju da su BMP uključeni u proces angiogeneze tumora, izravnim djelovanjem na endotelne stanice krvnih žila te posredno, procesom regulacije aktivnosti angiogenih čimbenika (225).

Poznato je da molekule BMP mogu služiti i kao razlikovni biljeg za različite podtipove tumora. Određivanje BMP2 u tkivu pleomorfnog adenoma omogućuje razlikovanje ovog tumora u odnosu na druge tumore žlijezda slinovnica (226).

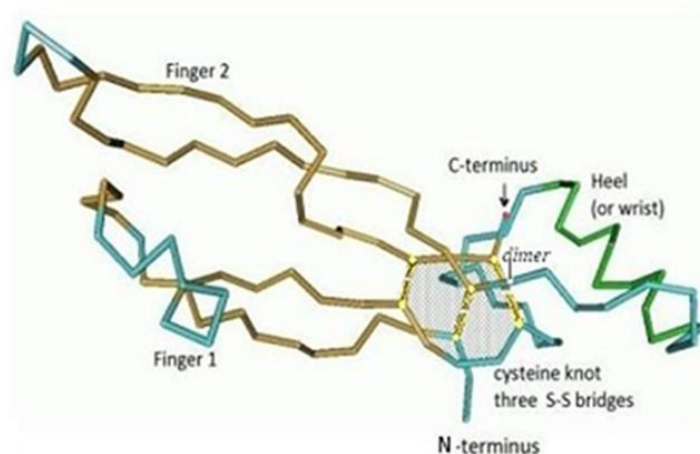
S obzirom na važnu ulogu u razvoju krvotvornog sustava tijekom embriogeneze, molekule BMP su intenzivno istražene u leukemijama i limfomima. Kao i u solidnim tumorima, BMP2 inhibira stanični ciklus u fazi G1, što za posljedicu ima apoptozu. Ovo je pokazano na linijama stanica porijeklom mijeloma čovjeka (227). U koštanoj srži oboljelih od akutne promijeloblastične leukemije, dokazana je visoka izraženost BMP2,-4 i -7. Primjena kemoterapije i trans-retinoične kiseline smanjuje koncentraciju ovih molekula što bi moglo

biti korisno u kontekstu potencijalnog značaja BMP kao biljega minimalne ostatne bolesti, u razdoblju praćenja (228).

U kliničkoj se praksi danas koriste rekombinantni BMP2 i 7 čovjeka, u svrhu cijeljenja oštećene kosti, u okolnostima kada fiziološki procesi cijeljenja kosti zakažu (229). Primjenjuju se lokalno, korištenjem kolagene spužvice kao nosača koji omogućuje započinjanje procesa nastanka nove kosti kemotaksijom progenitornih stanica (230). Jedna od neželjenih pojava primjene ovih rekombinantnih molekula jest resorpcija kosti na mjestu ugradnje, zbog velike količine proteina koja se lokalno primjenjuje uz istovremeno stvaranje ektopične kosti u okolnom tkivu. Ovaj je proces popraćen upalom i edemom (231). S druge strane, primjena BMP6 u manjim količinama, u biokompatibilnom-autolognom nosaču, mehanizmom diferencijacije mezenhimalnih stanica u osteoblaste, stimulira cijeljenje defekata kosti bez resorpcije ili upale, u životinja (231). Ovo ga svojstvo svrstava u potencijalno komercijalno dostupne nove nosače za regeneraciju kosti.

1.3.2.7.1. Koštani morfogogenetski protein 6 (BMP6)

cDNA BMP6 originalno je prepoznata u cDNA banke embrija miša. Nazvana je Vgr-1, s obzirom na homologiju s cDNA i s proteinom Vg-1 u žabe (232). Homolozi proteina Vgr-1 goveda i čovjeka izolirani su iz kostiju i nazvani BMP6 (233). Na **slici 4** je prikazana struktura dimera BMP6.



Slika 4. Dimer BMP6. Izvor: Ljubaznošću dr. Hermanna Oppermannia vodećeg istraživača u području koštanih morfogogenetskih proteina.

Prisustvo mRNA za BMP6 u sisavaca dokazano je u različitim tkivima i organima (kost, posteljica, maternica, bubreg, pluća, mozak, mišići, koža). BMP6 potiče izraženost hrskavičnog i osteogenog fenotipa *in vitro* te inducira stvaranje hrskavice i kostiju *in vivo* (234).

Kristalna struktura BMP6 čovjeka slična je molekuli BMP7. Istraživanja interakcija BMP6 s različitim ektodomenama receptora tipa I su pokazala da N-glikozilacija asparagina na položaju 73 (Asn73) ima značajnu ulogu za prepoznavanje aktivinskim receptorom tipa I (235).

Miševi bez funkcionalnog BMP6 ("BMP6 knock-out") preživljavaju i fertilni su. Životinje ne pokazuju vidljive nedostatke u tkivima u kojima je inače normalno prisutan BMP6. Njihov skelet se ne razlikuje od skeleta miševa divljeg tipa. Međutim, pažljivom analizom kostura embrija ovih miševa tijekom kasnije faze razvoja može se uočiti zakašnjelo okoštavanje prsne kosti. Hibridizacijom *in situ* ustanovljen je istovremeni izražaj gena za BMP2 i BMP6 u hipertrofiranoj hrskavici divljeg tipa miševa, što bi moglo upućivati da BMP2 funkcionalno može zamijeniti BMP6 (236).

Pokazano je da slabiji izražaj gena za BMP6 u epidermisu potiče diobu stanica epidermisa u odraslih miševa kao i njihovu poremećenu diferencijaciju, pri čemu nastaju oštećenja slična psorijazi u ljudi (237).

Dosadašnja istraživanja pokazuju da je BMP6 najučinkovitiji u poticanju osteogene diferencijacije mezenhimalnih matičnih stanica (238). Sammons i sur. također su potvrdili da BMP6 pojačava osteogenu diferencijaciju i mineralizaciju u kulturi mezenhimalnih matičnih stanica (239). Rezultati dobiveni ispitivanjima u Laboratoriju za mineralizirana tkiva pokazuju da miševi bez alela za BMP6, imaju smanjeni omjer volumena kosti u odnosu na volumen trabekula u usporedbi s miševima divljeg tipa (240). Također je pokazano da sistemski primijenjen rekombinantni BMP6 čovjeka u osteoporotičnih miševa i štakora inducira stvaranje nove kosti te poboljšava njihovu mikroarhitekturu i kvalitetu (241).

BMP6 djeluje i kao poticatelj hipertrofije hondrocita, a postoje i dokazi da pomaže u održavanju fiziološke funkcije ploče rasta (242, 243). S druge strane, kod primjene antikoagulacijske terapije, BMP6 doprinosi osteoporozu induciranoj heparinom (244).

Rezultati molekularnih analiza su pokazali povezanost između pojačane izraženosti BMP6 u tkivu zloćudnih tumora (jednjak, prostata, mokraćni mjehur, debelo crijevo), i niske izraženosti negativnih regulatora njegove aktivnosti - nogina i SOST, s progresijom bolesti i kraćim preživljenjem bolesnika (245).

S druge strane, BMP6 inhibira estrogenom potaknutu proliferaciju stanica raka dojke te mijeloma (246, 247).

Unatoč poznatoj ulozi u procesu pregradnje i metabolizmu kosti te pojačanoj izraženosti u različitim zloćudnim tumorima, vrlo se malo zna o značaju izraženosti BMP6 u planocelularnom karcinomu usne šupljine. Prema dostupnoj literaturi, jedini rad u ovom području objavljen je 2013. godine (248). Studijom u koju je bilo uključeno 30 bolesnika pokazana je povezanost jačeg stupnja izraženosti BMP6 i receptora epidermalnog čimbenika rasta (EGFR, od eng. *epidermal growth factor receptor*) s prodorom u kost (248). Također, autori su pokazali da je pojačana izraženost BMP6 u tkivu tumora pozitivno povezana s njegovim biološki agresivnijim ponašanjem. Slično, Raida i sur. dokazali su da je pojačana izraženost BMP6 u planocelularnom karcinomu jednjaka negativan prognostički čimbenik, povezan sa slabijim stupnjem diferencijacije i keratinizacije te kraćim preživljenjem (249).

1.3.2.8. Molekularni biljezi

Metoda imunohistokemije koristila se u brojnim studijama za određivanje izraženost mnogih proteina. Neki od njih (tumor protein p53 (od eng. *tumor protein p53*), EGFR i jedan od njegovih liganada, transformirajući čimbenik rasta alfa (TGF- α , od eng. *transforming growth factor alpha*), te ciklin D1 obećavajući su prognostički biljezi za planocelularne karcinome glave i vrata (250-252).

EGFR je član obitelji receptora s tirozin kinaznom aktivnošću. Ova skupina receptora, nakon vezanja liganda (npr. EGF ili TGF- α), započinju proces unutarstaničnog prijenos signala s posljedičnom proliferacijom stanice.

Brojne studije ukazale su na EGFR kao molekularni biljeg loše prognoze planocelularnog karcinoma usne šupljine (253-255). Randomiziranom studijom faze III (RTOG51) njegova visoka izraženost mogla se povezati sa značajno kraćim preživljenjem i DFS. U multivarijatnom se modelu pokazao kao neovisan čimbenik preživljenja i pojave lokoregionalnog recidiva (256). Ovaj se trend pojašnjava činjenicom da EGFR-posredovan prijenos signala u konačnici potiče pokretljivost stanica, i stvaranje novih krvnih žila, a

oslabljuje međustaničnu adheziju. Ovi su procesi neophodni za invazivni rast i metastaziranje tumora. Pojačana izraženost epidermalnog čimbenika rasta (EGF, od eng. *epidermal growth factor*), jednog od EGFR liganada, povezuje se s niskim stopama odgovora na liječenje cetuksimabom (257). Prepoznavanje važnosti obitelji receptora s tirozin kinaznom aktivnošću u koordiniranom reguliranju stanične proliferacije, apoptoze i angiogeneze dovelo je do razvoja nekoliko načina liječenja koji djeluju na signalni put potaknut s EGFR. Dvije skupine molekula (cetuksimab - ligand za EGFR i gefitinib/erlotinib - selektivni inhibitori tirozin kinaznog područja EGFR)) su prošle faze pretkliničkih i kliničkih istraživanja za različite vrste zloćudnih tumora, s ograničenim brojem indikacija za kliničku primjenu. Randomizirana istraživanja na adenokarcinomu debelog crijeva pokazala su da je dodatak cetuksimaba cisplatinu ili irinotekanu povezan s statistički značajno višim stopama objektivnog odgovora (23% prema 11%, $p=0,007$) u odnosu na samostalnu „klasičnu“ kemoterapiju (258). Međutim, veće stope odgovora na multimodalnu terapiju nisu rezultirale produženjem ukupnog preživljenja u odnosu na monoterapiju ($p=0,48$). Slično, dodatak gefitiniba ne doprinosi dužem preživljenju u odnosu na samostalno primijenjenu "klasičnu" kemoterapiju u oboljelih od karcinoma pluća ne-malih stanica, stadija III i IV (259).

Za razliku od skromnih rezultata koji se dobiju davanjem EGFR antagonista s kemoterapijom, primjena cetuksimaba uz radioterapiju u bolesnika s lokalno uznapredovalim planocelularnim karcinomom glave i vrata ima impresivno djelovanje. Ono je pokazano kroz statistički značajno produženje ukupnog preživljenja i lokoregionalne kontrole bolesti u usporedbi sa samostalno provedenim zračenjem (260).

1.3.3. Prognostički čimbenici ovisni o liječenju

O prognostičkim čimbenicima ovisnim o liječenju (osobito kirurškom) se zna puno manje u odnosu na prethodno analizirane čimbenike. Potencijalno su vrlo šaroliki, s obzirom na to da na njih utječu posebni terapijski postupci ili odstupanja u tijeku liječenja (na primjer, razlike u primijenjenim tehnikama i utjecaj posebnih, specifičnih oblika liječenja (vrsta, doza i intenzitet kemoterapije ili vrijeme primjene, način frakcioniranja te ukupna doza zračenja) koji mogu utjecati na ishod bolesti i preživljenje bolesnika (261).

Na primjer, primjena hiperfrakcioniranja u odnosu na konvencionalni oblik frakcioniranja povezana je s dužim preživljenjem oboljelih od karcinoma usne šupljine (82, 83). U retrospektivnoj studiji na 6830 bolesnika sa stadijem I i II, Luryi i sur. su dokazali više stope preživljenje u bolesnika koji su bili podvrgnuti (preventivnoj) disekciji vrata te u liječenih u

akademskim/istraživačkim institucijama. Niže stope preživljenja zabilježene su u bolesnika s pozitivnim rubom resekcije te onih koji su bili podvrgnuti adjuvantnom zračenju ili kemoterapiji (262). Ista skupina autora potvrdila je razliku u histološkom statusu ruba resekcije ovisno o tipu zdravstvene ustanove koja je liječila bolesnike. Visoka učestalost pozitivnog ruba resekcije bila je povezan sa stadijem bolesti, stupnjem zrelosti tumora, podlokalizacijom primarnog tumora, ali i s liječenjem u ne-akademskim institucijama te u ustanovama u kojima se operira malen broj bolesnika s intraoralnim karcinomom. Autori su zaključili da se statusa ruba resekcije može koristiti za praćenje kvalitete usluge zdravstvenih ustanova koje se bave liječenjem početnog karcinoma usne šupljine (263).

2. HIPOTEZA

Pojačana izraženost molekule BMP6 u planocelularnom karcinomu usne šupljine negativan je prognostički čimbenik u odnosu na razvoj lokalnog recidiva, regionalnih i udaljenih metastaza te preživljenje bolesnika.

3. CILJEVI RADA

3.1. Opći cilj

Cilj ovog retrospektivnog istraživanja bio je odrediti značaj izraženosti BMP6 u planocelularnom karcinomu usne šupljine.

3.2. Specifični ciljevi

1. Korelirati stupanj izraženosti BMP6 s pojavom recidiva bolesti i preživljenjem bolesnika.
2. Korelirati stupanj izraženosti BMP6 s prognostičkim parametrima: dob, spol, veličina i podlokalizacija tumora, dubina invazije, stupanj diferencijacije, perineuralna/perivaskularna invazija, invazija periosta i kosti, broj i najniže područje zahvaćenih limfnih čvorova, ekstrakapsularno širenje.
3. Analizirati dodatne kliničke i histološke prognostičke čimbenike kako bi se odredili statistički nezavisni čimbenici koji imaju prognostičku vrijednost u odnosu na pojavu regionalnih metastaza te preživljenje bolesnika.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Ispitanici

U ovom su se retrospektivnom istraživanju koristila tkiva planocelularnog karcinoma usne šupljine bolesnika koji su bili liječeni primarno kirurški, u razdoblju od 1. siječnja 2003. do 31. prosinca 2008. godine u Klinici za kirurgiju lica, čeljusti i usta Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kliničke bolnice Dubrava. U istraživanje je uključeno 120 bolesnika s novodijagnosticiranim i histološki potvrđenim planocelularnim karcinomom usne šupljine, kliničkog stadija bolesti T1-T3N0. Bolesnici u kojih je radioterapija korištena kao elektivni postupak, u slučajevima kada metastaze u limfnim čvorovima vrata nisu bile klinički manifestne (cN0), nisu uključeni u ovo istraživanje.

U odnosu na izraženost ciljnog proteina BMP6, ispitanu skupinu čine bolesnici koji su razvili recidiv bolesti (lokalni recidiv, regionalne i/ili udaljene metastaze). Broj ispitanika u ovoj skupini je 54. Kontrolnu skupinu čine bolesnici bez recidiva bolesti (lokalni recidiv, regionalne i/ili udaljene metastaze). Broj ispitanika u kontrolnoj skupini je 66. Uzorci tkiva obrađeni su standardnom metodom koja uključuje fiksaciju tkiva u 10% puferiranom formalinu i uklapanje u parafinske blokove, rezanje na debljinu od 5 um, deparafiniranje i bojanje standardnom metodom hemalaun eozin (HE).

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

4.2. Postupci istraživanja

4.2.1. Podatci o liječenju bolesnika

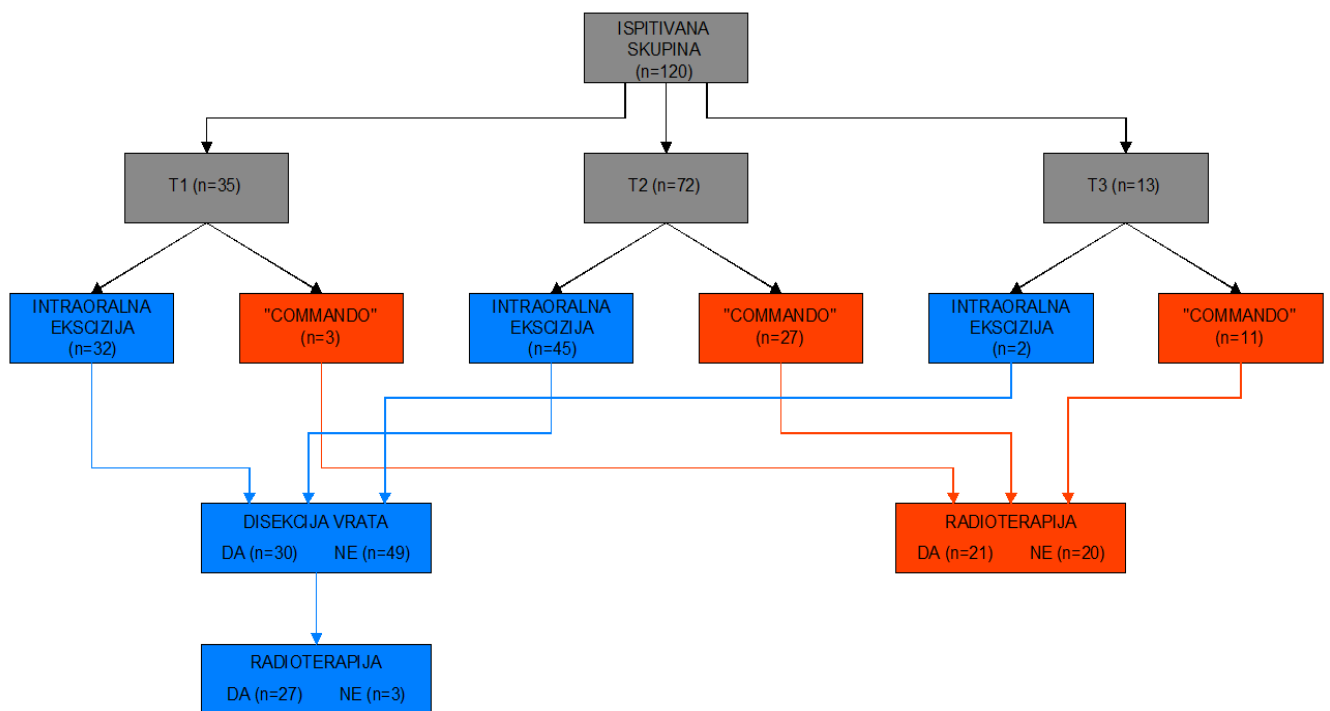
Svim bolesnicima je u trenutku postavljanja dijagnoze određen stadij bolesti prema međunarodnoj TNM-klasifikaciji iz 2002. godine (35). U stadiju bolesti T1 bilo je 35 (29,2%) bolesnika, u stadiju T2 72 (60%) bolesnika, dok je u stadiju T3 bilo 13 (10,8%) bolesnika.

Kirurško liječenje je provedeno korištenjem standardnog algoritma liječenja: operacijom "commando" najčešće su operirani bolesnici čiji su tumori bili veći od 3 cm (tri u

stadiju T1, 27 u stadiju T2 i 11 u stadiju T3). Intraoralna ekscizija je najčešće primijenjena u bolesnika s tumorima manjim od 3 centimetra (32 u stadiju T1, 45 u stadiju T2 i dva u stadiju T3). Kod operacije "commando" učinjena je elektivna disekcija vrata, a kod intraoralne ekscizije kurativna zbog pojave regionalnih metastaza u periodu praćenja.

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

Na **slici 5** prikazan je algoritam liječenja bolesnika uključenih u ovo istraživanje.



Slika 5. Algoritam liječenja bolesnika.

