

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Marija Pastorčić Grgić

**Prognostička vrijednost određivanja
nm23, MAGE-3 i NY-ESO-1
u planocelularnim karcinomima
glave i vrata**

DISERTACIJA



Zagreb, 2010.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Marija Pastorčić Grgić

**Prognostička vrijednost određivanja
nm23, MAGE-3 i NY-ESO-1
u planocelularnim karcinomima
glave i vrata**

DISERTACIJA

Zagreb, 2010.

Disertacija je izrađena u Klinici za tumore u Zagrebu

Voditelj rada: prof. dr. sc. Božena Šarčević

Hvala!!!

Prof. dr. sc. Boženi Šarčević, mentorici ovog rada, na pomoći od ideje do obrane. Mojim roditeljima, na bezuvjetnoj podršci i često postavljanom pitanju „Kad´ će to biti gotovo?“

Prim. dr. mr. sc. Danijelu Došenu, mom šefu i voditelju projekta iz kojeg je nastao ovaj rad, na podršci, razumijevanju, vremenu i svemu što me naučio.

Liječnicima Klinike za tumore, što su liječili bolesnike koji su uključeni u ovo istraživanje.

Prof. dr. sc. Slobodanu Vukičeviću, što me zainteresirao za znanost.

Dr. sc. Arijani Znaor, dr. med, na pomoći u prikupljanju podataka iz Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo.

Mojim prijateljicama, doktoricama iz MIOC-a, Kristini Fišter i Tamari Poljičanin, na pomoći u igri s brojevima.

Mojim sestrama Uršuli i Mojmiri, koje su svojim savjetima pomogle da ovaj rad bude bolji.

Mojoj obitelji, Marku i mojim curama Marti i Petri, nadam se da nisam ukrala previše vremena koje je njima pripadalo.

Popis oznaka i kratica

AJCC - Američko društvo za rak (eng. American Joint Committee on Cancer)

CT – kompjutorizirana tomografija

EGF - epidermalni faktor rasta

EGFR - receptor epidermalnog faktora rasta

HPV – humani papiloma virus

ICAP-1 - integrin cytoplasmic domain – associated protein 1 α

LOH – gubitak heterozigotnosti (eng. loss of heterozygosity)

MHC - prema engl. major histocompatibility complex

NDP - nukleozid difosfat

N-CAM - neuronska adhezijska molekula stanice

PCNA - proliferacijski antigen jezgre

TNM – klasifikacija proširenosti tumora (Tumor, lymph Node metastasis, distant Metastasis)

UICC - Međunarodna unija za borbu protiv raka

(franc. Union Internationale Contre le Cancer)

UZV – ultrazvuk

SADRŽAJ

1. Uvod	
1.1. Planocelularni karcinom glave i vrata	1
1.1.1. Epidemiologija	2
1.1.2. Etiologija	3
1.1.3. Dijagnostička obrada	5
1.1.4. Određivanje stadija bolesti	6
1.1.5. Planiranje liječenja	8
1.1.6. Prognostički čimbenici	9
1.2. Regionalni limfni čvorovi	12
1.3. Posebnosti planocelularnog karcinoma glave i vrata ovisne o lokalizaciji	14
1.3.1. Usna šupljina	14
1.3.2. Orofarinks	16
1.3.3. Hipofarinks	18
1.3.4. Larinks	20
1.4. Patohistološka slika planocelularnog karcinoma	23
1.5. Genetske promjene u planocelularnom karcinomu glave i vrata	27
1.6. Patofiziologija metastaziranja tumora	30
1.7. Gen nm23	31
1.8. Tumorski antigeni i imunološka reakcija na tumor	35
1.9. Gen MAGE-3	39
1.10. Gen NY-ESO-1	42
2. Hipoteza	43
3. Cilj istraživanja	44
4. Materijal i metode istraživanja	45
5. Rezultati	47
5.1. Analiza obilježja tumora odabranih za imunohistokemijsku obradu	47
5.2. Analiza međuodnosa obilježja odabranih tumora	53
5.2.1. Odnos lokalizacije i veličine tumora	53
5.2.2. Odnos lokalizacije i metastaza u limfne čvorove na vratu	53

5.2.3. Odnos lokalizacije, T stadija tumora i metastaza u limfnim čvorovima na vratu.....	55
5.2.4. Odnos lokalizacije i stadija tumora.....	55
5.2.5. Odnos lokalizacije i PH gradusa tumora.....	57
5.2.6. Odnos PH gradusa i metastaza u limfne čvorove na vratu.....	58
5.2.7. Odnos PH gradusa tumora i stadija bolesti.....	59
5.3. Analiza preživljenja.....	61
5.3.1. Ukupno preživljenje.....	61
5.3.2. Preživljenje ovisno o lokalizaciji.....	63
5.3.3. Preživljenje ovisno o T stadiju.....	64
5.3.4. Preživljenje ovisno o N stadiju.....	65
5.3.5. Preživljenje ovisno o stadiju bolesti.....	66
5.3.6. Preživljenje ovisno o PH gradusu.....	67
5.4. Analiza izraženosti gena.....	68
5.4.1. Analiza izraženosti nm23 gena.....	72
5.4.2. Analiza izraženosti MAGE-3 gena.....	80
5.4.3. Analiza izraženosti NY-ESO-1 gena.....	87
6. Rasprava.....	94
7. Zaključci.....	104
8. Sažetak na hrvatskom jeziku.....	105
9. Sažetak na engleskom jeziku.....	106
10. Literatura.....	107
11. Životopis.....	115