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

U odnosu na opseg primarnog kirurškog liječenja, ispitanici su podijeljeni u dvije skupine: a) bolesnici u kojih je učinjena intraoralna ekscizija primarnog tumora (N=79) i b) bolesnici u kojih je učinjena intraoralna ekscizija i elektivna disekcija vrata - operacija "commando" (N=41). U slučaju pojave regionalnih metastaza u bolesnika u kojih je učinjena samo resekcija primarnog tumora, u periodu praćenja (konverzija cN0→cN+→pN+), učinjena je odgođena disekcija vrata. U odstranjenom je tkivu patolog odredio ukupan broj limfnih čvorova, broj i lokalizaciju (područje vrata) pozitivnih limfnih čvorova, najniže pozitivno područje, ekstrakapsularno širenje.

4.2.2. Histološka mjerenja

Za svaki su tumor određeni: a) veličina (najveći promjer), b) stupanj diferencijacije (procjena polimorfije u najslabije diferenciranom dijelu tumora); c) resekcijski rub tumora; d) dubina invazije; e) perineuralna/perivaskularna invazija; f) zahvaćenost periosta i g) kosti; h) broj limfnih čvorova zahvaćenih metastazama; i) najniže područje limfnih čvorova s metastazama; j) ekstrakapsularno širenje tumora. Tumori su, s obzirom na diferencijaciju, podijeljeni u tri skupine: 1. tumori s više od 75% dobro diferenciranih stanica; 2. tumori s 25 do 75% dobro diferenciranih stanica 3. tumori s manje od 25% dobro diferenciranih stanica i/ili jasno anaplastični tumori. Pozitivan resekcijski rub, koji se histološki analizirao zajedno sa zahvaćenošću periosta i kosti, definiran je kao: a) rub zahvaćen tumorom; b) rub nezahvaćen tumorom, pod uvjetom da je udaljenost tumora od ruba bila $\leq 4\text{mm}$ (tzv. "bliski rub").

Dubina invazije izmjerena je mikroskopskom lećom kao udaljenost od površine tumora (egzofitične ili infiltrativne), do maksimalne točke invazije. Medijan mjerenja (0,8 cm) je korišten kao razdjelna vrijednost skupina.

Perineuralna i perivaskularna invazija određena je kao negativna ili pozitivna.

4.2.3. Određivanje proteina BMP6 metodom imunohistokemije

Za imunohistokemiju smo koristili monoklonsko protutijelo BMP6 (Abcam Cambridge, United Kingdom). Detekcija signala temeljila se na reakciji peroksidaze, komercijalno dostupnim kompletom kemikalija (Zymed, San Francisco, CA), prema uputstvima proizvođača.

Rezovi debljine 5 μm deparafinirani su u ksilenu (Kemika, Hrvatska), rehidrirani u etanolu padajuće koncentracije (95%; 70%; 50%) (Kemika, Hrvatska) te isprani u fosfatnom puferu (PBS, od eng. *phosphate buffer saline*). Kako bi se blokirala aktivnost endogenih

peroksidaza, uzorci su inkubirani u 3% vodikovom peroksidu (Kemika, Hrvatska), a potom fiksirani metanolom (Kemika, Hrvatska), tijekom 15 minuta, na sobnoj temperaturi i ponovno isprani u PBS-u. Proces demaskiranja antigena proveden je kuhanjem preparata u 10% citratnom puferu, pH 6.2 (Dako Corporation, SAD), kroz 15 minuta u mikrovalnoj pećnici na 700 W. Preparati su potom ohlađeni na sobnu temperaturu te isprani u PBS-u. Nespecifično vezivanje blokirano je s DAKO[®] Protein Block Serum-Free (DAKO Corporation, SAD) u vlažnoj komori kroz 10 min., pri sobnoj temperaturi. Zatim je na preparate nakapano primarno protutijelo BMP6. Nakon završene inkubacije (90 minuta u vlažnoj komori pri sobnoj temperaturi), stakalca su tri puta isprana u PBS-u i inkubirana sa sekundarnim protutijelom konjugiranim s peroksidazom (HRP) koje specifično prepoznaje imunoglobuline miša, kroz 25 minuta nakon čega se predočava pozitivna reakcija (smeđe obojenje) sa supstratom (DAB) (DAKO Corporation, SAD). Jačina signala dobivenog imunohistokemijskim bojenjem izražena je semikvantitativno, određivanjem intenziteta i postotka obojanih stanica tumora u odnosu na ukupan broj stanica tumora. Postotak imunoreaktivnih stanica izražen je na slijedeći način: 0. negativna reakcija; 1. slabo izražena reakcija, do 10% pozitivnih tumorskih stanica; 2. srednje izražena reakcija, >11-50% pozitivnih tumorskih stanica te 3. jako izražena reakcija, >51% pozitivnih tumorskih stanica.

Intenzitet obojenja označen je na slijedeći način: 0. negativna reakcija; 1. slabo pozitivna reakcija; 2. srednje pozitivna reakcija; 3. jako pozitivna reakcija. Imunohistokemijski indeks bojenja dobiven je umnoškom intenziteta reakcije i postotka imunoreaktivnih stanica, a rezultati su razvrstani u tri skupine: 0 – negativna reakcija, I – umjereno izražena reakcija (umnožak 1-3), II – snažno izražena reakcija (umnožak 4, 6 ili 9).

4.2.4. Dodatni podatci i definicije vezane uz istraživanje

Za potrebe statističke analize podataka, bolesnici su razvrstani u dvije skupine prema medijanu dobi u vrijeme operacije. Primarno sijelo tumora usne šupljine definirano je u odnosu na četiri područja: sublingvalno, jezik, retromolarno ili gingiva mandibule. Klinički je određen i najveći promjer tumora (cm), a za potrebe kasnije obrade podataka tumori su razdijeljeni u dvije skupine u odnosu na medijan vrijednosti najvećega promjera (2,9 cm).

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

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

U disektatu vrata analizirani su: a) broj pregledanih/pozitivnih limfnih čvorova; b) najniže zahvaćeno područje vrata; c) proboj čahure čvora stanicama tumora. Ovi su podatci iskazani na slijedeći način: *ad* „a“ i „c“ pozitivno ili negativno; *ad* „b“ rednim brojevima, koji su (**slika 2** i **tablica 4**) za potrebe obrade podataka prikazani kao dvije skupine: a) vrat pozitivan do područja 3; b) pozitivna područja 4 i/ili 5 sa/ili bez zahvaćenih viših područja vrata. U skupini podataka o liječenju bolesnika praćena su tri pokazatelja. Vrsta operacijskog zahvata zabilježena je kao operacija "commando" ili intraoralna ekscizija. Resekcija mandibule praćena je kao kategorički pokazatelj: skupina bolesnika bez resekcije mandibule (uključuje i osteotomirane mandibule zbog pristupa na tumor - "swing" mandibule) te skupine s marginalnom (djelomično odstranjenje kosti koje uključuje alveolarni nastavak uz očuvani kontinuitet mandibule) i segmentalnom (odstranjenje pune debljine kosti) resekcijom mandibule.

Pokazateljima praćenja i ishoda bolesti objedinjeno je pet vrsta podataka (**tablica 3**). Lokalni recidiv, regionalni metastaze, pojava udaljenih metastaza su prikazani kao binarna vrijednost, tj. kao "da" (događaj se pojavljuje) ili ne (događaj se ne pojavljuje) tijekom praćenja bolesnika. Recidiv je definiran je kao prvi oblik povrata bolesti u periodu praćenja. Lokalni recidiv je definiran kao povrat bolesti u području ili unutar 2 cm od mjesta primarnog tumora.

Regionalne metastaze su definirane kao histološki potvrđene okultne metastaze u disektatu vrata bolesnika podvrgnutih operaciji "commando" ili pojava odgođenih regionalnih metastaza u vratu tijekom perioda praćenja u bolesnika primarno liječenih intraoralnom ekscizijom. Iz analize potonje skupine isključeni su svi bolesnici koji su imali lokalni recidiv jer je kod takvih bolesnika pojava bolesti u vratu vjerojatno metastaza lokalnog recidiva (tzv. "sijanje u vrat"), a ne recidiv regionalne bolesti.

Udaljene metastaze su shvaćene kao izolirana diseminacija bolesti, kojoj nije prethodila pojava lokalnog i/ili regionalnog povrata bolesti.

Preživljenje bolesnika je statistički opisano mjesecima praćenja od trenutka postavljanja dijagnoze do zadnjega datuma praćenja u kojem: a) bolesnik umire od osnovne bolesti ili je b) cenzuriran (zdrav, izgubljen iz praćenja ili je umro od drugog uzroka).

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

Tablica 3. Pokazatelji istraživanja.

Praćeni čimbenici		Pokazatelji (čimbenici)	
I. Podatci o bolesniku		1. dob 2. spol	
II. Podatci o bolesti	A. Klinički podatci	3. lokalizacija tumora 4. najveći promjer tumora	
	B. Histološki podatci	a. Tumor makroskopski	5. najveći promjer tumora
		b. Histologija tumora	6. stupanj zrelosti 7. resekcijski rub 8. dubina invazije 9. perineuralna i perivaskularna invazija 10. zahvaćenost periosta 11. zahvaćenost kosti
		c. Imunohistokemija tumora	12. BMP6
		d. Disektat vrata	13. broj pregledanih limfnih čvorova 14. broj pozitivnih limfnih čvorova 15. najniže pozitivno područje 16. status čahure
III. Podatci o liječenju		17. vrsta operacije 18. resekcija mandibule 19. radioterapija	
IV. Praćenje i ishod		20. lokalni recidiv 21. regionalne metastaze 22. udaljene metastaze 23. bez recidiva u periodu praćenja 24. preživljenje	

4.2.5. Statistička obrada podataka

Kvalitativni podatci prikazani su apsolutnom (N) i relativnom (%) učestalošću unutar istraženog uzorka ispitanika, a njihove međusobne raspodjele uspoređene su χ^2 -testom.

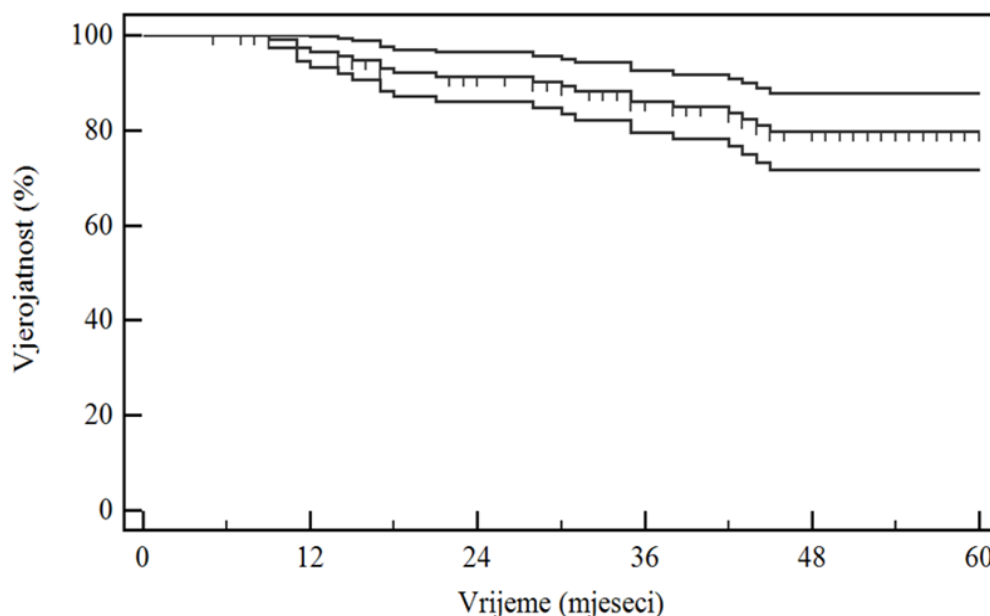
Brojčani podatci iskazani su medijanom i srednjom vrijednošću te rasponom mjerenja i standardnom devijacijom kao mjerama rasapa, ovisno o tome je li raspodjela slijedila normalnu ili ne. Brojčane vrijednosti između dviju skupina uspoređene su χ^2 -testom ili

Fisherovim testom. Krivulje preživljenja određene su metodom Kaplan-Meier, a razlike preživljenja među skupinama uspoređene su log-rank testom. Krivulja preživljenja svih ispitanika iskazana je u granicama 95%-tne pouzdanosti. Na svim su krivuljama označeni cenzurirani ispitanici, tj. ispitanici koji tijekom praćenja nisu ostvarili praćeni događaj - smrt od osnovne bolesti za ukupno preživljenje. Podatci o preživljenju iskazani su proporcijom udjelom prosječnog petogodišnjeg preživljenja i standardnom pogreškom proporcije, te iskazani postotkom, kao $PP \pm SE(PP)\%$. Multivarijatna ovisnost preživljenja o pokazateljima istraživanja ispitana je Cox-regresijskim testom, a rezultati su iskazani vrijednostima regresijskih koeficijenata i njihovom standardnom pogreškom, $\beta \pm SE(\beta)$, razinom značajnosti P i vrijednostima omjera izgleda s granicama 95%-tne pouzdanosti, OR (95% GP). Statistički značajnom smatrana je razlika $P < 0,05$.

Podatci su izvorno upisani u tumorsku bazu podataka Klinike za kirurgiju lica, čeljusti i usta Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pomoću programa dBase III+ (Ashton-Tate, Torrence (CA), SAD), preneseni u program Excel (Microsoft, Seattle (WA), SAD), a sveukupna obrada podataka učinjena je pomoću programa *MedCalc* (MedCalc Inc., Mariakerke, Belgija; licenca Katedre za medicinsku informatiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci).

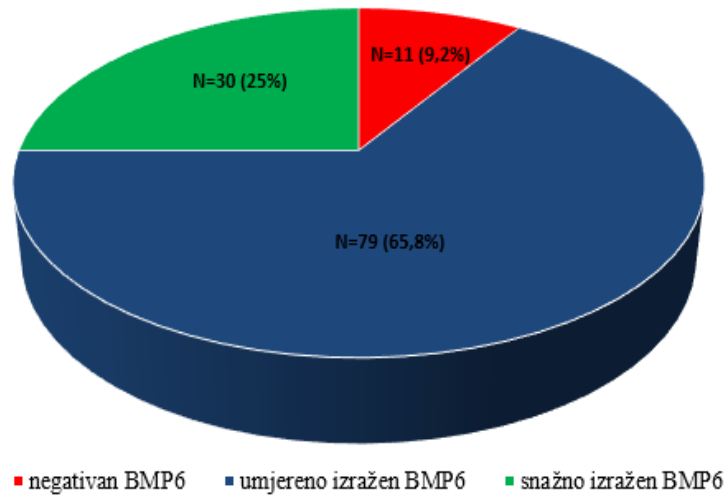
5. REZULTATI

Skupinu bolesnika uključenu u ovo istraživanje (N=120) činilo je 99 (82,5%) muškaraca i 21 (17,5%) žena. Medijan dobi bio je 59 godina. Prosječno petogodišnje preživljenje bolesnika iznosilo je $79,7 \pm 4,2\%$, s granicama 95%-tne pouzdanosti 71,6-87,8% (**slika 6**). Tijekom praćenja, od osnovne bolesti je umrlo 20 bolesnika (praćeni 9-45 mjeseci, prosječno 26 mjeseci), a 100 ih je cenzurirano (praćeni 5-120 mjeseci, prosječno 50 mjeseci). Klinički je promjer tumora iznosio 1-5,5 cm, medijana 2,9 cm, a histološki 0,5-5,5 cm, medijana 2,1 cm.



Slika 6. Krivulja preživljenja svih bolesnika. U crtane su granice 95%-tne pouzdanosti, a cenzurirani podatci su označeni okomitim crticama na krivulji preživljenja.

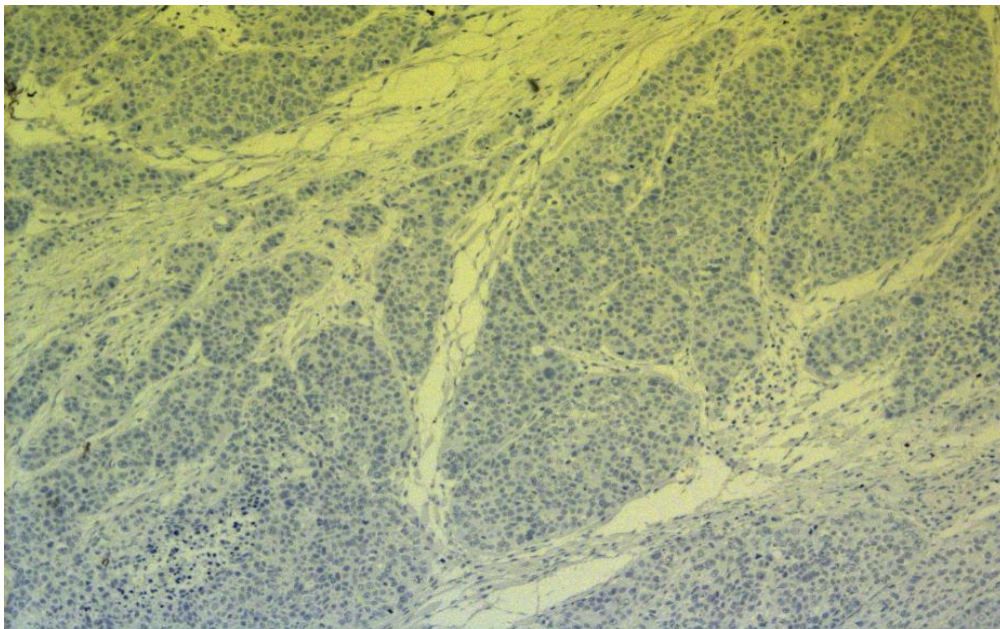
U tkivu karcinoma usne šupljine, izraženost BMP6 dokazana je metodom imunohistokemije u 109 (90,8%) bolesnika. Imunohistokemijskim indeksom bojanja uzorci su, s obzirom na izraženost BMP6, razvrstani u tri skupine: „negativan“ (11 uzoraka; 9,2%), „umjereno izražen“ (79 uzoraka; 65,8%), „snažno izražen“ (30 uzoraka; 25,0%), (**slika 7**).



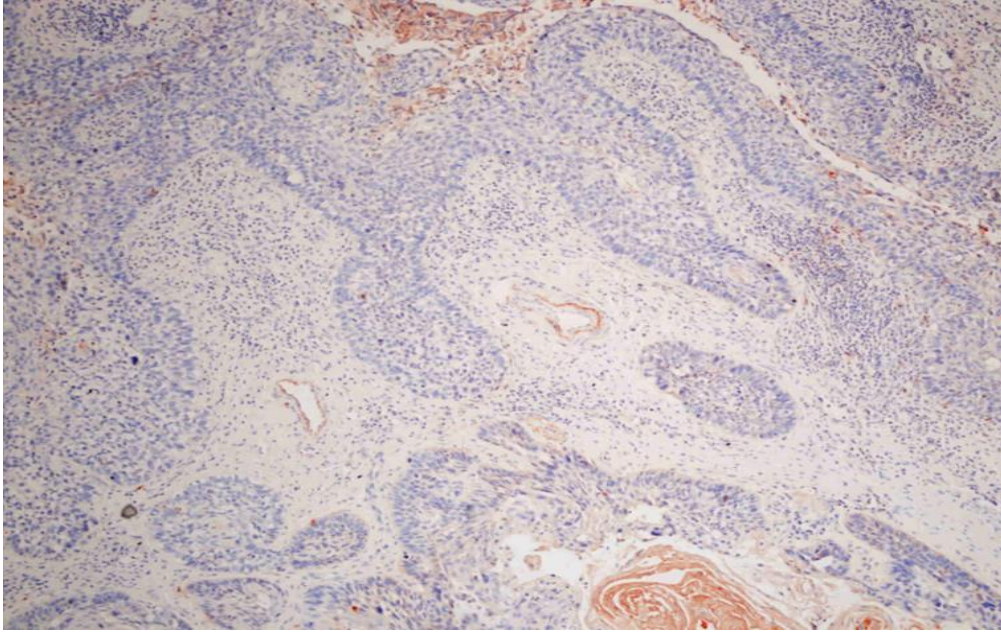
Slika 7. Udio tumora u odnosu na imunohistokemijski indeks bojanja.

Negativna kontrola, te negativna, slabo pozitivna i jako pozitivna reakcija u citoplazmama stanica tumora prikazane su na **slikama 8-11**.

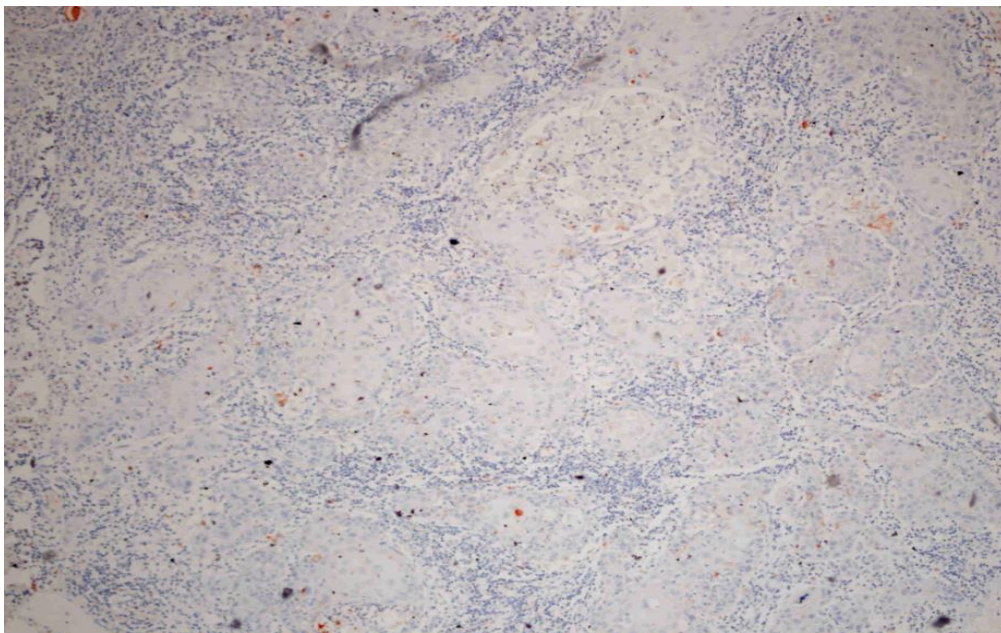
Slika 12 pokazuje nakupljanje ciljnog proteina u perifernim živcima i poprečnoprugastom mišiću.



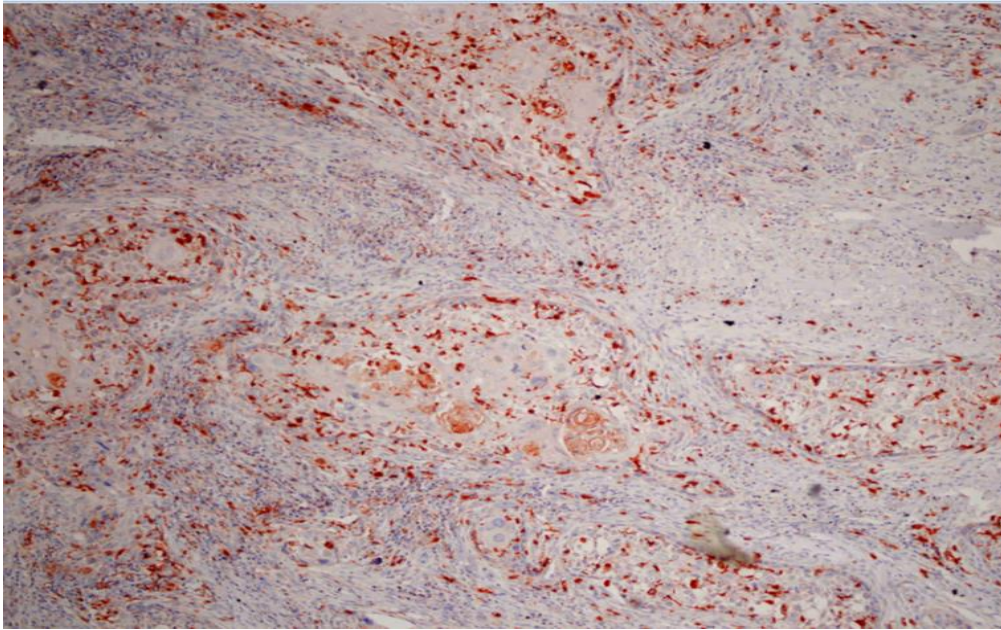
Slika 8. Negativna kontrola. Nakupine zloćudno promijenjenih stanica u planocelularnom karcinomu usne šupljine. Umjesto primarnog protutijela BMP6 korišten je 1x PBS (objektiv x 20, IMH).



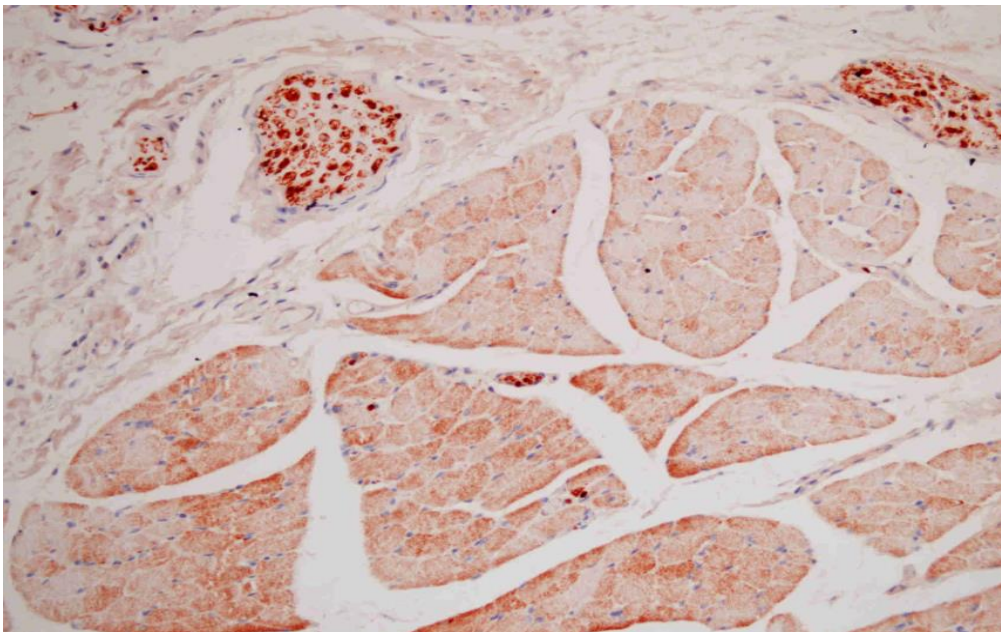
Slika 9. Negativno obojenje na BMP6 u karcinomu pločastih stanica usne šupljine (objektiv x 100, IMH). Crveno obojena područja predstavljaju areale roževine koja nakupljaju ciljni protein.



Slika 10. Slabo pozitivna reakcija BMP6, u karcinomu pločastih stanica usne šupljine (objektiv x 100, IMH).



Slika 11. Jako pozitivna reakcija u citoplazmama stanica tumora (objektiv x 100, IMH).



Slika 12. BMP6 u perifernim živcima i poprečnoprugastom mišiću (objektiv x 200, IMH).

U **tablicama 4a i 4b** prikazana je izraženost BMP6 u odnosu na sve pokazatelje istraživanja.

Tablica 4a. Imunohistokemijski indeks bojanja BMP6 u odnosu na pokazatelje istraživanja.

Čimbenici	Skupine	BMP6			P-vrijednost*
		negativna reakcija	umjereno izražen	snažno izražen	
Podatci o bolesniku					
dob	≤ 59 god.	6	39	18	0,402
	> 59 god.	5	40	12	
spol	muškarci	9	65	25	1,00
	žene	2	14	5	
Klinički podatci o bolesti					
lokalizacija tumora	sublingvalno	7	32	17	0,338
	jezik	2	30	6	
	retromolarno	1	9	5	
	gingiva mandibule	1	8	2	
najveći promjer tumora (K)	≤ 2,9 cm	7	38	15	1,00
	> 2,9 cm	4	41	15	

Tablica 4b. Imunohistokemijski indeks bojanja BMP6 u odnosu na pokazatelje istraživanja.

Pokazatelji	Skupine	BMP 6			P vrijednost
		negativna reakcija	umjereno izražen	snažno izražen	
najveći promjer tumora (P)	≤ 2,1 cm	6	36	21	0,035
	> 2,1 cm	5	43	9	
resekcijski rub	negativan	10	76	30	0,571
	pozitivan	1	3	0	
periost	negativan	5	19	11	0,209 ^a
	pozitivan	0	18	3	
kost	negativna	5	26	12	0,480 ^a
	pozitivna	0	11	2	
stupanj zrelosti	> 75%	4	39	11	0,381
	25-75%	5	38	16	
	< 25%	2	2	3	
perineuralna i perivaskularna invazija	negativna	8	39	15	0,837
	pozitivna	3	40	15	
regionalne metastaze	nema	8	45	18	1,00
	ima	3	34	12	
broj zahvaćenih čvorova	≤ 3	2	25	7	0,473 ^{b,c}
	>3	1	9	5	
najniže zahvaćeno područje	≤ 3	3	25	8	0,708 ^{c,d}
	>3	0	9	4	
čahura čvora	očuvana	1	11	4	1,00 ^c
	probijena	2	23	8	

^a Od ukupnog broja reseciranih mandibula (N=56)

^b Uspoređena su do tri zahvaćena limfna čvora sa najmanje četiri limfna čvora

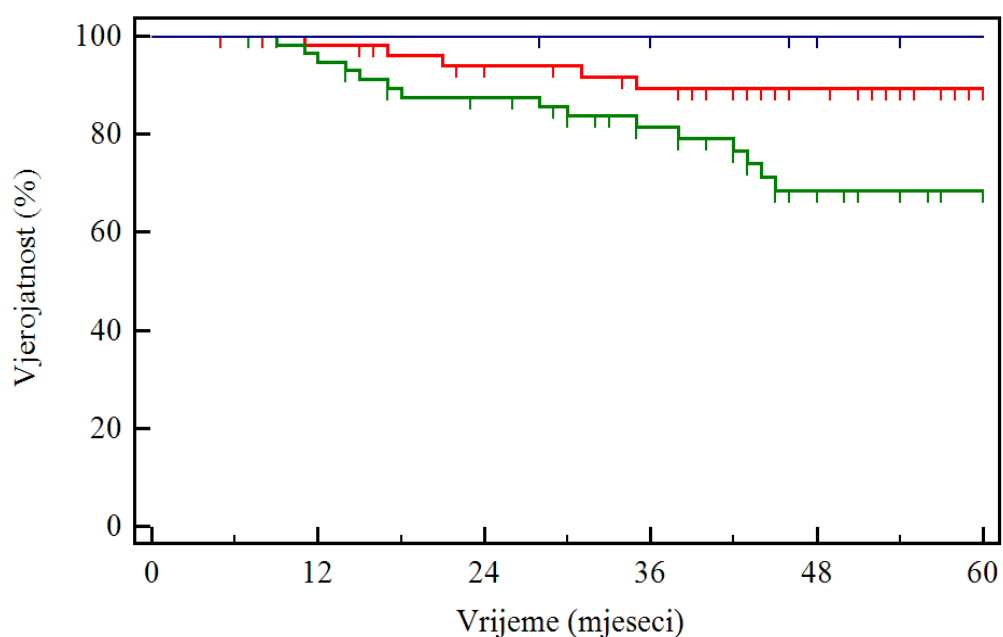
^c Od ukupnog broja pozitivnih disektata (N=49) koji su podijeljeni u dvije skupine: a) pozitivni limfni čvorovi u bolesnika podvrgnutih operaciji "commando" (N=19); b) pozitivni limfni čvorovi u bolesnika operiranih intraoralnom ekscizijom koji su razvili metastaze u periodu praćenja (N= 30)

^d Uspoređena zahvaćenost vrata do područja 3 s područjima 4 i/ili 5 (sa ili bez zahvaćenih viših područja u vratu)

Izraženost ciljnog proteina BMP6 negativno korelira s histološkim promjerom tumora. Niti jedan drugi analizirani parametar ne korelira sa stupnjem izraženosti proteina BMP6. Jednako tako, izraženost BMP6 nije povezana s pojavom recidiva bolesti (**tablica 5a**) niti preživljenjem (**slika 13**). Povezanost izraženosti BMP6 u odnosu na tip recidiva prikazana je u **tablici 5b**.

Tablica 5a. Povezanost imunohistokemijskog indeksa bojanja BMP6 s pojavom recidiva bolesti.

Pokazatelj	Skupine	Recidiv N (%)	
		Ne	Da
BMP6	negativna reakcija	7 (10,6)	4 (7,4)
	umjereno izražen	42 (63,6)	37 (68,5)
	snažno izražen	17 (25,8)	13 (24,1)
P vrijednost		0,789	



Slika 13. Krivulje preživljenja bolesnika prema izraženosti BMP6. Negativna (plavo), umjereno izražena (crveno) i snažno izražena (zeleno) reakcija. U crtane su granice 95%-tne pouzdanosti, a cenzurirani podatci su označeni okomitim crticama na krivulji preživljenja. Usporedbom skupina nije pronađena statistički značajna razlika ($P=0,793$).

Tablica 5b. Povezanost imunohistokemijskog indeksa bojanja BMP6 u odnosu na tip recidiva.

Pokazatelj	Skupine	Tip recidiva * N (%)	
		Lokalni recidiv	Regionalne metastaze
BMP6	negativna reakcija	1	3
	umjereno izražen	3	34
	snažno izražen	1	12

* u periodu praćenja niti jedan bolesnik nije razvio izolirane udaljene metastaze

U **tablicama 6a i 6b** prikazana je povezanost pokazatelja istraživanja prema opsegu kirurškog liječenja.

Tablica 6a. Povezanost pokazatelja istraživanja prema opsegu kirurškog liječenja.

Pokazatelji	Skupine	Vrsta operacije N (%)		P vrijednost
		"Commando"	Intraoralna ekscizija	
Podatci o bolesniku				
dob	≤ 59 god.	23 (56,1)	40 (50,6)	0,707
	> 59 god.	18 (43,9)	39 (49,4)	
spol	muškarci	36 (87,8)	63 (79,7)	0,396
	žene	5 (12,2)	16 (20,3)	
Klinički podatci o bolesti				
lokalizacija tumora	sublingvalno	11 (26,8)	45 (57,0)	< 0,001
	jezik	15 (36,6)	23 (29,1)	
	retromolarno	13 (31,7)	2 (2,5)	
	gingiva mandibule	2 (4,9)	9 (11,4)	
najveći promjer tumora	≤ 2,9 cm	8 (19,5)	52 (65,8)	< 0,001
	> 2,9 cm	33 (80,5)	27 (34,2)	
Histološki podatci – makroskopski i histologija tumora				
najveći promjer tumora	≤ 2,1 cm	14 (34,1)	49 (62,0)	0,007
	> 2,1 cm	27 (65,9)	30 (38,0)	
resekcijski rub	negativan	39 (95,1)	77 (97,5)	0,886
	pozitivan	2 (4,9)	2 (2,5)	
periošt	negativan	15 (55,6)	20 (69,0)	0,448 ^a
	pozitivan	12 (44,4)	9 (31,0)	
kost	negativna	18 (66,7)	25 (86,2)	0,157 ^a
	pozitivna	9 (33,3)	4 (13,8)	
stupanj zrelosti	> 75%	20 (48,8)	34 (43,0)	0,489
	25-75%	20 (48,8)	39 (49,4)	
	< 25%	1 (2,4)	6 (7,6)	
perineuralna i perivaskularna invazija	negativna	18 (43,9)	44 (55,7)	0,301
	pozitivna	23 (56,1)	35 (44,3)	

Tablica 6b. Povezanost pokazatelja istraživanja prema opsegu kirurškog liječenja.

Pokazatelji	Skupine	Vrsta operacije N (%)		P vrijednost
		"Commando"	Intraoralna ekscizija	
Histološki podatci – disektat vrata				
regionalne metastaze	nema	22 (53,7)	49 (62,0)	0,491
	ima	19 (46,3)	30 (38,0)	
broj zahvaćenih limfnih čvorova	≤ 3	16 (84,2)	18 (60,0)	0,141 ^b
	> 3	3 (15,8)	12 (40,0)	
najniža zahvaćena regija	≤ 3	15 (78,9)	21 (70,0)	0,720
	> 3	4 (21,1)	9 (30,0)	
čahura čvora	očuvana	11 (57,9)	5 (16,7)	0,007^c
	probijena	8 (42,1)	25 (83,3)	
Podatci o liječenju				
resekcija mandibule	ne	14 (34,1)	50 (63,3)	< 0,001
	marginalna	10 (24,4)	27 (34,2)	
	segmentalna	17 (41,5)	2 (2,5)	
radioterapija	ne	15 (36,6)	52 (65,8)	< 0,001
	nakon 1. op. ^d	21 (51,2)	0 (0,0)	
	nakon 2. op. ^e	5 (12,2)	27 (34,2)	
Podatci o praćenju				
lokalni recidiv	ne	37 (90,2)	78 (98,7)	0,084
	da	4 (9,8)	1 (1,3)	
regionalne metastaze	ne	22 (53,7)	49 (62,0)	0,491
	da	19 (46,3)	30 (38,0)	

^a Od ukupnog broja reseciranih mandibula (N=56)

^b Uspoređeno do tri zahvaćena čvora s četiri i više njih

^c Od ukupno pozitivnih disektata (N=49)

^d Intraoralna ekscizija ili operacija commando

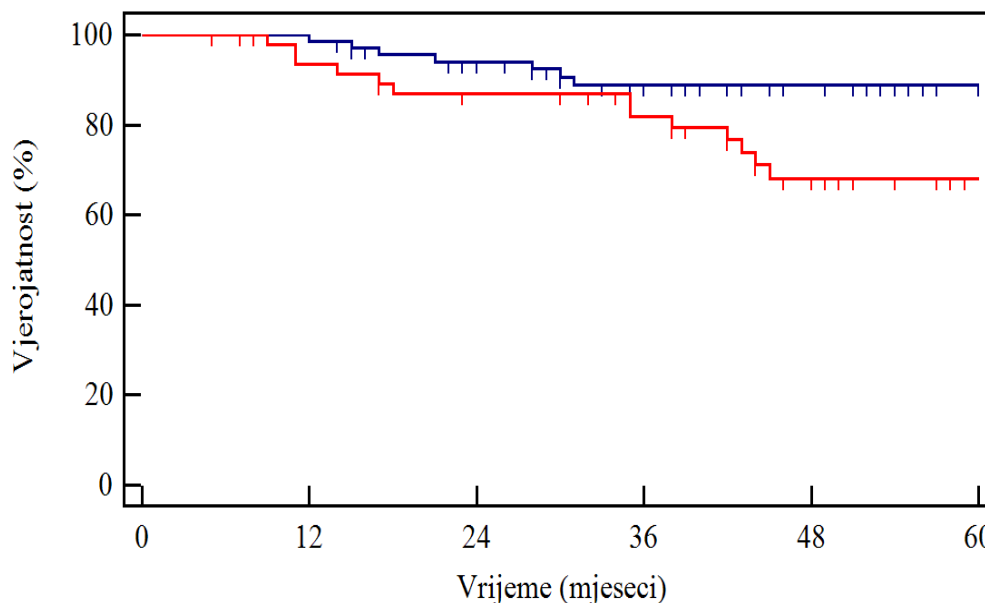
^e Redisekcija vrata zbog regionalnog recidiva nakon operacije commando ili kurativna disekcija vrata zbog razvoja metastaza u limfnim čvorovima u periodu praćenja nakon intraoralne ekscizije

U ovisnosti o podlokalizaciji tumora, operacijom "commando" podjednako često su operirani karcinomi jezika, sublingvalni i retromolarni tumori, dok su intraoralnom ekscizijom predominantno operirani sublingvalni tumori (P<0,001).

S obzirom na veličinu tumora, operacijom "commando" pretežno su operirani karcinomi kliničkog i histološkog promjera većeg od 2,9 cm odnosno 2,1 cm (80,5% i 65,9%), dok su intraoralnom ekscizijom češće operirani karcinomi manji od 2,9 cm odnosno

2,1 cm (65,8% i 62,0%) ($P < 0,001$ za oboje). U ovisnosti o vrsti operacije nije nađena statistički značajna razlika u zahvaćenosti resekcijskog ruba, periosta i kosti tumorom ($P = 0,886$, $P = 0,448$ i $P = 0,157$, redom). Iako nema statistički značajne razlike u broju zahvaćenih limfnih čvorova ($P = 0,141$) i najnižeg zahvaćenog područja ($P = 0,720$) između elektivnih i kurativnih disekcija, vidljivo je da su kod kurativnih disekcija češće zahvaćena četiri i više limfnih čvorova, u odnosu na elektivni disektat (40% u odnosu na 15,8%).