1. Uvod

1.1. PLANOCELULARNI KARCINOM GLAVE I VRATA

Planocelularni karcinom glave i vrata je zajednički naziv za najčešću vrstu tumora sluznice gornjeg respiratornog i probavnog sustava. Gornji respiratorni i probavni sustav čine nos, usna šupljina, ždrijelo i grlo. Tumori koji nastaju na sluznici građenoj od mnogoslojnog pločastog epitela imaju jedinstvenu histološku sliku planocelularnog karcinoma. Osnovno anatomsko i funkcionalno obilježje gornjeg respiratornog i probavnog sustava je križanje puta disanja i gutanja, te funkcija govora. Planocelularni karcinom glave i vrata nastaje zbog kumulativnih genetskih promjena stanica kao posljedica izloženosti karcinogenima iz duhana i alkohola, te pod utjecajem virusa (kao što su humani papiloma virusi), uz pozadinu genetske predispozicije (1, 2). Rast tumora ugrožava bolesnika izazivajući vrlo teške bolove, izobličenje, promjene u govoru, te elementarnim životnim funkcijama disanju i gutanju (3, 4). Planiranje liječenja temelji se na poznavanju prirode bolesti i prognostičkih čimbenika. Tumori u ranim stadijima često su izlječivi kirurški ili zračenjem. Kod bolesnika s uznapredovalim stadijima bolesti usprkos napretku u medicini i primjeni unaprijeđenih tehnika operacije, radioterapije kao i uvođenjem kemoterapije u protokole multimodalitetnog liječenja nije se značajno popravilo preživljenje u posljednjih nekoliko desetljeća (3, 4, 5, 6). Upotreba prihvaćenih prognostičkih čimbenika u odabiru liječenja ograničena je zbog heterogenosti tumora (7). Bolesnici izliječeni od prvog rano otkrivenog planocelularnog karcinoma glave i vrata imaju visoki rizik razvoja drugog primarnog tumora s niskim stopama preživljenja (6). Za ovu skupinu tumora karakteristična je jedinstvena patohistološka slika, isti etiološki čimbenici i često pojavljivanje nekoliko tumora kod istog bolesnika. Tumori različitih lokalizacija biološki se ponašaju različito. Svaka lokalizacija ima karakterističan obrazac rasta primarnog tumora, metastaziranja u limfne čvorove i vjerojatnosti stvaranja udaljenih metastaza. Postavlja se pitanje da li se na razini genetskih promjena u tumorskoj stanici radi o homogenoj ili heterogenoj skupini tumora. Napredak u razumijevanju genetske i molekularne osnove karcinoma potiče na istraživanje i otkrivanje specifičnih molekularnih promjena u planocelularnom karcinomu glave i vrata, koje bi mogle pomoći u prevenciji, ranoj dijagnozi i odabiru liječenja (5, 7, 8).

1.1.1. Epidemiologija

Planocelularni karcinom glave i vrata čini 6% svih karcinoma (5) i šesti je po učestalosti među karcinomima (5, 9). Predstavlja važan javnozdravstveni problem, što pokazuju podaci Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, koji u Hrvatskoj godišnje registrira oko 1000 novootkrivenih bolesnika s planocelularnim karcinomom glave i vrata, uz incidenciju oko 21/100 000 stanovnika (10).

Ukupno 5-godišnje preživljenje bolesnika je vrlo nisko u usporedbi s čestim vrstama karcinoma (5).

Ukupna incidencija, kao i udio pojedinih lokalizacija u ukupnom broju slučajeva razlikuju se u različitim dijelovima svijeta, ali i u različitim dijelovima pojedinih zemalja, najčešće ovisno o rasprostranjenosti štetnih navika.

Muškarci su zahvaćeni češće od žena, zbog rasprostranjenije navike pušenja i češće redovite konzumacije većih količina alkoholnih pića. Udio žena oboljelih od planocelularnog karcinoma glave i vrata različit je u različitim dijelovima svijeta, a raste zbog porasta broja pušača među ženama (11, 12).

Planocelularni karcinom glave i vrata najčešće se javlja od petog do sedmog desetljeća života (11, 12).

Među planocelularnim karcinomima glave i vrata najveća je učestalost karcinoma larinksa (11). Incidencija po pojedinim lokalizacijama opisana je u dijelu pod naslovom Posebnosti planocelularnog karcinoma glave i vrata ovisne o lokalizaciji.

1.1.2. Etiologija

Etiologija planocelularnog karcinoma glave i vrata je složena. Bolesnici su prije dijagnosticiranja tumora bili izloženi velikom broju čimbenika okoline (pušenje, konzumacija alkohola i drugi) što dovodi do multiplih molekularnih promjena stanica i nastanka tumora (2, 8). Zajednički etiološki čimbenici gotovo svih planocelularnih karcinoma glave i vrata su pušenje i konzumacija alkoholnih pića. Združeno djelovanje alkohola i cigareta višestruko povećava rizik nastanka karcinoma (11). Rizik nastanka karcinoma povećan je i za teške pušače koji ne konzumiraju alkohol (posebno visok rizik karcinoma larinksa), kao i za redovite konzumente većih količina alkoholnih pića, koji ne puše (12). Veliki broj statističkih analiza pokazuje snažnu povezanost pušenja i konzumacije alkohola s pojavljivanjem planocelularnog karcinoma glave i vrata. Relativni rizik nastanka planocelularnog karcinoma glave i vrata nakon prestanka pušenja pada, ali ostaje viši od rizika za ljude koji nikada nisu pušili (6).

U duhanskom dimu prisutno je oko 2500 različitih molekula, a oko 300 se smatra karcinogenima. Najvažniji karcinogeni iz duhana su (13): nitrozamini, policiklički aromatski ugljikohidrati, α -emitirajući polonij (^{210}Po), metali u tragovima, ugljični monoksid i fenoli.

Sinergistički učinak alkohola pripisuje se pojačanoj apsorpciji karcinogena kroz kronično upaljenu, hiperemičnu sluznicu, kao i većoj topivosti karcinogena u alkoholu u usporedbi sa slinom (14). Metabolit alkohola, acetaldehid, prepoznat je kao promotor nastanka tumora (13). Osim ovih izravnih učinaka konzumacija alkohola dovodi i do prehrambenih deficita, što povećava osjetljivost na karcinogene, a narušava i normalnu funkciju imunološkog sustava (13).

Kronična iritacija sluznice može nastati i kao posljedica drugih kemijskih iritansa iz okoline, te povećava rizik nastanka planocelularnog karcinoma (15). Jedan od mogućih etioloških čimbenika je zagađen zrak (14). U nekim zanimanjima češće se pojavljuju planocelularni karcinomi glave i vrata, najčešće larinksa. Rizični čimbenici su rad s azbestom, umjetnim vlaknima, plastikom, pesticidima, naftalenom, sulfurnom kiselinom, cementom i betonom, rad u tekstilnoj, drvnoj ili kožnoj industriji, u proizvodnji alkohola ili metalurgiji, izloženost bojama, kamenju i ugljenoj prašini, pri obradi nikla. Planocelularni karcinomi glave i vrata češće se javljaju kod automehaničara, farmera i konobara (14). Za navedene moguće etiološke čimbenike mali je broj provedenih epidemioloških studija (case-control).

Važnu ulogu u nastanku planocelularnog karcinoma glave i vrata ima i genetska predispozicija (2, 6, 8). Analiza obitelji u kojima se pojavljuju tumori povezani s pušenjem

pokazuje veliku vjerojatnost autosomno dominantnog nasljeđivanja predispozicije za nastanak karcinoma (15). Nasljeđena sklonost može biti posljedica osjetljivosti na mutagene, nemogućnosti metaboliziranja karcinogena ili pre-karcinogena, te neučinkovitog sustava popravka oštećenja DNA (1, 2, 6, 8, 14).

Humani papiloma virus (HPV) tip 16 povezuje se s nastankom planocelularnog karcinoma glave i vrata, te se prema podacima u literaturi nalazi u 31-74% karcinoma usne šupljine (6), u do 50% orofaringealnih karcinoma i do 85% laringealnih karcinoma. Do sada uloga HPV u karcinogenezi tumora glave i vrata nije razjašnjena (6, 12, 14). Postoji povezanost između virusne infekcije i nastanka tumora, ali u različitim istraživanjima prisutnost HPV ima vrlo varijabilan udio u ukupnom broju karcinoma.

Protektivnu ulogu ima prehrana bogata voćem i povrćem (13).

Izbjegavanjem pušenja i konzumiranja alkoholnih pića moglo bi se prevenirati nastanak više od 90% planocelularnih karcinoma glave i vrata (12).

1.1.3. Dijagnostička obrada

Sumnja na tumor sluznice gornjeg respiratornog i probavnog sustava postavlja se kliničkim otorinolaringološkim (ORL) pregledom. Pregledom se određuje vjerojatna ishodišna lokalizacija tumora i vidljive granice širenja tumora po sluznici. Dijagnozu je potrebno potvrditi patohistološkom analizom uzorka tumora prije početka liječenja (16). U procjeni veličine i proširenosti primarnog tumora, te zahvaćenosti okolnih struktura koristi se kompjutorizirana tomografija (CT) i endoskopija gornjeg respiratornog i probavnog sustava. Obje pretrage osim evaluacije primarnog tumora važne su i radi prepoznavanja eventualno prisutnog drugog primarnog (sinhronog) planocelularnog karcinoma u području glave i vrata. Planocelularni karcinom glave i vrata najčešće metastazira u limfne čvorove na vratu. Ultrazvuk (UZV) je metoda izbora za utvrđivanje broja i veličine suspektnih limfnih čvorova. Suspektne limfne čvorove potrebno je punktirati pod kontrolom UZV-a. U trenutku postavljanja dijagnoze incidencija udaljenih metastaza je vrlo niska. Prije donošenja odluke o načinu liječenja ipak je neophodno učiniti rendgen pluća i nalaz jetrenih enzima, te tako isključiti eventualno postojanje udaljenih metastaza. Nakon postavljanja dijagnoze planocelularnog karcinoma glave i vrata potrebno je utvrditi veličinu i proširenost tumora, te odabrati način liječenja.