Od 41 bolesnika koji su podvrgnuti operaciji "commando", histološki negativne limfne čvorove imalo je 22 (53,7%) bolesnika dok ih je 19 (46,3%) imalo okultne metastaze vrata. Od 79 bolesnika koji su liječeni intraoralnom ekscizijom pojavu metastaza u limfnim čvorovima vrata tijekom praćenja razvilo je 30 (38,0%) bolesnika. U disektatima je prosječno pregledano 29 (u rasponu 10-75) limfnih čvorova, dok su u pozitivnim disektatima prosječno bile 3,4 regionalne metastaze (u rasponu 1-13). Preživljenje bolesnika sa i bez pojave regionalnih metastaza prikazano je na **slici 14**.



Slika 14. Krivulje preživljenja bolesnika bez pojave regionalnih metastaza (plavo, $N = 71$) i s pojavom regionalnih metastaza (crveno, $N = 49$) tijekom praćenja. Petogodišnje preživljenje bolesnika bez pojave metastaza iznosi $88,9 \pm 4,0\%$, a u bolesnika s pojavom metastaza $68,2 \pm 7,4\%$. Usporedbom skupina pronađena je statistički značajna razlika ($P = 0,025$). Cenzurirani podatci označeni su okomitim crticama.

Jednako tako, vidljivo je da su kod elektivnih disekcija češće zahvaćeni limfni čvorovi vrata do područja 3 (78,9 prema 70%), dok su područja 4 i/ili 5 češće zahvaćena kod kurativnih disekcija (30% prema 21,1 %). Čahura čvora znatno je češće probijena kod kurativnih naspram elektivnih disekcija vrata ($P=0,007$).

Segmentalna resekcija mandibule statistička je značajno češća kod operacije "commando" ($P<0,001$). Poslijeoperacijski, zračenje je češće primijenjivano nakon operacije "commando" (51,2% prema 0%) dok je 34,2% bolesnika operiranih intraoralnom ekscizijom podvrgnuto radioterapiji, svi nakon kurativne disekcije vrata zbog pojave metastaza u regionalnim limfnim čvorovima u periodu praćenja ($P<0,001$).

Nije bilo statistički značajne razlike u pojavi lokalnog recidiva i regionalnih metastaza između dvije vrste operacija ($P=0,084$, $P=0,491$, redom).

U **tablici 7** prikazana je povezanost pokazatelja istraživanja prema pojavi regionalnih metastaza.

Tablica 7. Povezanost pokazatelja istraživanja s pojavom regionalnih metastaza.

Pokazatelji	Skupine	Regionalne metastaze N (%)		P vrijednost
		Ne	Da	
Klinički podatci				
dob	≤ 59	35 (49,3)	28 (57,1)	0,397
	> 59	36 (50,7)	21 (42,9)	
spol	muškarci	58 (81,7)	41 (83,7)	0,778
	žene	13 (18,3)	8 (16,3)	
lokalizacija tumora	sublingvalno	35 (49,3)	21 (42,9)	0,231 ^a 0,520 ^a 0,231 ^a
	jezik	19 (26,8)	19 (38,8)	
	retromolarno	8 (11,3)	7 (14,3)	
	gingiva mandibule	9 (12,7)	2 (4,1)	
najveći promjer tumora (K)	≤ 2,9 cm	38 (53,5)	22 (44,9)	0,353
	> 2,9 cm	33 (46,5)	27 (55,1)	
Histološki podatci				
najveći promjer tumora (P)	≤ 2,1 cm	39 (54,9)	24 (49,0)	0,521
	> 2,1 cm	32 (45,1)	25 (51,0)	
dubina invazije	≤ 0,8 cm	42 (59,2)	22 (44,9)	0,124
	> 0,8 cm	29 (40,8)	27 (55,1)	
resekcijski rub	negativan	68 (95,8)	48 (98,0)	0,500
	pozitivan	3 (4,2)	1 (2,0)	
periost	negativan	20 (60,6)	15 (65,2)	0,725 ^b
	pozitivan	13 (39,4)	8 (34,8)	
kost	negativna	23 (69,7)	20 (87,0)	0,122 ^b
	pozitivna	10 (30,3)	3 (13,0)	
stupanj zrelosti	> 75%	37 (52,1)	17 (34,7)	0,061 ^a 0,549 ^a
	25-75%	30 (42,3)	29 (59,2)	
	< 25%	4 (5,6)	3 (6,1)	
perineuralna i perivaskularna invazija	negativna	38 (53,5)	24 (49,0)	0,625
	pozitivna	33 (46,5)	25 (51,0)	
Podatci o liječenju				
resekcija mandibule	ne	38 (53,5)	26 (53,0)	0,783 ^a 0,602 ^a
	marginalna	23 (32,4)	14 (28,6)	
	segmentalna	10 (14,1)	9 (18,4)	

^a Usporedba s prvom skupinom bolesnika

^b Od ukupnog broja reseciranih mandibula (N=56).

Omjer bolesnika mlađih i starijih od 59 godina kao i raspodjela po spolu podjednaki su u bolesnika sa i bez regionalnih metastaza, što upućuje da pojava regionalnih metastaza ne ovisi o dobi ($P=0,397$) i spolu bolesnika ($P=0,778$).

Neke kliničke karakteristike tumora, kao što su podlokalizacija tumora unutar usne šupljine i najveći promjer tumora podjednake su u bolesnika sa i bez regionalnih metastaza.

Histološki čimbenici kao što su najveći promjer tumora, dubina invazije, histološki status ruba resekcije, zahvaćenost periosta i kosti tumorom, stupanj zrelosti tumora te perineuralna i perivaskularna invazija nisu povezani s pojavom regionalnih metastaza. Resekcija mandibule nema utjecaj na pojavu regionalnih metastaza.

Podatci o pojedinačnom utjecaju pokazatelja iz istraživanja na ukupno preživljenje bolesnika prikazani su u **tablici 8a i 8b**. Podatci su prikazani vrijednostima prosječnog petogodišnjeg preživljenja bolesnika za svaki pokazatelj posebno.

Tablica 8a. Podatci o prosječnom petogodišnjem preživljenju prema skupinama pokazatelja u istraživanju.

Pokazatelji	Skupine	N	Ukupno preživljenje ^a	
			PP±SE(PP) %	P vrijednost
Podatci o bolesniku				
dob	≤ 59 god.	63	79,8 ± 5,9	0,710
	> 59 god.	57	79,5 ± 5,9	
spol	muškarci	99	81,7 ± 4,4	0,373
	žene	21	70,0 ± 11,8	
Klinički podatci o bolesti				
lokalizacija tumora	sublingvalno	56	76,2 ± 6,4	0,636
	jezik	38	80,9 ± 7,2	
	retromolarno	15	92,3 ± 7,4	
	gingiva mandibule	11	75,8 ± 15,6	
najveći promjer tumora (K)	≤ 2,9 cm	60	82,6 ± 5,8	0,455
	> 2,9 cm	60	77,1 ± 5,9	

Tablica 8b. Podatci o prosječnom petogodišnjem preživljenju prema skupinama pokazatelja u istraživanju.

Pokazatelji	Skupine	N	Ukupno preživljenje ^a	
			PP±SE(PP) %	P vrijednost
Histološki podatci – makroskopski i histologija tumora				
najveći promjer tumora (P)	≤ 2,1 cm	63	81,8 ± 5,3	0,570
	> 2,1 cm	57	76,9 ± 6,7	
resekcijski rub	negativan	116	82,0 ± 4,1	< 0,001
	pozitivan	4	0 ± 0	
dubina invazije	≤ 0,8 cm	64	82,3 ± 5,2	0,479
	> 0,8 cm	56	76,2 ± 6,9	
periost	negativan	35	79,0 ± 7,8	0,474 ^b
	pozitivan	21	63,3 ± 13,6	
kost	negativna	43	75,4 ± 7,7	0,789 ^b
	pozitivna	13	68,2 ± 15,8	
stupanj zrelosti	> 75%	54	89,4 ± 4,5	0,035
	25-75%	59	68,5 ± 7,0	
	< 25%	7	-	
perineuralna i perivaskularna invazija	negativna	62	85,0 ± 5,0	0,253
	pozitivna	58	73,7 ± 6,7	
Histološki podatci – imunohistokemija tumora				
BMP6	negativan	11	90,9 ± 8,7	0,793
	umjeren	79	78,9 ± 5,1	
	izražen	30	78,4 ± 8,8	
Histološki podatci – disektat vrata				
regionalne metastaze	nema	71	88,9 ± 4,0	0,025
	ima	49	68,2 ± 7,4	
broj zahvaćenih čvorova	≤ 3	34	77,9 ± 8,0	0,023 ^{c,d}
	> 3	15	46,6 ± 14,4	
najniže zahvaćeno područje	≤ 3	36	83,2 ± 7,0	< 0,001 ^{c,e}
	> 3	13	28,1 ± 13,7	
čahura čvora	očuvana	16	90,9 ± 8,7	0,036 ^c
	probijena	33	58,1 ± 9,5	

^a Statistički podatci o preživljenju prikazani su kao PP±SE(PP), proporcijom (%) bolesnika koji prežive petogodišnje praćenje s vrijednošću standardne pogreške proporcije, te razinom značajnosti P

^b Iskazano na N=56 (bolesnici koji su podvrgnuti resekciji mandibule)

^c Iskazano na N=49 (bolesnici s regionalnim metastazama).

^d Uspoređena zahvaćenost do tri limfna čvora s najmanje četiri limfna čvora

^e Uspoređena zahvaćenost vrata do područja 3 s područjima 4 i/ili 5

Iz podataka u **tablica 8a i 8b** vidljivo je da preživljenje bolesnika ne ovisi o dobi ($P=0,710$) i spolu ($P=0,373$), lokalizaciji tumora ($P=0,636$), niti o vrijednosti klinički određenog najvećeg promjera tumora ($P=0,455$). Jednako tako, preživljenje ne ovisi o histološkom promjeru tumora ($P=0,570$), dubini invazije ($0,479$), o zahvaćenosti periosta ($P=0,474$) i kosti tumorom ($P=0,789$), niti o perineuralnoj i perivaskularnoj invaziji ($P=0,253$). Statistički značajno kraće preživljenje imaju bolesnici s pozitivnim rubom nakon resekcije primarnog tumora ($P<0,001$) te bolesnici s umjereno/slabo diferenciranim karcinomima ($P=0,035$). Niže stope preživljenje potvrđene su u bolesnika s regionalnim metastazama ($P=0,025$), s više od tri pozitivna limfna čvora ($P=0,023$), pozitivnim područjima vrata 4 i/ili 5 ($P<0,001$) i u bolesnika s nalazom proboja čahure limfnog čvora ($P=0,036$).

U **tablici 9a i 9b** prikazani su rezultati Cox-multivarijatnog testa regresije. Tim je postupkom obrade podataka uspoređeno preživljenje bolesnika istodobno sa svih šest pokazatelja kojima je dokazana izravna univarijatna povezanost s preživljenjem (**tablica 8a i 8b**). Od pokazatelja koji su se pokazali statistički značajni i međusobno nezavisni su: resekcijski rub ($OR=17,16$; $P<0,001$), stupanj diferenciranosti ($OR=3,46$; $P=0,017$) i zahvaćenost područja vrata 4 i/ili 5 ($OR=6,13$; $P=0,002$). Krivulje preživljenja bolesnika prema pokazateljima iz **tablice 8a i 8b** su na **slikama 15-19**.

Tablica 9a. Cox-test regresije s pokazateljima iz tablica 8a i 8b koji su značajno povezani s ukupnim preživljenjem bolesnika.

Pokazatelji	Skupine	N	Ukupno preživljenje statistika ^a		
			$\beta \pm SE(\beta)$	P	OR (95% GP)
Histološki podatci – disektat vrata					
resekcijski rub	negativan	116	$2,84 \pm 0,68$	<0,001	17,16 (4,53 - 64,97)
	pozitivan	4			
stupanj zrelosti	> 75%	54	$1,24 \pm 0,52$	0,017 0,964	3,46 (1,26 - 9,52) ^b
	25-75%	59			
	< 25%	7			
regionalne metastaze	nema	71	$0,85 \pm 0,48$	0,076	2,33 (0,92 - 5,93)
	ima	49			

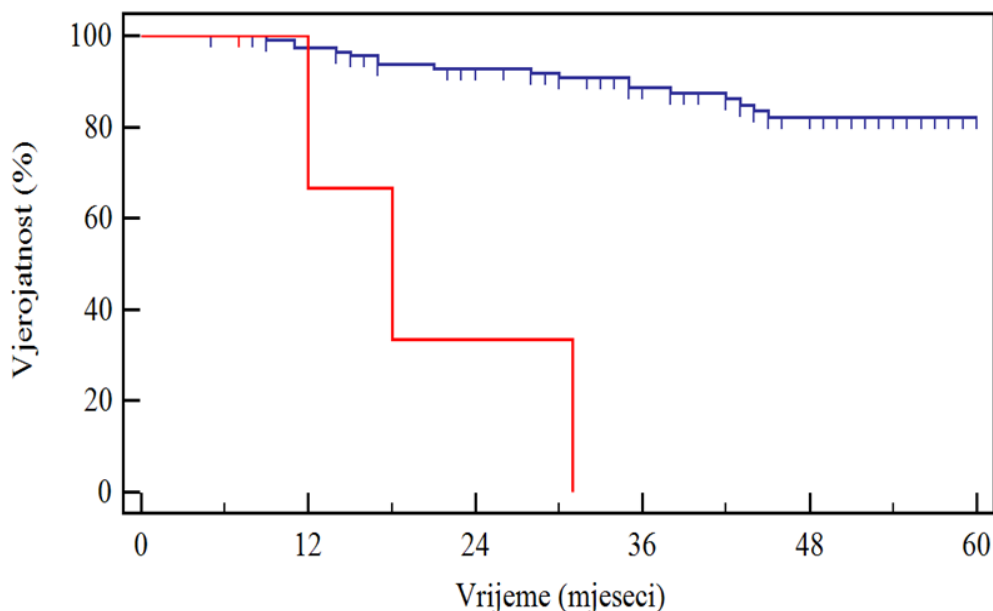
Tablica 9b. Cox-test regresije s pokazateljima iz tablica 8a i 8b koji su značajno povezani s ukupnim preživljenjem bolesnika.

Pokazatelji	Skupine	N	Ukupno preživljenje statistika ^{a,c}		
			$\beta \pm SE(\beta)$	P	OR (95% GP)
Histološki podatci – disektat vrata					
čahura čvora	očuvana	16	1,60 ± 1,07	0,133	4,97 (0,62 - 39,76)
	probijena	33			
broj zahvaćenih čvorova	≤ 3	34	0,86 ± 0,57	0,133	2,36 (0,77 - 7,21)
	> 3	15			
najniže zahvaćeno područje	≤ 3	36	1,81 ± 0,57	0,002	6,13 (2,0 - 18,79)
	> 3	13			

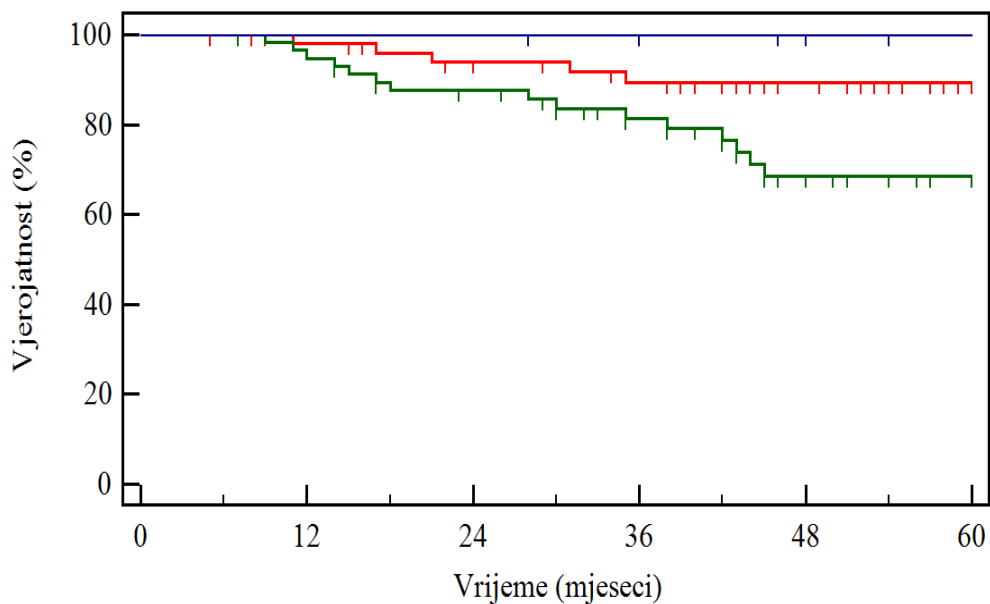
^a Statistički podatci prikazani su vrijednostima regresijskih koeficijenata β i njihovom standardnom pogreškom $SE(\beta)$, razinom značajnosti P, te vrijednostima omjera izgleda OR s granicama 95%-tne pouzdanosti (95% GP)

^b Nije izračunato zbog velike standardne pogreške

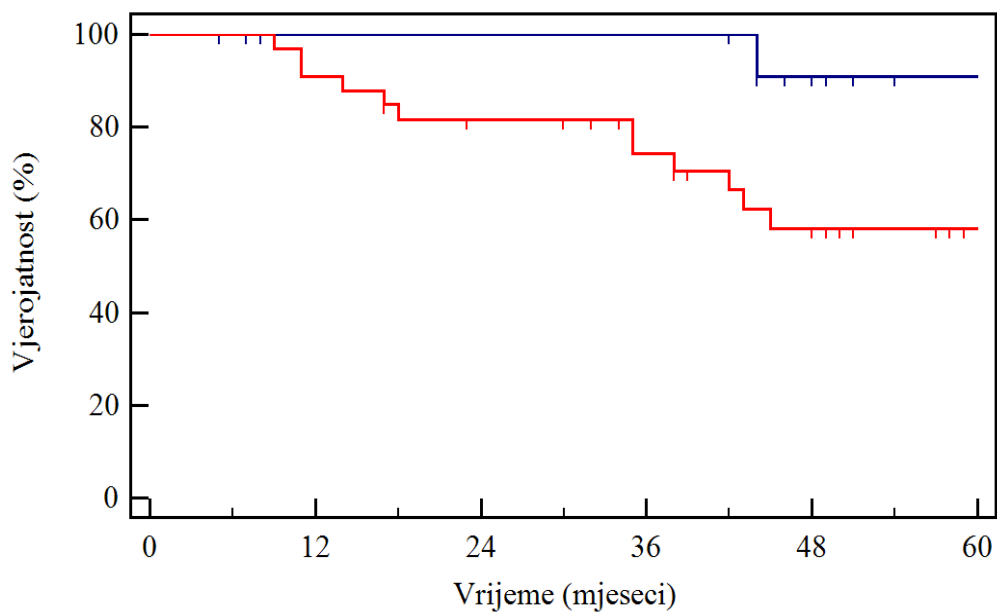
^cIskazano na 49 bolesnika s regionalnim metastazama



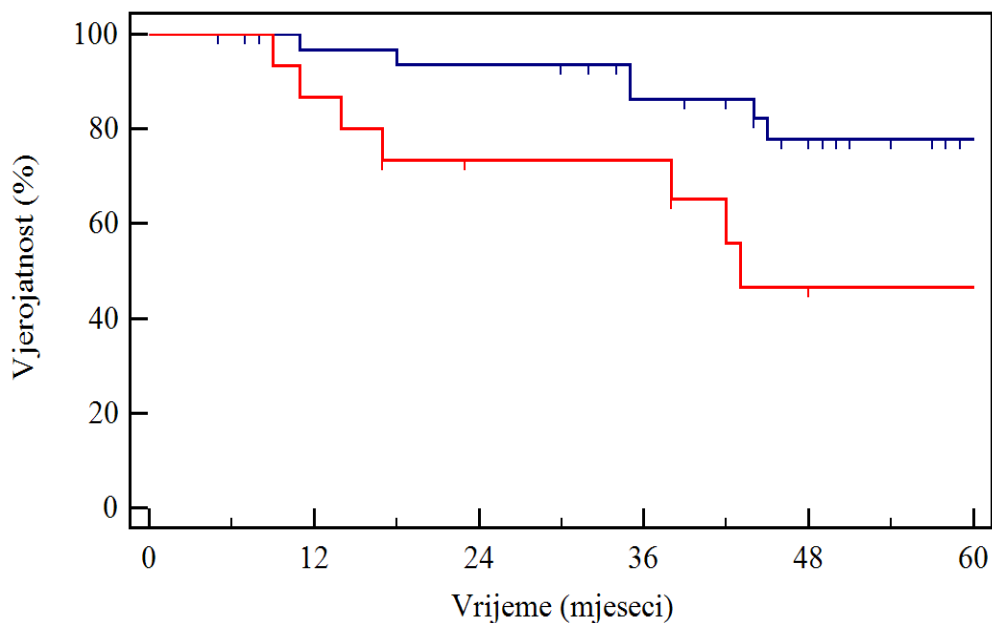
Slika 15. Krivulje preživljenja bolesnika prema statusu resekcijskog ruba: uredni rubovi (plavo) i rubovi zahvaćeni tumorom (crveno). Cenzurirani podatci označeni su okomitim crticama.