1.1.4. Određivanje stadija bolesti

Nakon učinjene obrade, a prije početka liječenja bolest se klasificira prema TNM klasifikaciji Međunarodne unije za borbu protiv raka (franc. Union Internationale Contre le Cancer, UICC), (17).

Klasifikacija veličine primarnog tumora (T) razlikuje se ovisno o lokalizaciji, te će biti opisana u dijelu pod naslovom „Posebnosti planocelularnog karcinoma glave i vrata ovisne o lokalizaciji“.

Klasifikacija regionalnih metastaza (N) i udaljenih metastaza (M) jedinstvena je za sve planocelularne karcinome glave i vrata. Određivanje stadija bolesti prema klasifikaciji Američkog društva za rak (eng. American Joint Committee on Cancer, AJCC) također je jedinstveno (18).

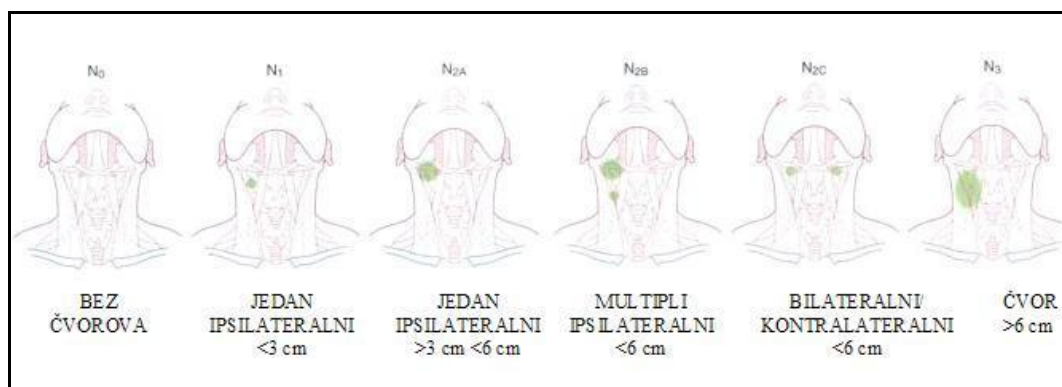
Regionalni limfni čvorovi (N) – slika 1.

N0 nema klinički pozitivnih limfnih čvorova

N1 metastaza u jednom ipsilateralnom limfnom čvoru manja od 3 cm

N2 metastaza u jednom ipsilateralnom limfnom čvoru veća od 3 cm, a manja od 6 cm ili više metastaza u ipsilateralnim limfnim čvorovima manjih od 6 cm, metastaza u obostranim ili kontralateralnim limfnim čvorovima manja od 6 cm

N3 metastaza veća od 6 cm



Slika 1. N stadiji prema UICC klasifikaciji (prilagođeno iz ref.19).

Udaljene metastaze (M)

M0 nema udaljenih metastaza

M1 postoje udaljene metastaze

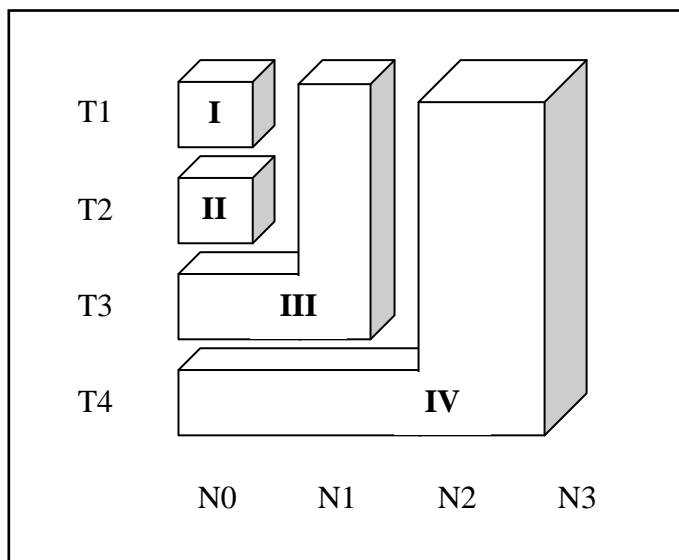
AJCC stadiji (slika 2)

Stadij I T1N0M0

Stadij II T2N0M0

Stadij III T1-2N1M0 T3N0-1M0

Stadij IV T4N0-2M0-1 T1-4N2-3M0 T1-4N0-3M1



Slika 2. Stadiji bolesti ovisno o T i N stadiju tumora.