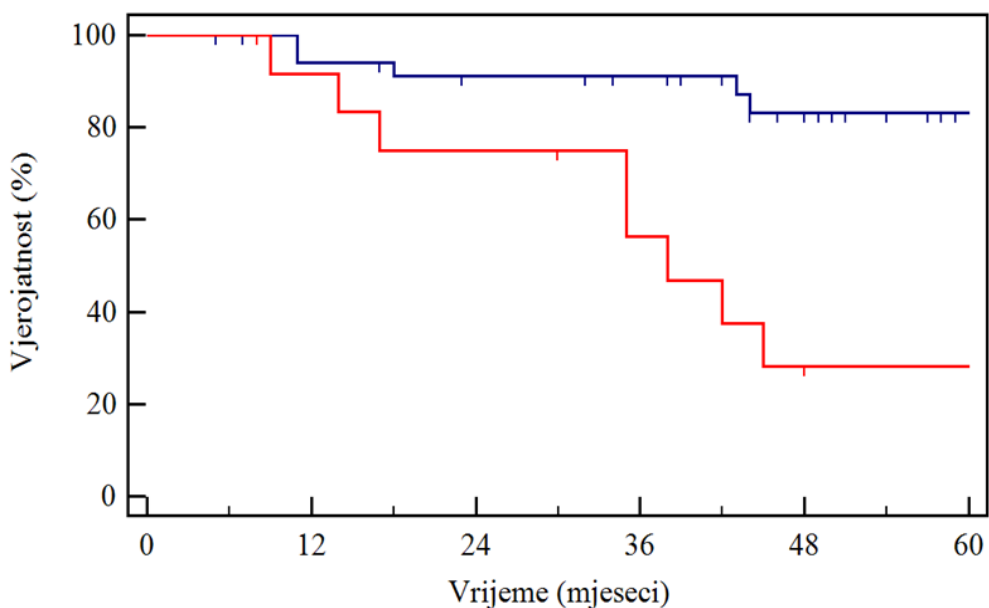
Slika 16. Krivulje preživljenja bolesnika prema stupnju zrelosti tumorskih stanica: dobro (plavo), umjereno (zeleno) i slabo (crveno) diferencirani tumori. Cenzurirani podatci označeni su okomitim crticama.



Slika 17. Krivulje preživljenja bolesnika prema statusu čahure limfnog čvora: čahura očuvana (plavo) i probijena (crveno). Cenzurirani podatci označeni su okomitim crticama.



Slika 18. Krivulje preživljenja bolesnika prema broju zahvaćenih limfnih čvorova: do 3 zahvaćena limfna čvora (plavo) i više od četiri zahvaćena limfna čvora (crveno). Cenzurirani podatci označeni su okomitim crticama.



Slika 19. Krivulje preživljenja bolesnika prema najnižem zahvaćenom području vrata: zahvaćenost vrata do područja 3 (plavo) i zahvaćenost područja 4 i/ili 5 (crveno). Cenzurirani podatci označeni su okomitim crticama.

6. RASPRAVA

Brojnim su istraživanjima analizirani različiti čimbenici koji bi mogli ukazati na metastatski potencijal karcinoma usne šupljine (podlokalizacija tumora unutar usne šupljine, veličina tumora, stupanj diferencijacije, dubina invazije, volumen tumora, način invazije, dezmozplazija, perineuralna i perivaskularna invazija, itd.) (140, 142, 144, 154, 155). Unatoč ovim istraživanjima, još uvijek ne postoji dovoljno pouzdana metoda ranog otkrivanja regionalne bolesti. Zbog toga, pitanje vezano uz praćenje i promatranje bolesnika bez klinički manifestnih metastaza u limfnim čvorovima u odnosu na elektivnu disekciju vrata ostaje i dalje otvoreno. Status limfnih čvorova najvažniji je prognostički čimbenik u karcinomu usne šupljine; prisutnost regionalnih metastaza smanjuje preživljenje bolesnika za približno 50% (150).

Ideja za ovo istraživanje temelji se na nedavno objavljenim rezultatima Kejner i sur., koji su pokazali povezanost jačeg stupnja izraženosti BMP6 i zahvaćenosti kosti u bolesnika s karcinomom usne šupljine (248). Slično, Raida i sur. su dokazali negativan utjecaj pojačane izraženost BMP6 u odnosu na preživljenje oboljelih od planocelularnog karcinoma jednjaka (249). S obzirom na to da je invazija kosti osobitost biološki agresivnijih tumora, pretpostavili smo da je pojačana izraženost BMP6 u karcinomu usne šupljine mogući prognostički čimbenik za pojavu regionalnih metastaza i lošiji ishod bolesti, odnosno - kraće preživljenje. U studiju smo uključili i analizu poznatih prognostičkih čimbenika (kliničkih i histoloških) kako bismo odredili statistički nezavisne prognostičke čimbenike, u odnosu na pojavu regionalnih metastaza te preživljenje bolesnika.

6.1. Povezanost BMP6 s kliničkim i histološkim čimbenicima, pojavom recidiva bolesti i preživljenjem bolesnika

BMP6 je bio prisutan u 90,8% tkiva karcinoma usne šupljine. Ovaj je postotak pozitivnih uzoraka u skladu s navodima iz literature (248, 249). Bolesnici s tumorima čiji je histološki promjer bio manji od 2,1 cm imali su statistički značajno ($p=0,035$) češće snažno izražen BMP6. Stupanj izraženost BMP6 nije bio povezan drugim kliničkim (dob, spol, podlokalizacija, najveći promjer tumora) ili histološkim čimbenicima (status resekcijskog ruba, zahvaćenost periosta/kosti tumorom, stupanj zrelosti tumora, perineuralna/perivaskularna invazija, prisutnost regionalnih metastaza, broj zahvaćenih limfnih čvorova, najniže zahvaćeno područje, proboj čahure limfnog čvora).

U jedinoj objavljenoj studiji kojom je analizirana prognostička vrijednost BMP6 u intraoralnom karcinomu, pokazano je da njegova pojačana izraženost korelira s invazijom u kost, neovisno o stadiju T (248). Naime, u tumorima T2-stadija koji invadiraju u kost, postoji pojačana izraženost BMP6 u odnosu na neinvadirajuće tumore višeg T-stadija. Na temelju navednog, autori su zaključili da je pojačana izraženost BMP6 pokazatelj sklonosti tumora da invadira u kost. S druge strane autori nisu dokazali povezanost između izraženost BMP6 i drugih analiziranih kliničkih i histoloških čimbenika (dob, rasa, perineuralna invazija, status resekcijskog ruba). Slični su rezultati dobiveni i ovom doktorskom radnjom. Zanimljivo je da su ranije navedeni autori (248) potvrdili da pojačana izraženost BMP6 korelira s povećanom izraženošću EGFR. Potonja molekula pojačano je ispoljena u 90% karcinoma glave i vrata. Njegovo ispoljavanje povezano je s lošom prognozom, smanjenim odgovorom na zračenje te visokim stopama recidiva nakon primjene primarne radioterapije (255).

Pretkliničkim je studijama, na linijama stanica podrijetlom od planocelularnog karcinoma, potvrđeno da inhibiranje signalnog puta EGFR doprinosi povećanju osjetljivosti stanica na zračenje (264-266). Dugogodišnja istraživanja ovog fenomena dovela su do sinteze cetuksimaba, kimeričnog monoklonskog protutijela IgG1, koje se na EGFR veže afinitetom koji je 5-10 puta snažniji od onoga za endogene ligande. Vežanje cetuksimaba inhibira funkciju receptora čime se dokida prijenos signala u unutrašnjost stanice (260). Ovi događaji povećavaju osjetljivost stanica tumora na zračenje. Primjena cetuksimaba u oboljelih koji se podvrgavaju zračenju značajno poboljšava ukupno preživljenje u usporedbi sa samostalnim liječenjem zračenjem (260).

Prema rezultatima ovog istraživanja, izraženost BMP6 nije povezana niti s pojavom recidiva, niti s preživljenjem. Ovi su rezultati sukladni navodu iz literature (248). U suprotnosti s ovim rezultatima su rezultati dobiveni praćenjem oboljelih od planocelularnog karcinoma jednjaka. U ovih je bolesnika pojačana izraženost BMP6 bila povezana sa slabije diferenciranim tumorima i kraćim preživljenjem (249). Međutim, u multivarijatnom su modelu samo vrijednosti pT i pN dokazane kao nezavisni čimbenici preživljenja.

6.2. Dob, spol i preživljenje oboljelih od karcinoma usne šupljine

Prema rezultatima ovog istraživanja, omjer muškaraca prema ženama je 4,7:1, a prosječna dob bolesnika 59 godina, što je sukladno navodima iz literature (5-8).

Prosječno petogodišnje preživljenje bolesnika uključenih u ovo istraživanje bilo je 79%, što je također u skladu s navodima literature. Ukupno preživljenje bolesnika s karcinomom usne šupljine za sve stadije bolesti u SAD-u iznosi 62% (2).

Prema rezultatima ovog istraživanja dob i spol nisu povezani s pojavom regionalnih metastaza, i nisu povezani s ukupnim preživljenjem bolesnika. Slično, većina istraživanja koja se bave početnim intraoralnim karcinomom nije identificirala utjecaj dobi i spola na pojavu metastaza i ukupno preživljenje (141, 142, 144).

6.3. Kliničko značenje podlokalizacije tumora

U ovom se istraživanju podlokalizacija tumora nije pokazala statistički značajnim parametrom za pojavu regionalnih metastaza. Nije se pokazala niti statistički značajnim parametrom za ukupno preživljenje bolesnika. S druge strane, iako statistički neznajno ($p=0,231$), 19 od 38 bolesnika (50%) s karcinomom jezika je razvilo regionalne metastaze. Ovo je veći udio, u usporedbi s drugim sijelima unutar usne šupljine (retromolarno područje: 46,7%; sublingvalno područje: 37,5%, gingiva mandibule: 18,2%) i u skladu je s navodima u literaturi (267, 268).

Karcinom oralnog dijela jezika se smatra podlokalizacijom koja je povezana s najlošijom prognozom zbog češće pojave regionalne metastatske bolesti u usporedbi s karcinomom drugih područja usne šupljine (269, 270). Mogući uzrok navednog su bogati limfni putevi oralnog dijela jezika koji su karakterizirani prelaskom središnje linije te izravnom drenažom u niža područja vrata zbog čega češće nastaju obostrane i "preskačuće" metastaze (137). Međutim, rezultati ove studije nisu potvrdili povezanost podlokalizacije i preživljenja u oboljelih od planocelularnog karcinoma usne šupljine. Iako rijetki, postoje i navodi u literaturi koji potvrđuju ovaj rezultat (31, 32).

6.4. Kliničko značenje dubine invazije i debljine tumora

Prema rezultatima ovog istraživanja, dubina invazije nije povezana niti s pojavom regionalnih metastaza, niti s preživljenjem. Iako bolesnici s dubinom invazije većom od 0,8 cm ($N=56$) imaju više stope regionalne metastatske bolesti (55,1% prema 44,9%) i kraće preživljenje (76,2% prema 82,3%), razlika nije statistički značajna. Slično drugih čimbenicima prognoze karcinoma usne šupljine, dubina invazije je u nekim studijama pokazana kao čimbenik (nepovoljne) prognoze bolesti (141, 142). Postoje i studije kojima ovaj parametar nije pokazan kao prognostički čimbenik (143, 144). Jasno je da porastom dubine invazije/debljine

tumora raste rizik od nastanka okultne bolesti vrata. Usprkos tome, nije jasno koja bi granična vrijednost dubine invazije razlučila visokorizične i niskorizične bolesnike u odnosu na pojavu regionalnih metastaza.

Većinom studija je pokazano da granična vrijednost povećanog metastatskog potencijala iznosi 4 mm (141, 142). Postoje, međutim, i radovi kojima je zabilježena pojava metastaza na vratu i u „plitkih“ tumora (1,2 mm - 3,9 mm) (143, 271). Na temelju ovog podatka, neki istraživači smatraju da je najvažniji događaj u metastaziranju karcinoma usne šupljine infiltracija mišićnog sloja (141, 272). Sukladno ovome, utjecaj egzofitičnog rasta tumora smatraju manje važnim u procjeni metastatskog potencijala karcinoma.

6.5. Kliničko značenje zahvaćenosti periosta i kosti tumorom

Prema rezultatima ovoga istraživanja, zahvaćenost periosta i kosti tumorom nije povezana s pojavom regionalnih metastaza, niti s ukupnim preživljenjem bolesnika. Prognostička vrijednost zahvaćenosti mandibule tumorom je i dalje upitna. Iako je klasificiranje tumora koji zahvaćaju kost u viši stadij „T“ opravdana zbog toga što se, u pravilu, radi o biološki agresivnijoj bolesti, čini se da zahvaćenost mekih česti u odnosu na prodor u kost, ima veći utjecaj na preživljenje (273). Ash i sur. su pokazali da prisutnost invazije u kost nije statistički značajan čimbenik u odnosu na recidiv bolesti i kraće preživljenje (274). S druge strane, postoje podatci koji ukazuju na invaziju koštane srži kao nezavisni čimbenik, povezan s nižim stopama preživljenja te višim stopama udaljenih metastaza, a bez utjecaja na lokoregionalni status (275). Također, način na koji tumor prodire u kost također utječe na preživljenje. Infiltrativan način invazije u donju čeljusti povezan je s kraćim preživljenjem u usporedbi s erozivnim načinom infiltracije u kost (276).

6.6. Klinički značaj statusa ruba resekcije

Prema rezultatima ovoga istraživanja, bolesnici s pozitivnim rubom resekcije imaju statistički značajno kraće preživljenje u odnosu na bolesnike s rubom bez tumora. S druge strane, dok status ruba resekcije ne utječe na pojavu regionalnih metastaza, sva četiri bolesnika s pozitivnim rubom resekcije (**Tablica 8b**) umrla su od osnovne bolesti. Uz stupanj zrelosti tumora, rub resekcije je jedini čimbenik vezan uz primarni tumor koji je identificiran kao statistički značajan i neovisan čimbenik preživljenja, u multivarijantnoj analizi (**Tablica 9a**, $p < 0,001$).

Neki autori navode značaj statusa ruba resekcije na duljinu preživljenja (277-279). S druge strane, postoje i suprotna stajališta: pozitivan rub resekcije i "bliski rub" (rub nezahvaćen tumorom, pod uvjetom da je udaljenost tumora od ruba $\leq 4\text{mm}$) ne utječu na pojavu recidiva i preživljenje (32, 280, 281).

6.7. Klinički značaj stupnja zrelosti tumora

Naši rezultati ne pokazuju povezanost stupnja zrelosti tumora s pojavom regionalnih metastaza. Iako su bolesnici s umjereno diferenciranim tumorima (N=59) imali češće regionalne metastaze u usporedbi s oboljelim od dobro diferenciranih karcinoma (N=54), razlika nije bila statistički značajna (P=0,061). Naprotiv, Kurokawa i sur. analizom podataka koje su dobili na 50 oboljelih od karcinoma jezika pokazali da umjereno zreli tumori češće metastaziraju te su, zbog toga, indikacija za elektivnu disekciju vrata (154).

Prema rezultatima ovog istraživanja, stupanj zrelosti tumora povezan je s ishodom bolesti na način da umjereno diferencirani tumori pokazuju statistički značajno kraće preživljenje (P=0,035) u odnosu na tumore niskog gradusa. Ovaj čimbenik zadržao je značajan utjecaj na preživljenje i u multivarijantnoj analizi (P=0,017). Korištenjem sličnog statističkog modela, Sparano i sur. potvrdili su povećan rizik nastanka okultnih metastaza u bolesnika sa slabo diferenciranim tumorima. Dodatni čimbenici rizika bili su: a) perineuralna invazija; b) povećana debljina tumora; c) infiltrativni tip invazije tumora; d) T2-stadij (155). Slično je pokazano i retrospektivnom studijom na 233 bolesnika, korištenjem Cox-regresijskog modela (32).

6.8. Klinički značaj perineuralne i perivaskularne invazije

Rezultatima ovog istraživanja ne mogu se povezati perineuralna i perivaskularna invazija s pojavom regionalnih metastaza i preživljenjem bolesnika. Naši su rezultati u suprotnosti s rezultatima brojnih studija kojima je pokazana statistički značajna povezanost perineuralne invazije s većom učestalošću regionalnih metastaza i kraćim preživljenjem, u bolesnika s karcinomom usne šupljine (164, 165). U nekim su studijama autori zabilježili duže preživljenje u bolesnika s perineuralnom invazijom, koji su bili podvrgnuti elektivnoj disekciji vrata (166, 167). S druge strane, postoji i studija kojom nije potvrđen negativni utjecaj perineuralne invazije na lokalnu kontrolu bolesti i preživljenje bolesnika (282).

6.9. Klinički značaj statusa limfnih čvorova vrata

Rezultati našeg istraživanja pokazuju da bolesnici s više od tri pozitivna limfna čvora u vratu, s pozitivnim područjima vrata 4 i/ili 5 te probojem čahure limfnog čvora imaju statistički značajno kraće preživljenje. Ovo je sukladno rezultatima iz literature. Za sada je jedino zahvaćenost područja 4 i/ili 5 pokazana kao nezavisni čimbenik za preživljenje, u multivarijantnom modelu. Ovo je pokazano i retrospektivnom studijom, na 513 bolesnika (283). Slični rezultati dobiveni su još jednom studijom, kojom je pokazano da zahvaćenost limfnih čvorova stražnjeg trokuta vrata ima loš prognostički značaj u odnosu na preživljenje (284). Xing i sur. su u retrospektivnoj studiji na 14499 bolesnika s planocelularnim karcinomom glave i vrata su pokazali da je razina zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova važan prognostički čimbenik preživljenja koji bi trebalo uvrstiti u postojeću klasifikaciju TNM (100).

6.9.1. Klinički značaj proboja čahure limfnog čvora

Naši rezultati pokazuju da ekstrakapsularni proboj dodatno skraćuje preživljenje (Uspoređeni su bolesnici u kojih je dokazan ekstrakapsularan proboj, s bolesnicima u kojih su limfni čvorovi bili negativni, odnosno, pozitivni - ali bez proboja kapsule). Ovaj je rezultat u skladu s navodima iz literature (152, 153, 285). Zbog negativnog utjecaja ekstrakapsularnog proboja na preživljenje, neki autori predlažu uvrštavanje ovog parametra u postojeću klasifikaciju pTNM (285, 286). Nadalje, neki autori identificirali su mjerljivu razinu proboja mimo čahure limfnog čvora od 1,7 mm koja je povezana s kraćim preživljenjem (286).