1.1.5. Planiranje liječenja

Nakon dijagnostičke obrade i procjene općeg stanja bolesnika planira se liječenje.

Kod bolesnika s tumorom u stadiju I i nekih u stadiju II moguće je liječenje samo jednim modalitetom liječenja, što podrazumijeva ili radikalnu operaciju primarnog tumora ili primarnu radioterapiju. Rezultati liječenja su komparabilni.

Za neke bolesnike u stadiju II i sve bolesnike u stadijima III i IV neophodan je multimodalitetni pristup liječenju, što znači radikalna operacija i postoperativna adjuvantna radioterapija.

Kirurško liječenje bolesnika s planocelularnim karcinomom glave i vrata sastoji se od radikalne resekcije tumora, rekonstrukcije nastalog defekta, te odstranjivanja limfnih čvorova na vratu (16).

Radikalna resekcija tumora podrazumijeva odstranjenje tumora do u zdravo, uz patohistološku verifikaciju granice između tumora i zdravog tkiva.

Cilj rekonstrukcije defekta nastalog odstranjenjem tumora je restitucija normalne funkcije.

Bolesniku je potrebno omogućiti nesmetano disanje i gutanje, a ako je moguće i govor.

Odluka o disekciji vrata i odabir vrste disekcije ovise o veličini i lokalizaciji primarnog tumora (T) i statusu limfnih čvorova na vratu (N). Kod N0 statusa vrata selektivna disekcija je indicirana kod svih T3 i T4 tumora, te kod T2 tumora smještenih na mjestima s većom učestalošću metastaziranja. Elektivno liječenje vrata je neophodno ukoliko je rizik postojanja okultnih metastaza veći od 15-20% (19). Kod N+ statusa vrata indicirana je radikalna ili modificirana radikalna disekcija vrata. Obostranu disekciju potrebno je učiniti kod tumora koji prelaze medijalnu liniju, te ukoliko postoje bilateralne metastaze.

Nakon operacije donosi se odluka o postoperativnoj adjuvantnoj radioterapiji, a ovisi o T i N stadiju tumora, intraoperativnom nalazu kirurga i konačnom patohistološkom nalazu.

Bolesnici koji u trenutku postavljanja dijagnoze imaju udaljene metastaze liječe se kemoterapijom. Prema novijim istraživanjima kemoterapija ima mjesto i u adjuvantnom liječenju odabranih bolesnika nakon kirurškog liječenja. U protokolima neoadjuvantne kemoterapije u kombinaciji s radikalnim zračenjem izbjegava se kirurško liječenje, kako bi se smanjio morbiditet koji nastaje nakon radikalne operacije (pokušaj „čuvanja organa“).

1.1.6. Prognostički čimbenici

Prognostički čimbenici, koji se u ovom trenutku uobičajeno koriste u odabiru liječenja, su veličina i lokalizacija primarnog tumora, prisutnost metastaza u regionalnim limfnim čvorovima, te prisutnost udaljenih metastaza.

Važani prediktori ukupnog preživljenja su i opće stanje bolesnika i komorbiditet.

Tumori različitih lokalizacija na sluznici gornjeg respiratornog i probavnog sustava razlikuju se prema:

1. raspodjeli T stadija u trenutku postavljanja dijagnoze;
2. učestalosti metastaziranja u limfne čvorove na vratu;
 - Rizik metastaziranja manji je za tumore usne šupljine i larinksa, veći za tumore orofarinksa, a najveći za tumore hipofarinksa.
3. učestalosti udaljenog metastaziranja;
 - Tumori hipofarinksa najčešće daju udaljene metastaze.
4. udjelu dobro, srednje i slabo diferenciranih tumora.

Stadij bolesti u trenutku postavljanja dijagnoze planocelularnog karcinoma glave i vrata je najvažniji prognostički čimbenik (19). U stadiju bolesti prema klasifikaciji AJCC objedinjeni su veličina tumora, status limfnih čvorova na vratu i prisutnost udaljenih metastaza. Bolesnici koji u trenutku postavljanja dijagnoze nemaju zahvaćene regionalne limfne čvorove, imaju odličnu prognozu. Bolesnici sa zahvaćenim limfnim čvorovima imaju 50% manju vjerojatnost 5-godišnjeg preživljenja u usporedbi s bolesnicima s tumorom ograničenim na primarnu lokalizaciju, bez obzira na primjenjeno liječenje (19). Proizlazi da je zahvaćenost limfnih čvorova na vratu najvažniji prognostički čimbenik planocelularnog karcinoma glave i vrata (5, 19), uz napomenu da veći tumori (viši T stadij) imaju veću učestalost zahvaćenih limfnih čvorova. Za tumore usne šupljine i larinksa postoji direktna korelacija između veličine tumora i postojanja metastaza na vratu, dok je za tumore oro i hipofarinksa odnos veličine tumora i postojanja metastaza na vratu vrlo varijabilan (14).