Ekstrakapsularno širenje nije rijedak događaj u početnom karcinomu usne šupljine, što dokazuje i naša studija. Prema rezultatima ove disertacije, proboj čahure imalo je čak 42,1% (8 od 19) bolesnika podvrgnutih elektivnom zahvatu. Jednako tako, Alvi i sur. pokazali su da je u bolesnika bez klinički manifestnih metastaza u limfnim čvorovima vrata ekstrakapsularni proboj prisutan u gotovo polovici bolesnika, te da više od dvije trećine ovih bolesnika razvija recidiv bolesti (287). Visoku učestalost proboja pokazali su i drugi autori. Ovo ukazuje na fenomen ekstrakapsularnog širenja u ranoj fazi metastaziranja karcinoma gornjeg dijela probavno-dišnog sustava (288).

6.9.2. Odstranjenje limfnih čvorova vrata

Prema rezultatima ovog istraživanja vidljivo je da se u odstranjenom tkivu kurativnim disekcijama, za razliku od elektivnih, češće odstranjuju najmanje četiri limfna čvora u kojima

postoje metastaze, te su češće pozitivna područja 4 i/ili 5. U odstranjenom je tkivu također češće vidljiv proboj čahure limfnog čvora, u odnosu na tkivo odstranjeno elektivnim zahvatom. Ovo je sukladno navodu iz literature (53). S obzirom na to da su sve navedene osobitosti odstranjenog tkiva vrata povezane s kraćim preživljenjem, ovo je snažan argument za istovremeno izvođenje profilaktičke limfadenektomije i resekcije primarnog tumora.

7. ZAKLJUČAK

1. Imunohistokemijskim indeksom bojanja određena izraženost proteina BMP6 u oboljelih od karcinoma usne šupljine nije povezana s recidivom bolesti, i nije povezana s preživljenjem bolesnika.
2. Izraženosti proteina BMP6 u tkivu karcinoma usne šupljine nije povezana s biološkim ponašanjem tumora, pa stoga njegovo rutinsko određivanje, u ovim tumorima, nije opravdano.
3. Jedina karakteristika tumora s kojom ispoljenost BMP6, određena imunohistokemijskim indeksom bojanja, negativno korelira jest histološki promjer tumora do 2,1 cm. Naprotiv, izraženost BMP6 ne korelira s drugim ispitivanim kliničkim i histološkim prognostičkim čimbenicima.
4. Dob i spol bolesnika, podlokalizacija primarnog tumora i klinički najveći promjer tumora ne utječu na pojavu regionalnih metastaza (univarijatna analiza). Histološki najveći promjer tumora, dubina invazije, status ruba resekcije, zahvaćenost periosta i kosti tumorom, stupanj zrelosti tumora, perineuralna i perivaskularna invazija ne utječu na pojavu regionalnih metastaza (univarijatna analiza).
5. Status limfnih čvorova vrata jedan je od najvažnijih prognostičkih čimbenika u oboljelih od karcinoma usne šupljine. Petogodišnje preživljenje bolesnika s histološki potvrđenim metastazama u limfnim čvorovima vrata 20,7% je manje u odnosu na bolesnike bez histološki potvrđenih metastaza u limfnim čvorovima vrata.
6. Pozitivan rub resekcije, stupanj zrelosti tumora i prisutnost regionalnih metastaza povezani su s preživljenjem (univarijatna analiza). Statistički značajno kraće žive bolesnici u kojih je došlo do proboja čahure limfnog čvora i u kojih postoje najmanje četiri pozitivna limfna čvora te pozitivna područja vrata 4 i/ili 5 (univarijatna analiza).
7. Na kraće preživljenje utječu: umjerena zrelost tumora, pozitivan rub resekcije te zahvaćenost područja 4 i 5 (multivarijatna analiza).

8. SAŽETAK

Uvod: Koštani morfogogenetski proteini (BMP, od eng. *bone morphogenetic proteins*) su čimbenici rasta i diferencijacije koji su prvotno izolirani iz kosti, kao molekule koje potiču ektopično stvaranje kosti i hrskavice *in vivo*. Iako je BMP6 pojačano izražen u različitim zloćudnim tumorima, nije poznata prognostička vrijednost njegove izraženosti u planocelularnom karcinomu usne šupljine. Ovim su istraživanjem metode imunohistokemije i semikvantitativne analize upotrijebljene za određivanje izraženost BMP6 u planocelularnom karcinomu usne šupljine. Dobiveni rezultati su korelirani s kliničkim i histološkim prognostičkim parametrima, pojavom recidiva bolesti i preživljenjem bolesnika.

Ispitanici i metode: Istraživanje je uključilo 120 bolesnika s karcinomom usne šupljine kliničkog stadija T1-T3N0 koji su primarno kirurški liječeni u razdoblju od 1. siječnja 2003. do 31. prosinca 2008. godine.

Rezultati: Ispitivana skupina brojila je 99 (82,5%) muškaraca i 21 (17,5%) ženu, prosječne dobi 59 godina. Prosječno petogodišnje preživljenje bilo je 79,4%. Tijekom praćenja je od osnovne bolesti umrlo 20 bolesnika, a 100 ih je cenzurirano. BMP6 je bio izražen u 109 (90,8%) tumora. Bolesnici s tumorima histološkog promjera do 2,1 cm imali su statistički značajno češće prisutan snažan izražaj BMP6. Stupanj izraženost proteina BMP6 nije bio povezan s drugim kliničkim ili histološkim čimbenicima. Jednako tako, izraženost BMP6 nije povezana s pojavom recidiva bolesti, i nije povezana s duljinom preživljenja.

Zaključci: S obzirom na to da jačina izraženosti BMP6 ne ovisi o biološkom ponašanju tumora, rutinsko određivanje njegove izraženosti u karcinomu usne šupljine, metodom imunohistokemije, nije opravdano. Među pokazateljima kojima je dokazana multivarijatna povezanost s preživljenjem, statistički značajne i međusobno nezavisne značajke su umjerna zrelost tumora, pozitivan rub resekcije te zahvaćenost područja vrata 4 i/ili 5.

9. SUMMARY

Title: Prognostic significance of bone morphogenetic protein 6 (BMP6) expression in oral squamous cell carcinoma

Petar Suton

Year 2016

Introduction: Bone morphogenetic proteins, BMPs, are growth and differentiation factors, originally isolated as molecules which *in vivo* stimulate ectopic bone and cartilage formation. Overexpression of BMP6 has been shown in various malignant tumors. However, the prognostic significance of its expression in oral squamous cell carcinoma (OSCC) is still unknown. Immunohistochemistry and semiquantitative analyses were performed in order to determine the level of BMP6 in OSCC, thus correlating it with clinical and histological prognostic parameters, disease recurrence and survival.

Patients and methods: The study included 120 patients with clinically T1-3N0 OSCC, who were treated primary surgically, between January 1, 2003 and December 31, 2008.

Results: There were 99 (82,5%) males and 21 (17,5%) females, with an average age of 59 years. Five-year disease-specific survival rate for the whole cohort was 79,4%. Twenty patients had died during the follow-up, while 100 patients were censored. Patients with tumors smaller than 2,1 cm determined histologically showed higher incidence of strong BMP6 expression. No statistically significant correlation was detected between the level of BMP6 expression and other clinico-pathological factors. Similarly, the expression of BMP6 was neither associated with disease recurrence nor was it associated with patient's survival.

Conclusions: Accordingly, routine analysis of BMP6 expression for predicting the biological behaviour of OSCC is not justified. The level of BMP6 expression cannot be considered as a prognostic factor in OSCC. In multivariate model, positive surgical margin, moderate tumor cell differentiation and metastatic cervical lymph nodes located at levels 4 and/or 5 were independent predictors of survival.

10. LITERATURA

1. Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin* 2002;52:195-215.
2. Siegel R, Naishadham D, Jemal, A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012;62:10-29.
3. Rastogi T, Devesa S, Mangtani P, i sur. Cancer incidence rates among South Asians in four geographic regions: India, Singapore, UK and US. *Int J Epidemiol* 2008;37:147-60.
4. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 2014;64:9-29.
5. Kademani D. Oral cancer. *Mayo Clin Proc* 2007;82:878-87.
6. Johnson N. Tobacco use and oral cancer: a global perspective. *J Dent Educ* 2001;65:328-39.
7. Lewin F, Norell SE, Johansson H, i sur. Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck: a population-based case-referent study in Sweden. *Cancer* 1998;82:1367-75.
8. Reibel J. Tobacco and oral diseases: update on the evidence, with recommendations. *Med Princ Pract* 2003;12Suppl 1:22-32.
9. Ćorić T, Miler A. Izvješće o umrlim osobama u Hrvatskoj u 2012. godini. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2013.
10. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, i sur. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 1988;48:3282-7.
11. Franceschi S, Talamini R, Barra S, i sur. Smoking and drinking in relation to cancers of the oral cavity, pharynx, larynx, and esophagus in northern Italy. *Cancer Res* 1990;50:6502-7.
12. Day GL, Blot WJ. Second primary tumors in patients with oral cancer. *Cancer* 1992;70:14-9.
13. Day GL, Blot WJ, Shore RE, i sur. Second cancers following oral and pharyngeal cancers: role of tobacco and alcohol. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:131-7.
14. Prime SS, Thakker NS, Pring M, Guest PG, Paterson IC. A review of inherited cancer syndromes and their relevance to oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2001;37:1-16.
15. Reichart PA, Philipsen HP. Oral erythroplakia - a review. *Oral Oncol* 2005;41:551-61.
16. Kannan S, Balaram P, Pillai MR, i sur. Ultrastructural variations and assessment of malignant transformation risk in oral leukoplakia. *Pathol Res Pract* 1993;189:1169-80.

17. Reibel J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003;14:47-62.
18. 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.
19. 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.
20. Applebaum KM, Furniss CS, Zeka A, i sur. Lack of association of alcohol and tobacco with HPV16-associated head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst* 2007;99:1801-10.
21. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, i sur. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2007;356:1944-56.
22. Schlecht NF, Burk RD, Adrien L, i sur. Gene expression profiles in HPV-infected head and neck cancer. *J Pathol* 2007;213:283-93.
23. Sturgis EM, Cinciripini PM. Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers? *Cancer* 2007;110:1429-35.
24. Adelstein DJ, Ridge JA, Gillison ML, i sur. Head and neck squamous cell cancer and the human papillomavirus: summary of a National Cancer Institute State of the Science Meeting, November 9-10, 2008, Washington, D.C. *Head Neck* 2009;31:1393-422.
25. Myers E. *Cancer of the head and neck*. 4 izd. Philadelphia: WB Saunders; 2003.
26. Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, Gillison ML. Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J Clin Oncol* 2008;26:612-19.
27. Patel SC, Carpenter WR, Tyree S, i sur. Increasing incidence of oral tongue squamous cell carcinoma in young white women, age 18 to 44 years. *J Clin Oncol* 2011;29:1488-94.
28. 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.
29. Saba NF, Goodman M, Ward K, i sur. Gender and ethnic disparities in incidence and survival of squamous cell carcinoma of the oral tongue, base of tongue, and tonsils: a surveillance, epidemiology and end results program-based analysis. *Oncology* 2011;81:12-20.

30. Boyle JO, Strong EW. Oral Cavity Cancer. U: Shah JP, ur. American Cancer Society Atlas of Clinical Oncology: Cancer of the Head and Neck. Hamilton, London: BC Decker Inc.; 2001, str. 100-26.
31. Bell RB, Kademani D, Homer L, Dierks EJ, Potter BE. Tongue cancer: Is there a difference in survival compared with other subsites in the oral cavity? *J Oral Maxillofac Surg* 2007;65:229-36.
32. Kademani D, Bell RB, Bagheri S, i sur. Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: the influence of histologic grade. *J Oral Maxillofac Surg* 2005;63:1599-605.
33. Manon RR, Myers JN, Khuntia D, Harari PM. Oral Cavity Cancer. U: Halperin EC, Perez CA, Brady LW, ur. Principles and Practice of Radiation Oncology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2008, str. 891-912.
34. Arya S, Rane P, Deshmukh A. Oral cavity squamous cell carcinoma: role of pretreatment imaging and its influence on management. *Clin Radiol* 2014;69:916-30.
35. Sobin LH, Wittekind Ch, ur. TNM classification of malignant tumors. 6. izd. New York: Wiley-Liss, 2002.
36. Chinn SB, Myers JN. Oral cavity carcinoma: current management, controversies, and future directions. *J Clin Oncol* 2015;33:3269-76.
37. Crile G. On the surgical treatment of cancer of the head and neck with a summary of one hundred and twenty-one operations performed upon one hundred and five patients. *Trans South Surg Gynecol Assoc* 1905;18:108-27.
38. Crile G. Excision of cancer of the head and neck with special reference to the plan of dissection based on one hundred and thirty-two operations. *JAMA* 1906;47:1780-6.
39. Hayes M. The surgery of head and neck tumors. 1 izd. New York: Paul B. Hoeber, Inc. 1957.
40. Chicarilli ZN, Ariyan S. Cancer of the oral cavity. Surgical management. U: Ariyan S, ur. Cancer of the head and neck. St. Louis: C.V. Mosby; 1987, str. 209-22.
41. O'Brien CJ, Traynor SJ, McNeil E, McMahon JD, Chaplin JM. The use of clinical criteria alone in the management of the clinically negative neck among patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2000;126:360-5.

42. Yuen AP, Ho CM, Chow TL, i sur. Prospective randomized study of selective neck dissection versus observation for N0 neck of early tongue carcinoma. *Head Neck* 2009;31:765-72.
43. Huang SF, Kang CJ, Lin CY, i sur. Neck treatment of patients with early stage oral tongue cancer: comparison between observation, supraomohyoid dissection, and extended dissection. *Cancer* 2008;112:1066-75.
44. Capote A, Escorial V, Muñoz-Guerra MF, Rodríguez-Campo FJ, Gamallo C, Naval L. Elective neck dissection in early-stage oral squamous cell carcinoma-does it influence recurrence and survival? *Head Neck* 2007;29:3-11.
45. D'Cruz AK, Vaish R, Kapre N, i sur. Elective versus therapeutic neck dissection in node-negative oral cancer. *N Engl J Med* 2015;373:521-9.
46. Ren ZH, Xu JL, Li B, Fan TF, Ji T, Zhang CP. Elective versus therapeutic neck dissection in node-negative oral cancer: Evidence from five randomized controlled trials. *Oral Oncol* 2015;51:976-81.
47. Spiro RH, Strong EW, Shah JP. Classification of neck dissection: variations on a new theme. *Am J Surg* 1994;168:415-8.
48. Spiro RH, Morgan GJ, Strong EW, Shah JP. Supraomohyoid neck dissection. *Am J Surg* 1996;172:650-3.
49. Kraus DH, Rosenberg DB, Davidson BJ, i sur. Supraspinal accessory lymph node metastases in supraomohyoid neck dissection. *Am J Surg* 1996;172:646-9.
50. DeSanto LW, Holt JJ, Beahrs OH, O'Fallon WM. Neck dissection: is it worthwhile? *Laryngoscope* 1982;92:502-9.
51. Spiro RH, Strong EW. Epidermoid carcinoma of the oral cavity and oropharynx: elective vs. therapeutic radical neck dissection as treatment. *Arch Surg* 1973;107:382-4.
52. Yii NW, Patel SG, Rhys-Evans PH, Breach NM. Management of the N0 neck in early cancer of the oral tongue. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 1999;24:75-9.
53. Flach GB, Tenhagen M, de Bree R, i sur. Outcome of patients with early stage oral cancer managed by an observation strategy towards the N0 neck using ultrasound guided fine needle aspiration cytology: No survival difference as compared to elective neck dissection. *Oral Oncol* 2013;49:157-64.

54. Fu KK, Ray JW, Chan EK, Phillips TL. External and interstitial radiation therapy of carcinoma of the oral tongue. A review of 32 years' experience. *AJR Am J Roentgenol* 1976;126:107-15.
55. Shah JP, Lydiatt W. Treatment of cancer of the head and neck. *CA Cancer J Clin* 1995;45:352-68.
56. Mendenhall WM, Foote LR, Sandow PR, Fernandes RP. Oral cavity cancer. U: Gunderson LL, Tepper JE, ur. *Clinical radiation oncology*. 3 izd. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2012 , str. 553-83.
57. Bernier J, Cooper JS, Pajak TF, i sur. Defining risk levels in locally advanced head and neck cancers: a comparative analysis of concurrent postoperative radiation plus chemotherapy trials of the EORTC (#22931) and RTOG (# 9501). *Head Neck* 2005;27:843-50.
58. Lavaf A, Genden EM, Cesaretti JA, Packer S, Kao J. Adjuvant radiotherapy improves overall survival for patients with lymph node-positive head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 2008;112:535-43.
59. Peters LJ, Goepfert H, Ang KK, i sur. Evaluation of the dose for postoperative radiation therapy of head and neck cancer: first report of a prospective randomized trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993;26:3-11.
60. Leborgue. Elective neck irradiation in the treatment of cancer of the oral tongue. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1987;13:1149-53.
61. Ito Y, Fuwa N, Kikuchi Y, Yokoi N, Hamajima N, Morita K. Elective neck irradiation on ipsilateral side in patients with early tongue cancer for high-risk group with late cervical lymph node metastasis. *Nagoya J Med Sci* 2006;68:53-62.
62. Fu KK, Pajak TF, Trotti A, i sur. A Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) phase III randomized study to compare hyperfractionation and two variants of accelerated fractionation to standard fractionation radiotherapy for head and neck squamous cell carcinomas: first report of RTOG 9003. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;48:7-16.
63. Fletcher GH. *Textbook of Radiotherapy*. 3 izd. Philadelphia: Lea & Febiger; 1980, str. 194-219.
64. Northrop M, Fletcher GH, Jesse RH, Lindberg RD. Evolution of neck disease in patients with primary squamous cell carcinoma of the oral tongue, floor of mouth, and palatine arch, and clinically positive neck nodes neither fixed nor bilateral. *Cancer* 1972;29:23-30.

65. Barkley HT, Fletcher GH. The significance of residual disease after external irradiation of squamous-cell carcinoma of the oropharynx. *Radiology* 1977;124:493-5.
66. Arcangeli G, Friedman M, Paoluzi R. A quantitative study of late radiation effect on normal skin and subcutaneous tissues in human beings. *Br J Radiol* 1974;47:44-50.
67. Andrews JR. Dose-time relationships in cancer radiotherapy. A clinical radiobiology study of extremes of dose and time. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 1965;93:56-74.
68. ICRU Report 62. Prescribing, Recording and Reporting Photon Beam Therapy (Supplement to ICRU Report 50). *Journal of the ICRU* 1999.
69. ICRU Report 83: Prescribing, Recording, and Reporting Intensity Modulated Photon Beam Therapy (IMRT). *Journal of the ICRU* 2010;10.
70. Garden AS, Dong L, Morrison WH, et al. Patterns of disease recurrence following treatment of oropharyngeal cancer with intensity modulated radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2013;85:941-47.
71. Yamazaki H, Nishiyama K, Tanaka E, et al. Radiotherapy for early glottic carcinoma (T1N0M0): results of prospective randomized study of radiation fraction size and overall treatment time. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;64:77-82.
72. Yu E, Shenouda G, Beaudet MP, Black MJ. Impact of radiation therapy fraction size on local control of early glottic carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997;37:587-91.
73. Ang KK, Harris J, Wheeler R, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2010;363:24-35.
74. Budach W, Hehr T, Budach V, et al. A meta-analysis of hyperfractionated and accelerated radiotherapy and combined chemotherapy and radiotherapy regimens in unresected locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *BMC Cancer* 2006;6:28.
75. Bensadoun R-J, Benezery K, Dassonville O, et al. French multicenter phase III randomized study testing concurrent twice-a-day radiotherapy and cisplatin/5-fluorouracil chemotherapy (BiRCF) in unresectable pharyngeal carcinoma: Results at 2 years (FNCLCC-GORTEC). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;64:983-94.
76. Brizel DM, Albers ME, Fisher SR, et al. Hyperfractionated irradiation with or without concurrent chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med* 1998;338:1798-804.

77. Jeremic B, Shibamoto Y, Milicic B, i sur. Hyperfractionated radiation therapy with or without concurrent low-dose daily cisplatin in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: a prospective randomized trial. *J Clin Oncol* 2000;18:1458-64.
78. Denis F, Garaud P, Bardet E, i sur. Final results of the 94-01 French Head and Neck Oncology and Radiotherapy Group randomized trial comparing radiotherapy alone with concomitant radiochemotherapy in advanced-stage oropharynx carcinoma. *J Clin Oncol* 2004;22:69-76.
79. Denis F, Garaud P, Bardet E, i sur. Late toxicity results of the GORTEC 94-01 randomized trial comparing radiotherapy with concomitant radiochemotherapy for advanced-stage oropharynx carcinoma: comparison of LENT/SOMA, RTOG/EORTC, and NCI-CTC scoring systems. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;55:93-8.
80. Bourhis J, Calais G, Lapeyre M, i sur. Concomitant radiochemotherapy or accelerated radiotherapy: analysis of two randomized trials of the French Head and Neck Cancer Group (GORTEC). *Semin Oncol* 2004;31:822-6.
81. Machtay M, Moughan J, Trotti A, i sur. Factors associated with severe late toxicity after concurrent chemoradiation for locally advanced head and neck cancer: an RTOG analysis. *J Clin Oncol* 2008;26:3582-9.
82. Horiot JC, Le Fur R, N'Guyen T, i sur. Hyperfractionation versus conventional fractionation in oropharyngeal carcinoma: final analysis of a randomized trial of the EORTC cooperative group of radiotherapy. *Radiother Oncol* 1992;25:231-41.
83. Horiot JC, Bontemps P, van den Bogaert W, i sur. Accelerated fractionation (AF) compared to conventional fractionation (CF) improves loco-regional control in the radiotherapy of advanced head and neck cancers: results of the EORTC 22851 randomized trial. *Radiother Oncol* 1997;44:111-21.
84. Lee NY, de Arruda FF, Puri DR, i sur. A comparison of intensity-modulated radiation therapy and concomitant boost radiotherapy in the setting of concurrent chemotherapy for locally advanced oropharyngeal carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;66:966-74.
85. Nutting CM, Morden JP, Harrington KJ, i sur. Parotid-sparing intensity modulated versus conventional radiotherapy in head and neck cancer (PARSPORT): a phase 3 multicentre randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2011;12:127-36.

86. Hodge CW, Bentzen SM, Wong G, i sur. Are we influencing outcome in oropharynx cancer with intensity-modulated radiotherapy? An inter-era comparison. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;69:1032-41.
87. Veldeman L, Madani I, Hulstaert F, i sur. Evidence behind use of intensity-modulated radiotherapy: a systematic review of comparative clinical studies. *Lancet Oncol* 2008;9:367-75.
88. Pow EHN, Kwong DLW, McMillan AS, i sur. Xerostomia and quality of life after intensity-modulated radiotherapy vs. conventional radiotherapy for early-stage nasopharyngeal carcinoma: initial report on a randomized controlled clinical trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;66:981-91.
89. Chi A, Nguyen NP, Tse W, i sur. Intensity modulated radiotherapy for sinonasal malignancies with a focus on optic pathway preservation. *J Hematol Oncol* 2013;6:4.
90. Murphy BA. Carcinomas of the head and neck. U: Skeel, ur. *Handbook of the cancer chemotherapy*. 8 izd. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011, str. 69-94.
91. Ma J, Liu Y, Huang XL, i sur. Induction chemotherapy decreases the rate of distant metastasis in patients with head and neck squamous cell carcinoma but does not improve survival or locoregional control: a meta-analysis. *Oral Oncol* 2012;48:1076-84.
92. Haddad R, O'Neill A, Rabinowits G, i sur. Induction chemotherapy followed by concurrent chemoradiotherapy (sequential chemoradiotherapy) versus concurrent chemoradiotherapy alone in locally advanced head and neck cancer (PARADIGM): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2013;14:257-64.
93. Cohen EEW, Karrison T, Kocherginsky M, i sur. DeCIDE: A phase III randomized trial of docetaxel (D), cisplatin (P), 5-fluorouracil (F) (TPF) induction chemotherapy (IC) in patients with N2/N3 locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN). *J Clin Oncol* 2012;30Suppl 15:Abstract 5500.
94. Harari PM, Mehta MP, Ritter MA, Petereit DG. Clinical promise tempered by reality in the delivery of combined chemoradiation for common solid tumors. *Semin Radiat Oncol* 2003;13:3-12.
95. Pignon JP, Bourhis J, Domenge C, Designé L. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. *Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer*. *Lancet* 2000;355:949-55.

96. Dai W, Li Y, Zhou Q, i sur. Cetuximab inhibits oral squamous cell carcinoma invasion and metastasis via degradation of epidermal growth factor receptor. *J Oral Pathol Med* 2014;43:250-7.
97. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-74.
98. Petruzzelli GJ. The biology of tumor invasion, angiogenesis and lymph node metastasis. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2000;62:178-85.
99. Mareel MM, Van Roy FM, Bracke ME. How and when do tumor cells metastasize? *Crit Rev Oncog* 1993;4:559-94.
100. Xing Y, Zhang J, Lin H, i sur. Relation between the level of lymph node metastasis and survival in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 2016;122:534-45.
101. Bogenrieder T, Herlyn M. Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene* 2003;22:6524-36.
102. Allen CT, Law JH, Dunn GP, Uppaluri R. Emerging insights into head and neck cancer metastasis. *Head Neck* 2013;35:1669-78.
103. Noguti J, De Moura CF, De Jesus GP, i sur. Metastasis from oral cancer: an overview. *Cancer Genomics Proteomics* 2012;9:329-35.
104. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidranski D. *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. 1 izd. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2005, str. 164-75.
105. Haagensen CD. *The spread of cancer in the lymphatic system*. U: Haagensen CD, ur. *Lymphatics in cancer*. 1 izd. Philadelphia: Saunders; 1972.
106. Ossoff RH, Sisson GA. Lymphatics of the floor of the mouth and neck: anatomical studies related to contralateral drainage pathways. *Laryngoscope* 1981;91:1847-50.
107. Kuperman D, Auethavekiat V, Adkins DR, i sur. Squamous cell cancer of the head and neck with distant metastasis at presentation. *Head Neck* 2011;33:714-8.
108. 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.
109. Lehman RH, Cox JD, Belson TP, i sur. Recurrence patterns by treatment modality of carcinomas of the floor of the mouth and oral tongue. *Am J Otolaryngol* 1982;3:174-81.

110. Liao CT, Wang HM, Chang JT, i sur. Analysis of risk factors for distant metastases in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer* 2007;110:1501-8.
111. Lim YC, Koo BS, Choi EC. Bilateral neck node metastasis: a predictor of isolated distant metastasis in patients with oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma after primary curative surgery. *Laryngoscope* 2007;117:1576-80.
112. de Bree R, Deurloo EE, Snow GB, Leemans CR. Screening for distant metastases in patients with head and neck cancer. *Laryngoscope* 2000;110:397-401.
113. Sumioka S, Sawai NY, Kishino M, Ishihama K, Minami M, Okura M. Risk factors for distant metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *J Oral Maxillofac Surg* 2013;71:1291-7.
114. Ferlito A, Shaha AR, Silver CE, Rinaldo A, Mondin V. Incidence and sites of distant metastases from head and neck cancer. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2001;63:202-7.
115. Jäckel MC, Rausch H. Distant metastasis of squamous epithelial carcinomas of the upper aerodigestive tract. The effect of clinical tumor parameters and course of illness. *HNO* 1999;47:38-44.
116. Hasegawa T, Tanakura M, Takeda D, i sur. Risk factors associated with distant metastasis in patients with oral squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2015;152:1053-60.
117. Kowalski LP, Carvalho AL, Martins Priante AV, Magrin J. Predictive factors for distant metastasis from oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2005;41:534-41.
118. Hermanek P, Hutter RVP, Sobin LH. Prognostic grouping: the next step in tumour classification. *J Cancer Res Clin Oncol* 1990;116:513-6.
119. Gospodarowicz M, O'Sullivan B. Prognostic factors in cancer. *Semin Surg Oncol* 2003;21:13-8.
120. Foulkes WD, Brunet JS, Kowalski LP, Narod SA, Franco EL. Family history of cancer is a risk factor for squamous cell carcinoma of the head and neck in Brazil: a case-control study. *Int J Cancer* 1995;63:769-73.
121. Hermanek P, Gospodarowicz MK, Henson DE, Hutter RVP, Sobin LH, ur. International Union Against Cancer (UICC). Prognostic factors in cancer. 1 izd. Berlin, Heidelberg: Springer; 1995, str. 1-11.

122. Chang TS, Chang CM, Ho HC, i sur. Impact of young age on the prognosis for oral cancer: a population-based study in Taiwan. *PLoS One* 2013;8:e75855.
123. Clarke RW, Stell PM. Squamous carcinoma of the head and neck in the young adult. *Clin Otolaryngol* 1992;17:18-23.
124. 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.
125. Hilly O, Shkedy Y, Hod R, i sur. Carcinoma of the oral tongue in patients younger than 30 years: comparison with patients older than 60 years. *Oral Oncol* 2013;49:987-90.
126. Knopf A, Lempert J, Bas M, Slotta-Huspenina J, Mansour N, Fritsche MK. Oncogenes and tumor suppressor genes in squamous cell carcinoma of the tongue in young patients. *Oncotarget* 2015;6:3443-51.
127. Sun Q, Fang Q, Guo S. A comparison of oral squamous cell carcinoma between young and old patients in a single medical center in China. *Int J Clin Exp Med* 2015;8:12418-23.
128. Von Doersten PG, Cruz RM, Rasgon BM, Quesenberry CP, Hilsinger RI. Relation between age and head and neck cancer recurrence after surgery: A multivariate analysis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;113:197-203.
129. Lee WR, Berkey B, Marcial V, i sur. Anemia is associated with decreased survival and increased locoregional failure in patients with locally advanced head and neck carcinoma: a secondary analysis of RTOG 85-27. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998;42:1069-75.
130. Prosnitz RG, Yao B, Farrell CL, Clough R, Brizel DM. Pretreatment anemia is correlated with the reduced effectiveness of radiation and concurrent chemotherapy in advanced head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;61:1087-95.
131. Henke M, Laszig R, Rube C, i sur. Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy: randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2003;362:1255-60.
132. Leite IC, Koifman S. Survival analysis in a sample of oral cancer patients at a reference hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Oral Oncol* 1998;34:347-52.
133. Ribeiro KCB, Kowalski LP, Latorre MRDO. Perioperative complications, comorbidities, and survival in oral or oropharyngeal cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;129:219-28.

134. Ribeiro KCB, Kowalski LP, Latorre MRDO. Impact of comorbidity, symptoms, and patients characteristics on the prognosis of oral carcinomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2000;126:1079-85.
135. Piccirillo JF, Lacy PD, Basu A, Spitznagel EL. Development of a new head and neck cancer specific comorbidity index. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002;128:1172-9.
136. Preciado DA, Matas A, Adams GL. Squamous cell carcinoma of the head and neck in solid organ transplant recipients. *Head Neck* 2002;24:319-25.
137. Genden EM, Ferlito A, Bradley PJ, Rinaldo A, Scully C. Neck disease and distant metastases. *Oral Oncol* 2003;39:207-12.
138. Byers RM, Weber RS, Andrews T, McGill D, Kare R, Wolf P. Frequency and therapeutic implications of "skip metastases" in the neck from squamous carcinoma of the oral tongue. *Head Neck* 1997;19:14-9.
139. O-charoenrat P, Pillai G, Patel S, i sur. Tumour thickness predicts cervical nodal metastases and survival in early oral tongue cancer. *Oral Oncol* 2003;39:386-90.
140. Almagush A, Bello IO, Keski-Säntti H i sur. Depth of invasion, tumor budding, and worst pattern of invasion: prognostic indicators in early-stage oral tongue cancer. *Head Neck* 2014;36:811-8.
141. Pimenta Amaral TM, Da Silva Freire AR, Carvalho AL, Pinto CA, Kowalski LP. Predictive factors of occult metastasis and prognosis of clinical stages I and II squamous cell carcinoma of the tongue and floor of the mouth. *Oral Oncol* 2004;40:780-6.
142. Lim SC, Zhang S, Ishii G, i sur. Predictive markers for late cervical metastasis in stage I and II invasive squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Clin Cancer Res* 2004;10:166-72.
143. Morton R, Ferguson CM, Lambie NK, Whitlock RM. Tumor thickness in early tongue cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994;120:717-20.
144. Keski-Säntti H, Atula T, Tikka J, Hollmén J, Mäkitie AA, Leivo I. Predictive value of histopathologic parameters in early squamous cell carcinoma of oral tongue. *Oral Oncol* 2007;43:1007-13.
145. Mücke T, Mitchell DA, Ritschl LM, i sur. Influence of tumor volume on survival in patients with oral squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2015;141:1007-11.
146. Kneijens JL, Hauptmann M, Pameijer FA, i sur. Tumor volume as prognostic factor in chemoradiation for advanced head and neck cancer. *Head Neck* 2011;33:375-82.

147. Hoebbers FJ, Pameijer FA, de Bois J, i sur. Prognostic value of primary tumor volume after concurrent chemoradiation with daily low-dose cisplatin for advanced-stage head and neck carcinoma. *Head Neck* 2008;30:1216-23.
148. Jang JY, Kim MJ, Ryu G, Choi N, Ko YH, Jeong HS. Prediction of lymph node metastasis by tumor dimension versus tumor biological properties in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Res Treat* 2016; 2016;48:54-62.
149. Woolgar JA. Pathology of the N0 neck. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1999;37:205-9.
150. Leemans CR, Tiwari R, Nauta JJ, van der Waal I, Snow GB. Regional lymph node involvement and its significance in the development of distant metastases in head and neck carcinoma. *Cancer* 1993;71:452-6.
151. Robbins KT, Shaha AR, Medina JE, i sur. Consensus Statement on the Classification and Terminology of Neck Dissection. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2008;134:536-8.
152. Myers JN, Greenberg JS, Mo V, Roberts D. Extracapsular spread. A significant predictor of treatment failure in patients with squamous cell carcinoma of the tongue. *Cancer* 2001;92:3030-6.
153. Shaw RJ, Lowe D, Woolgar JA, i sur. Extracapsular spread in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2010;32:714-22.
154. Kurokawa H, Yamashita Y, Takeda S, Zhang M, Fukuyama H, Takahashi T. Risk factors for late cervical lymph node metastases in patients with stage I or II carcinoma of the tongue. *Head Neck* 2002;24:731-6.
155. Sparano A, Weinstein G, Chalian A, Yodul M, Weber R. Multivariate predictors of occult neck metastasis in early oral tongue cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;131:472-6.
156. Po Wing Yuen A, Lam KY, Lam LK, i sur. Prognostic factors of clinically stage I and II oral tongue carcinoma - A comparative study of stage, thickness, shape, growth pattern, invasive front malignancy grading, Martinez-Gimeno score, and pathologic features. *Head Neck* 2002;24:513-20.
157. Okamoto M, Nishimine M, Kishi M, i sur. Prediction of delayed neck metastasis in patients with stage I/II squamous cell carcinoma of the tongue. *J Oral Pathol Med* 2002;31:227-33.
158. Binmadi NO, Basile JR. Perineural invasion in oral squamous cell carcinoma: a discussion of significance and review of the literature. *Oral Oncol* 2011;47:1005-10.

159. Haddad RI, Shin DM. Recent advances in head and neck cancer. *N Engl J Med* 2008;11;359:1143-54.
160. Frunza A, Slavescu D, Lascar I. Perineural invasion in head and neck cancers - a review. *J Med Life* 2014;7:121-3.
161. Ayala GE, Dai H, Tahir SA, i sur. Stromal antiapoptotic paracrine loop in perineural invasion of prostatic carcinoma. *Cancer Res* 2006;66:5159-64.
162. Barrett AW, Speight PM. Perineural invasion in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands: a valid prognostic indicator? *Oral Oncol* 2009;45:936-40.
163. Speight PM, Barrett AW. Prognostic factors in malignant tumours of the salivary glands. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2009;47:587-93.
164. Matsushita Y, Yanamoto S, Takahashi H, i sur. A clinicopathological study of perineural invasion and vascular invasion in oral tongue squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2015;44:543-8.
165. Jardim JF, Francisco AL, Gondak R, Damascena A, Kowalski LP. Prognostic impact of perineural invasion and lymphovascular invasion in advanced stage oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2015;44:23-8.
166. Tai SK, Li WY, Yang MH, Chu PY, Wang YF, Chang PM. Perineural invasion as a major determinant for the aggressiveness associated with increased tumor thickness in T1-2 oral tongue and buccal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2013;20:3568-74.
167. Chen TC, Wang CP, Ko JY, i sur. The impact of perineural invasion and/or lymphovascular invasion on the survival of early-stage oral squamous cell carcinoma patients. *Ann Surg Oncol* 2013;20:2388-95.
168. Chatzistefanou I, Lubek J, Markou K, Ord RA. The role of neck dissection and postoperative adjuvant radiotherapy in cN0 patients with PNI-positive squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oral Oncol* 2014;50:753-8.
169. Langendijk JA, Slotman BJ, van der Waal I, Doomaert P, Berkof J, Leemans CR. Risk-group definition by recursive partitioning analysis of patients with squamous cell head and neck carcinoma treated with surgery and postoperative radiotherapy. *Cancer* 2005;104:1408-17.
170. Lin YT, Chien CY, Lu CT, i sur. Triple-positive pathologic findings in oral cavity cancer are related to a dismal prognosis. *Laryngoscope* 2015;125:300-5.

171. Huh JW, Lee JH, Kim HR, Kim YJ. Prognostic significance of lymphovascular or perineural invasion in patients with locally advanced colorectal cancer. *Am J Surg* 2013;206:758-63.
172. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990;82:4-6.
173. Miyahara M, Tanuma J, Sugihara K, Semba I. Tumor lymphangiogenesis correlates with lymph node metastasis and clinicopathologic parameters in oral squamous cell carcinoma. *Cancer* 2007;110:1287-94.
174. Shieh YS, Lee HS, Shiah SG, Chu YW, Wu CW, Chang LC. Role of angiogenic and non-angiogenic mechanisms in oral squamous cell carcinoma: correlation with histologic differentiation and tumor progression. *J Oral Pathol Med* 2004;33:601-6.
175. Pazouki S, Chisholm DM, Adi MM, i sur. The association between tumour progression and vascularity in the oral mucosa. *J Pathol* 1997;183:39-43.
176. Penfold CN, Partridge M, Rojas R, Langdon JD. The role of angiogenesis in the spread of oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1996;34:37-41.
177. Williams JK, Carlson GW, Cohen C, Derose PB, Hunter S, Jurkiewicz MJ. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in oral cavity tumors. *Am J Surg* 1994;168:373-80.
178. Lopez-Graniel CM, Tamez de Leon D, Meneses-Garcia A, i sur. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in oral cavity carcinomas. *J Exp Clin Cancer Res* 2001;20:463-8.
179. Den Hart BC, Guidi AJ, Tognazzi K, Dvorak HF, Brown LF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in oral and laryngeal squamous cell carcinoma and dysplasia. *Lab Invest* 1997;77:659-64.
180. Shpitzer T, Chaimoff M, Gal R, Stern Y, Feinmesser R, Segal K. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in early oral tongue cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1996;122:865-8.
181. Alcade RE, Shintani S, Yoshihama Y, Matsumura T. Cell proliferation and tumor angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 1995;15:1417-22.
182. Hannen EJ, Van Der Laak JA, Manni JJ, i sur. Computer assisted analysis of the microvasculature in metastasised and nonmetastasised squamous cell carcinoma of the tongue. *Head Neck* 2002;24:643-50.

183. Gleich LL, Biddinger PW, Duperier FD, Gluckman JL. Tumor angiogenesis as a prognostic indicator in T2-T4 oral cavity squamous cell carcinoma: a clinical-pathologic correlation. *Head Neck* 1997;19:276-80.
184. Gleich LL, Biddinger PW, Pavelic ZP, Gluckman JL. Tumor angiogenesis in T1 oral cavity squamous cell carcinoma: role in predicting tumor aggressiveness. *Head Neck* 1996;18:343-6.
185. Leedy DA, Trune DR, Kronz JD, Weidner N, Cohen JI. Tumor angiogenesis, the p53 antigen, and cervical metastasis in squamous carcinoma of the tongue. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1994;111:417-22.
186. Marioni G, Staffieri A, Fasanaro E, i sur. The role of angiogenin in pT1-T2 tongue carcinoma neo-angiogenesis and cell proliferation: an exploratory study. *J Oral Pathol Med* 2013;42:606-11.
187. Benevenuto TG, Nonaka CF, Pinto LP, de Souza LB. Immunohistochemical comparative analysis of cell proliferation and angiogenic index in squamous cell carcinomas of the tongue between young and older patients. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2012;20:291-7.
188. Yokobori Y, Toyoda M, Sakakura K, Kaira K, Tsushima Y, Chikamatsu K. (18)F-FDG uptake on PET correlates with biological potential in early oral squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol* 2015;135:494-9.
189. Matos LL, Trufelli DC, de Matos MG, da Silva Pinhal MA. Immunohistochemistry as an important tool in biomarkers detection and clinical practice. *Biomark Insights* 2010;5:9-20.
190. Oliveira LR, Ribeiro-Silva A. Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2011;40:298-307.
191. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965;150:893-9.
192. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, i sur. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 1988;242:1528-34.
193. Wozney JM. The bone morphogenetic protein family: Multifunctional cellular regulators in the embryo and adult. *Eur J Oral Sci* 1998;106:160-6.
194. Reddi AH. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nature Biotech* 1998;16:247-52.
195. Vukicevic S, Stavljenic A, Pecina M. Discovery and clinical applications of bone morphogenetic proteins. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995;33:661-71.