Čimbenici povezani s metastatski zahvaćenim limfnim čvorovima na vratu koji utječu na prognozu su (19):

1. veličina metastatskog limfnog čvora;
2. broj zahvaćenih limfnih čvorova;
3. lokalizacija zahvaćenih limfnih čvorova.

Prediktori loše prognoze su (19):

1. pozitivni limfni čvorovi u skupini IV;

2. proboj kapsule limfnog čvora s invazijom okolnog tkiva;
3. perineuralno i perivaskularno širenje tumora;
4. prisutnost tumorskih embolusa u regionalnim limfnim žilama.

Histološki stupanj diferenciranosti ima ograničenu vrijednost u predviđanju tijeka bolesti (11). Dobro diferencirani tumori imaju bolju prognozu od slabo diferenciranih. Slabo diferencirani tumori češće metastaziraju u regionalne limfne čvorove od dobro diferenciranih tumora.

Od patohistoloških parametara prognostički čimbenici su (12):

1. dubina invazije, osobito kod tumora usne šupljine,
2. odnos granice tumora prema zdravom tkivu:
 - tumor gura zdravo tkivo – bolja prognoza
 - tumor infiltrira zdravo tkivo u obliku tračaka i otočića tumorskog tkiva unutar zdravog – loša prognoza
3. tumor na resekcijskom rubu – neradikalna operacija, visoki rizik recidiva
4. perivaskularna ili perineuralna invazija – loša prognoza
5. ekstrakapsularno širenje tumora u metastaskom limfnom čvoru – loša prognoza

Razvoj molekularne onkologije i sve veće mogućnosti detektiranja promijenjene izraženosti gena u stanicama karcinoma otvorili su put istraživanju utjecaja pojedinih gena i njihovih produkata na prognozu bolesti.

Pojačana izraženost ili amplifikacija nekoliko onkogenih (c-myc, receptor epidermalnog faktora rasta - EGFR, ciklin D1) povezana je s lošijom prognozom (5).

U radu Takesa i sur. (20) analizirana je povezanost nekoliko obilježja primarnog karcinoma larinksa s pojavom metastaza na vratu, a u analizu je uključen 31 karcinom larinksa. S pojavljivanjem metastaza povezani su prisutnost upalne reakcije oko tumora, prisutnost infiltracije eozinofila, pozitivna imunohistokemijska izraženost tumor supresor gena za retinoblastom (Rb), negativna imunohistokemijska izraženost gena za epitelnu molekulu stanične adhezije (Ep-CAM) i amplifikacija gena za ciklin D1 i gena EMS1. U ovom radu ostala analizirana obilježja (proliferacijski antigen jezgre (PCNA), p53, myc, bcl-2 (inhibitor apoptoze), epidermalni faktor rasta - EGF, EGFR, neu, nm23, desmoplakin, neuronska adhezijska molekula stanice (N-CAM) i E-kadherin) nisu pokazali povezanost s pojavljivanjem metastaza na vratu. U drugom radu istih autora (21) uspoređena je izraženost nekih genetskih obilježja primarnog planocelularnog karcinoma glave i vrata s genetskim obilježjima tumorskih stanica u metastazama u limfnim čvorovima, u analizu su uključena 54 bolesnika s planocelularnim karcinomom glave i vrata s pozitivnim metastatskim limfnim

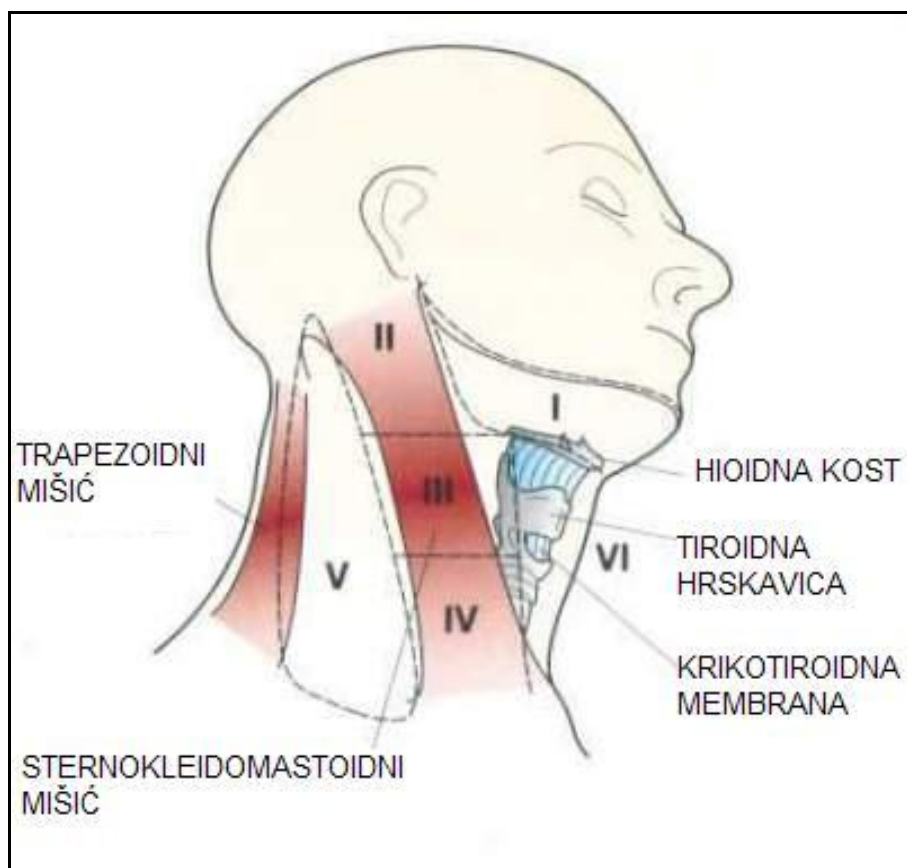
čvorovima na vratu. Rezultati pokazuju smanjenu izraženost nm23 i Ep-CAM molekula u metastazama u odnosu na izraženost u primarnom tumoru. Ostala analizirana obilježja (p53, Rb, Ciklin D1, myc, bcl-2, EGFR, neu i E-kadherin) pokazuju sličnu izraženost u primarnim tumorima i metastazama u limfnim čvorovima na vratu.

U radu China i sur. (4) neovisni prognostički prediktor loše prognoze je izraženost SPARC/osteonektina.

1.2. REGIONALNI LIMFNI ČVOROVI

U limfne čvorove na vratu sakuplja se limfa iz područja gornjeg respiratornog i probavnog sustava. Svaki dio sluznice drenira se u određene skupine limfnih čvorova. Širenje tumora u regionalne limfne čvorove najčešće je predvidljivo i postupno, od najbližih limfnih čvorova prema udaljenijima (14). S obzirom na poznati način širenja tumora postojala je potreba klasifikacije limfnih čvorova na vratu, radi lakše komunikacije i lakšeg planiranja liječenja.

Klasifikacija limfnih čvorova na vratu nastala je u Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (slika 3). Prvi prijedlog navedene klasifikacije objavljen je 1981 (22). Klasifikacija je široko prihvaćena i primjenjuje se u većini centara koji se bave liječenjem tumora glave i vrata. Opisan je dio klasifikacije koji se odnosi na planocelularne karcinome sluznice gornjeg respiratornog i probavnog sustava.



Slika 3. Klasifikacija limfnih čvorova na vratu prema Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (prilagođeno iz ref.19).

Limfni čvorovi lateralnog dijela vrata podijeljeni su u 5 skupina.

Skupina I: Submentalni i submandibularni limfni čvorovi.

Submentalni limfni čvorovi nalaze se između prednjih trbuha digastričnih mišića i hioidne kosti, dok se submandibularni nalaze u trokutu omeđenom prednjim i stražnjim trbuhom digastričnog mišića i donjim rubom mandibule.

Skupina II: Gornji jugularni čvorovi.

Gornji jugularni čvorovi nalaze se oko unutarnje jugularne vene od baze lubanje do visine hioidne kosti, ispred lateralnog ruba sternokleidomastoidnog mišića, a iza lateralnog ruba stražnjeg trbuha digastričnog mišića.

Skupina III: Srednji jugularni čvorovi.

Srednji jugularni čvorovi nalaze se oko unutarnje jugularne vene od visine hioidne kosti do omohoidnog mišića ili do visine donjeg ruba krikoidne hrskavice, straga do lateralnog ruba sternokleidomastoidnog mišića, a naprijed do lateralnog ruba sternohoidnog mišića.

Skupina IV: Donji jugularni čvorovi.

Donji jugularni čvorovi nalaze se oko unutarnje jugularne vene od visine omohoidnog mišića ili od visine donjeg ruba krikoidne hrskavice do klavikule, straga do lateralnog ruba sternokleidomastoidnog mišića, a naprijed do lateralnog ruba sternohoidnog mišića.

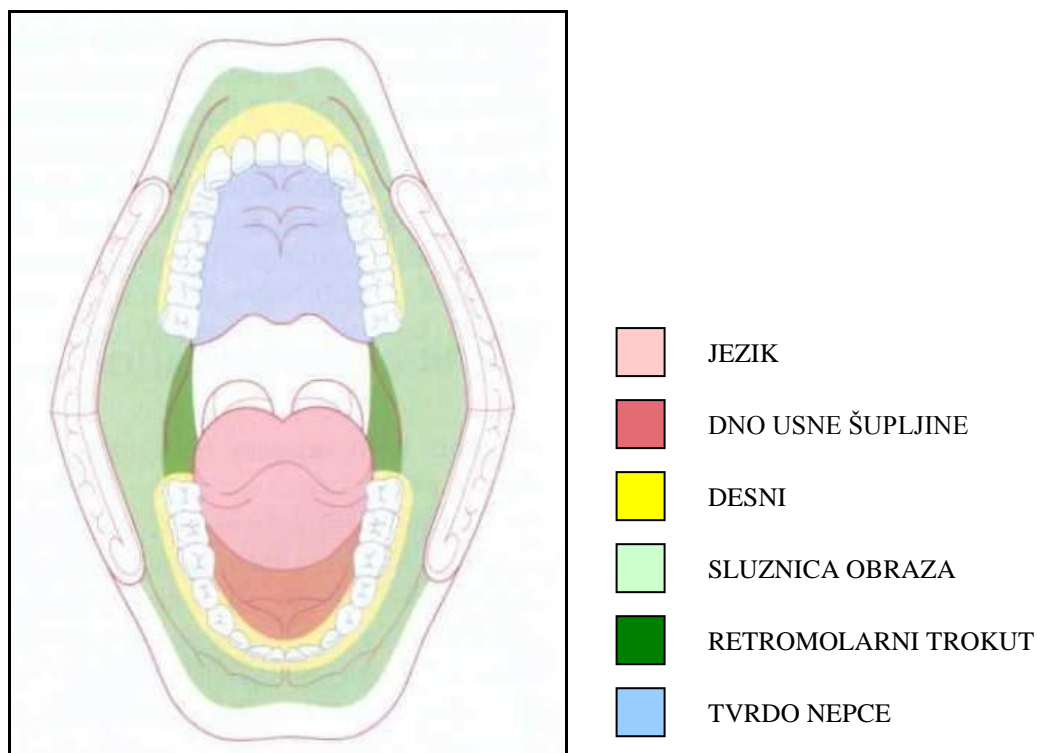
Skupina V: Stražnji trokut vrata.