196. Wang RN, Green J, Wang Z, i sur. Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes Dis* 2014;1:87-105.
197. Wozney JM. Bone morphogenetic proteins and their gene expression. U: Noda M. Cellular and molecular biology of bone. Academic Press, San Diego 1993; str. 131-67.
198. Tabas JA, Zasloff M, Wasmuth JJ, i sur. Bone morphogenetic protein: Chromosomal localization of human genes for BMP-1, BMP-2A, and BMP-3. *Genomics* 1991;9:283-9.
199. Hahn GV, Cohen RB, Wozney JM, Levitz CL, Zasloff MA, Kaplan FS. A bone morphogenetic protein subfamily: Chromosomal localization of human genes for BMP5, BMP6, and BMP7. *Genomics* 1992;14:759-62.
200. Rao VVNG, Loffler C, Wozney JM, Hansmann I. The gene for bone morphogenetic protein 2A (BMP2A) is localized to human chromosome 20p12 by radioactive and nonradioactive in situ hybridization (ISH & FISH). *Hum Genet* 1992;90:299-302.
201. Newbury-Ecob RA, Leanage R, Raeburn JA, Young ID. Holt-Oram syndrome: a clinical genetic study. *J Med Genet* 1996;33:300-7.
202. Chaikuad A, Alfano I, Kerr G, i sur. Structure of the bone morphogenetic protein receptor ALK2 and implications for fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Biol Chem* 2012;287:36990-8.
203. Hardwick JC, Kodach LL, Offerhaus GJ, van den Brink GR. Bone morphogenetic protein signalling in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2008;8:806-12.
204. Canalis E, Economides AN, Gazzerro E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev* 2003;24:218-35.
205. Reinholz MM, Iturria SJ, Ingle JN, Roche PC. Differential gene expression of TGF-beta family members and osteopontin in breast tumor tissue: analysis by real-time quantitative PCR. *Breast Cancer Res Treat* 2002;74:255-69.
206. Choi YJ, Ingram PN, Yang K, i sur. Identifying an ovarian cancer cell hierarchy regulated by bone morphogenetic protein 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112:6882-8.
207. Clement JH, Wolfl S. Bone morphogenetic proteins and cancer. U: Vukičević S, Sampath KT. Bone morphogenetic proteins: regeneration of bone and beyond. Basel-Boston-Berlin: Birkhauser Verlag; 2004, str. 267-92.
208. Higinbotham KG, Karavanova ID, Diwan BA, Perantoni AO. Deficient expression of mRNA for the putative inductive factor bone morphogenetic protein 7 in chemically initiated rat nephroblastomas. *Mol Carcinog* 1998;23:53-61.

209. Bentley H, Hamdy FC, Hart KA, i sur. Expression of bone morphogenetic proteins in human prostatic adenocarcinoma and benign prostatic hyperplasia. *Br J Cancer* 1992;66:1159-63.
210. Masuda H, Fukabori Y, Nakano K, Shimizu N, Yamanaka H. Expression of bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) in human prostate. *Prostate* 2004;59:101-6.
211. González-Gómez P, Crecente-Campo J, Zahonero C, i sur. Controlled release microspheres loaded with BMP7 suppress primary tumors from human glioblastoma. *Oncotarget* 2015;6:10950-63.
212. Lappin DF, Abu-Serriah M, Hunter KD. Effects of recombinant human bone morphogenetic protein 7 (rhBMP-7) on the behaviour of oral squamous cell carcinoma: a preliminary in vitro study. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2015;53:158-63.
213. Zhang T, Fu J, Li Y, Wang Y, Zhang L, Liu Y. Bone morphogenetic protein 7 is associated with the nodal invasion of colon cancer. *Oncol Lett* 2016;11:1707-12.
214. Autzen P, Robson CN, Bjartell A, i sur. Bone morphogenetic protein 6 in skeletal metastases from prostate cancer and other common human malignancies. *Br J Cancer* 1998;78:1219-23.
215. Thomas BG, Hamdy FC. Bone morphogenetic protein-6: potential mediator of osteoblastic metastases in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2000;3:283-5.
216. Lee Y, Schwarz E, Davies M, i sur. Differences in the cytokine profiles associated with prostate cancer cell induced osteoblastic and osteolytic lesions in bone. *J Orthop Res* 2003;21:62-72.
217. Jin Y, Lu HB, Liong E, Lau TY, Tipoe GL. Transcriptional mRNA of BMP-2, 3, 4 and 5 in trigeminal nerve, benign and malignant peripheral nerve sheath tumors. *Histol Histopathol* 2001;16:1013-9.
218. Langenfeld EM, Calvano SE, Abou-Nukta F, Lowry SF, Amenta P, Langenfeld J. The mature bone morphogenetic protein-2 is aberrantly expressed in non-small cell lung carcinomas and stimulates tumor growth of A549 cells. *Carcinogenesis* 2003;24:1445-54.
219. Langenfeld EM, Langenfeld J. Bone morphogenetic protein-2 stimulates angiogenesis in developing tumors. *Mol Cancer Res* 2004;2:141-9.
220. Raja E, Tzavlaki K, Vuilleumier R, i sur. The protein kinase LKB1 negatively regulates bone morphogenetic protein receptor signaling. *Oncotarget* 2016;7:1120-43.

221. Yang S, Zhong C, Frenkel B, Reddi AH, Roy-Burman P. Diverse biological effect and Smad signaling of bone morphogenetic protein 7 in prostate tumor cells. *Cancer Res* 2005;65:5769-77.
222. Nakajima Y, Yamagishi T, Hokari S, Nakamura H. Mechanisms involved in valvuloseptal endocardial cushion formation in early cardiogenesis: roles of transforming growth factor (TGF)-beta and bone morphogenetic protein (BMP). *Anat Rec* 2000;258:119-27.
223. Buijs JT, Rentsch CA, van der Horst G, i sur. BMP7, a putative regulator of epithelial homeostasis in the human prostate, is a potent inhibitor of prostate cancer bone metastasis in vivo. *Am J Pathol* 2007;171:1047-57.
224. Ye L, Lewis-Russell JM, Kynaston H, Jiang WG. Endogenous bone morphogenetic protein-7 controls the motility of prostate cancer cells through regulation of bone morphogenetic protein antagonists. *J Urol* 2007;178:1086-91.
225. Ye L, Jiang WG. Bone morphogenetic proteins in tumour associated angiogenesis and implication in cancer therapies. *Cancer Lett* 2015 [U tisku].
226. Zhao M, Takata T, Ogawa I, Takekoshi T, Nikai H. Immunohistochemical demonstration of bone morphogenetic protein-2 and type II collagen in pleomorphic adenoma of salivary glands. *J Oral Pathol Med* 1998;27:293-6.
227. Kawamura C, Kizaki M, Yamato K, i sur. Bone morphogenetic protein-2 induces apoptosis in human myeloma cells with modulation of STAT3. *Blood* 2000;96:2005-11.
228. Grcević D, Marusić A, Grahovac B, Jaksic B, Kusec R. Expression of bone morphogenetic proteins in acute promyelocytic leukemia before and after combined all trans-retinoic acid and cytotoxic treatment. *Leuk Res* 2003;27:731-8.
229. Lissenberg-Thunnissen SN, de Gorter DJ, Sier CF, Schipper IB. Use and efficacy of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Int Orthop* 2011;35:1271-80.
230. Vukicevic S, Sampath KT, ur. *Bone Morphogenetic Proteins - From Laboratory to Clinical Practice*. 2 izd. Basel - Boston - Berlin, Birkhäuser Verlag; 2004. str. 157-62.
231. Vukicevic S, Oppermann H, Verbanac D, i sur. The clinical use of bone morphogenetic proteins revisited: a novel biocompatible carrier device OSTEOGROW for bone healing. *Int Orthop* 2014;38:635-47.

232. Lyons K, Graycar JL, Lee A, et al. Vgr-1, a mammalian gene related to *Xenopus* Vg-1, is a member of the transforming growth factor beta gene superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:4554-8.
233. Celeste AJ, Iannazzi JA, Taylor RC, et al. Identification of transforming growth factor B family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:9843-7.
234. Luu HH, Song WX, Luo X, Manning, et al. Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 2007;25:665-77.
235. Saremba S, Nickel J, Seher A, Kotsch A, Sebald W, Mueller TD. Type I receptor binding of bone morphogenetic protein 6 is dependent on N-glycosylation of the ligand. *FEBS J* 2008;275:172-83.
236. Solloway MJ, Dudley AT, Bikoff EK, Lyons KM, Hogan BL, Robertson EJ. Mice lacking Bmp6 function. *Dev Genet* 1998;22:321-39.
237. Blessing M, Schirmacher P, Kaiser S. Overexpression of bone morphogenetic protein-6 (BMP-6) in the epidermis of transgenic mice: inhibition or stimulation of proliferation depending on the pattern of transgene expression and formation of psoriatic lesions. *J Cell Biol* 1996;135:227-39.
238. Friedman MS, Long MW, Hankenson KD. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells is regulated by bone morphogenetic protein-6. *J Cell Biochem* 2006;98:538-54.
239. Sammons J, Ahmed N, El-Sheemy M, Hassan HT. The role of BMP-6, IL-6, and BMP-4 in mesenchymal stem cell-dependent bone development: effects on osteoblastic differentiation induced by parathyroid hormone and vitamin D(3). *Stem Cells Dev* 2004;13:273-80.
240. Simic P, Culej JB, Orlic I, Grgurevic L, Borovecki F, Vukicevic S. BMP-6 restores bone in osteoporotic aged rats and, unlike estradiol and PTH, restores trabecular bone in ovariectomized BMP-6 knockout mice. *J Bone Miner Res* 2005;20Suppl 1:8.
241. Simic P, Culej JB, Orlic I, et al. Systemically administered bone morphogenetic protein-6 restores bone in aged ovariectomized rats by increasing bone formation and suppressing bone resorption. *J Biol Chem* 2006;281:25509-21.
242. Carey DE, Liu X. Expression of bone morphogenetic protein-6 messenger RNA in bovine growth plate chondrocytes of different size. *J Bone Miner Res* 1995;10:401-5.

243. Perry MJ, McDougall KE, Hou SC, Tobias JH. Impaired growth plate function in *bmp-6* null mice. *Bone* 2008;42:216-25.
244. Brkljacic J, Pauk M, Erjavec I, i sur. Exogenous heparin binds and inhibits bone morphogenetic protein 6 biological activity. *Int Orthop* 2013;37:529-41.
245. Yuen HF, McCrudden CM, Grills C, Zhang SD, Huang YH, Chan KK. Combinatorial use of bone morphogenetic protein 6, noggin and SOST significantly predicts cancer progression. *Cancer Sci* 2012;103:1145-54.
246. Seckinger A, Meissner T, Moreaux J, i sur. Bone morphogenic protein 6: a member of a novel class of prognostic factors expressed by normal and malignant plasma cells inhibiting proliferation and angiogenesis. *Oncogene* 2009;28:3866-79.
247. Takahashi M, Otsuka F, Miyoshi T, i sur. Bone morphogenetic protein 6 (BMP6) and BMP7 inhibit estrogen-induced proliferation of breast cancer cells by suppressing p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Endocrinol* 2008;199:445-55.
248. Kejner AE, Burch MB, Sweeny L, Rosenthal EL. Bone morphogenetic protein 6 expression in oral cavity squamous cell cancer is associated with bone invasion. *Laryngoscope* 2013;123:3061-5.
249. Raida M, Sarbia M, Clement JH, Adam S, Gabbert HE, Höffken K. Expression, regulation and clinical significance of bone morphogenetic protein 6 in esophageal squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer* 1999;83:38-44.
250. Smith BD, Haffty BG. Molecular markers as prognostic factors for local recurrence and radioresistance in head and neck squamous cell carcinoma. *Radiat Oncol Invest* 1999;7:125-44.
251. Salesiotis AN, Cullen KJ. Molecular markers predictive of response and prognosis in the patient with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. Evolution of a model beyond TNM staging. *Curr Opin Oncol* 2000;12:229-39.
252. Quon H, Liu FF, Cummings BJ. Potential molecular prognostic markers in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck* 2001;23:147-59.
253. Maurizi M, Almadori G, Ferrandina G. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in laryngeal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 1996;74:1253-7.
254. Grandis J, Melhem M, Gooding W, i sur. Levels of TGF- α and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:824-32.

255. Ang KK, Berkey BA, Tu X, *i sur.* Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res* 2002;62:7350-6.
256. Hartmann S, Seher A, Brands RC, *i sur.* Influence of epidermal growth factor receptor expression on the cetuximab and panitumumab response rates of head and neck carcinoma cells. *J Craniomaxillofac Surg* 2014;42:1322-8.
257. Ansell A, Jedlinski A, Johansson AC, Roberg K. Epidermal growth factor is a potential biomarker for poor cetuximab response in tongue cancer cells. *J Oral Pathol Med* 2016;45:9-16.
258. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, *i sur.* Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;351:337-45.
259. Giaccone G, Herbst RS, Manegold C, *i sur.* Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer. A phase III trial-INTACT 1. *J Clin Oncol* 2004;22:777-84.
260. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, *i sur.* Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer. 5-year survival data from a phase 3 randomised trial and relation between cetuximab-induced rash and survival. *Lancet Oncol* 2010;11:21-8.
261. Sanabria A, Carvalho AL, Vartanian JG, Magrin J, Ikeda MK, Kowalski LP. Comorbidity is a prognostic factor in elderly patients with head and neck cancer. *Ann Surg Oncol* 2007;14:1449-57.
262. Luryi AL, Chen MM, Mehra S, Roman SA, Sosa JA, Judson BL. Treatment factors associated with survival in early-stage oral cavity cancer: Analysis of 6830 cases from the National Cancer Data Base. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 2015;141:593-8.
263. Luryi AL, Chen MM, Mehra S, Roman SA, Sosa JA, Judson BL. Positive surgical margins in early stage oral cavity cancer: an analysis of 20,602 cases. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2014;151:984-90.
264. Bonner JA, Maihle NJ, Folven BR, Christianson TJ, Spain K. The interaction of epidermal growth factor and radiation in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines with vastly different radiosensitivities. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994;29:243-7.

265. Huang SM, Bock JM, Harari PM. Epidermal growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis, and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* 1999;59:1935-40.
266. Saleh MN, Raisch KP, Stackhouse MA, i sur. Combined modality therapy of A431 human epidermoid cancer using anti-EGFR antibody C225 and radiation. *Cancer Biother Radiopharm* 1999;14:451-63.
267. El-Naaj IA, Leiser Y, Shveis M, Sabo E, Peled M. Incidence of oral cancer occult metastasis and survival of T1-T2N0 oral cancer patients. *J Oral Maxillofac Surg* 2011;69:2674-9.
268. Medina JE. Management of the neck in squamous cell carcinomas of the head and neck. U: Ensley JF, Gutkind S, Jacobs JA, Lippman S, ur. *Head and Neck Cancer: Emerging Perspectives*. Gulf Professional Publishing; 2003. str. 318.
269. Yao M, Chang K, Funk GF, i sur. The failure patterns of oral cavity squamous cell carcinoma after intensity-modulated radiotherapy - the university of Iowa experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;67:1332-41.
270. Rusthoven K, Ballonoff A, Raben, Chen C. Poor prognosis in patients with stage I and II oral tongue squamous cell carcinoma. *Cancer* 2008;112:345-51.
271. Wang K, Veivers D. Tumour thickness as a determinant of nodal metastasis in oral tongue carcinoma. *ANZ J Surg* 2016 [U tisku].
272. Ho CM, Lam KM, Wei WI, Lau SK, Lam LK. Occult lymph nodemetastasis in small oral tongue cancers. *Head Neck* 1992;14:359-63.
273. Shaw RJ, Brown JS, Woolgar JA, Lowe D, Rogers SN, Vaughan ED. The influence of the pattern of mandibular invasion on recurrence and survival in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2004;26:861-9.
274. Ash CS, Nason RW, Abdoh AA, Cohen MA. Prognostic implications of mandibular invasion in oral cancer. *Head Neck* 2000;22:794-8.
275. Ebrahimi A, Murali R, Gao K, Elliott MS, Clark JR. The prognostic and staging implications of bone invasion in oral squamous cell carcinoma. *Cancer* 2011;117:4460-7.
276. Wong RJ, Keel SB, Glynn RJ, Varvares MA. Histological pattern of mandibular invasion by oral squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 2000;110:65-72.
277. Loree TR, Strong EW. Significance of positive margins in oral cavity squamous carcinoma. *Am J Surg* 1990;160:410-4.

278. Smits RW, Koljenović S, Hardillo JA, i sur. Resection margins in oral cancer surgery: Room for improvement. *Head Neck* 2016;38Suppl 1:2197-203.
279. Dillon JK, Brown CB, McDonald TM, i sur. How does the close surgical margin impact recurrence and survival when treating oral squamous cell carcinoma? *J Oral Maxillofac Surg* 2015;73:1182-8.
280. Gokavarapu S, Chander R, Parvataneni N, Puthamakula S. Close margins in oral cancers: implication of close margin status in recurrence and survival of pT1N0 and pT2N0 oral cancers. *Int J Surg Oncol* 2014;2014:545372.
281. Brandwein-Gensler M, Teixeira MS, Lewis CM, i sur. Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. *Am J Surg Pathol* 2005;29:167-78.
282. Liao CT, Chang JT, Wang HM, i sur. Does adjuvant radiation therapy improve outcomes in pT1-3N0 oral cavity cancer with tumor-free margins and perineural invasion? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008;71:371-6.
283. Kowalski LP, Bagietto R, Lara JR, Santos RL, Silva JF Jr, Magrin J. Prognostic significance of the distribution of neck node metastasis from oral carcinoma. *Head Neck* 2000;22:207-14.
284. Davidson BJ, Kulkarny V, Delacure MD, Shah JP. Posterior triangle metastases of squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract. *Am J Surg* 1993;166:395-8.
285. de Juan J, García J, López M, i sur. Inclusion of extracapsular spread in the pTNM classification system: a proposal for patients with head and neck carcinoma. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 2013;139:483-8.
286. Wreesmann VB, Katabi N, Palmer FL, i sur. Influence of extracapsular nodal spread extent on prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2016;38Suppl 1:1192-9.
287. Alvi A, Johnson JT. Extracapsular spread in the clinically negative neck (N0): implications and outcome. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1996;114:65-70.
288. Coatesworth AP, MacLennan K. Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: the prevalence of microscopic extracapsular spread and soft tissue deposits in the clinically N0 neck. *Head Neck* 2002;24:258-61.

11. ŽIVOTOPIS

Petar Suton, dr. med., rođen je 1. veljače 1984. godine u Dubrovniku. Osnovnu i srednju školu je završio u Dubrovniku. Diplomirao je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2010. godine. Pripravnički staž je obavio od 2010. do 2011. godine, a državni ispit položio 2011. godine. Od 2012. do 2013. godine je radio u Zavodu za hitnu medicinu Krapinsko-Zagorske županije, ispostava Zabok. Specijalizaciju iz onkologije i radioterapije je započeo 2013. Objavio je 6 znanstvenih radova u CC indeksiranim časopisima te 4 sažetka na međunarodnim kongresima. Istraživač je u tri znanstvena projekta Sveučilišta u Zagrebu te aktivni član Hrvatskog društva za tumore glave i vrata, European Association for Cancer Research, European Society for Medical Oncology i British Association of Head and Neck Oncology.