Skupina čvorova u stražnjem trokutu vrata, nalazi se između stražnjeg ruba sternokleidomastoidnog mišića, prednjeg ruba trapezoidnog mišića i klavikule.

1.3. POSEBNOSTI PLANOCELULARNOG KARCINOMA GLAVE I VRATA OVISNE O LOKALIZACIJI

1.3.1. Usna šupljina

Usna šupljina je dio gornjeg probavnog sustava koji se proteže od usana do prednjeg nepčanog luka. Moguće lokalizacije primarnog tumora unutar usne šupljine su sluznica obraza, gornji i donji alveolarni greben (desni), dno usne šupljine, retromolarni trokut, tvrdo nepce i prednje 2/3 jezika (slika 4).



Slika 4. Lokalizacije tumora u usnoj šupljini (prilagođeno iz ref.19).

Dobno standardizirana incidencija (svjetska populacija) karcinoma usne šupljine kreće se između 1 (Kina) i 8 (Francuska) na 100.000 muškaraca (23). Prema podacima Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo u 2006. godini u Hrvatskoj su registrirana 164 novootkrivena bolesnika s karcinomom usne šupljine (prema MKB obuhvaća šifre: C02, C03, C04 i C06), incidencija 3.6/100 000 stanovnika (10). Većina bolesnika su muškarci, sa rastućim udjelom žena u pojedinim lokalizacijama tumora (19). Najčešće zastupljene lokalizacije unutar usne šupljine su jezik i dno usne šupljine.

Veličina primarnog tumora (T) klasificira se prema TNM klasifikaciji (16).

Primarni tumor (T)

T1 tumor veličine do 2 cm

T2 tumor veličine od 2 do 4 cm

T3 tumor veći od 4 cm

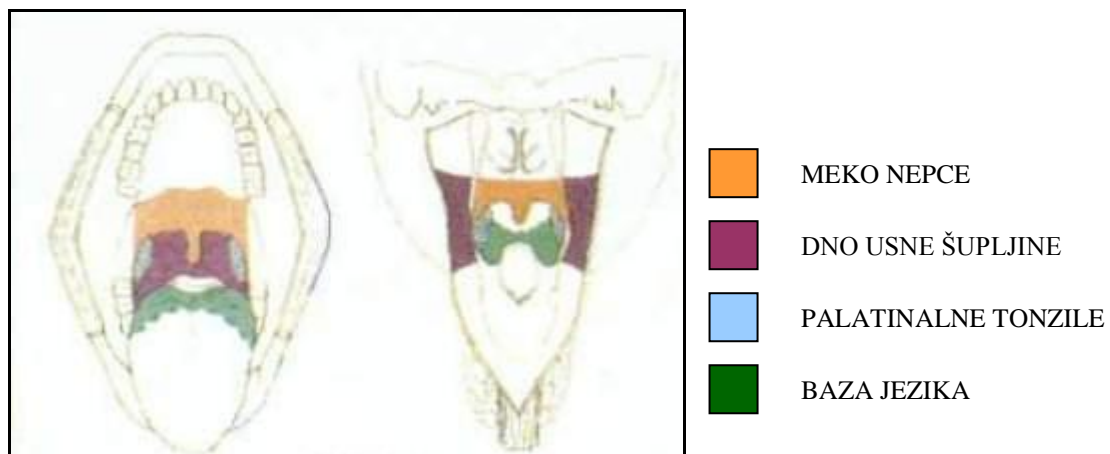
T4 tumor infiltrira okolne strukture (kortikalna kost, duboki mišići jezika /genioglosus, hioglosus, palatoglosus i stiloglosus/, maksilarni sinus, koža lica, mastikatorni prostor, pterigoidni nastavci, lubanjska baza ili karotidna arterija).

Tumori usne šupljine veličine T1 i T2 rijetko metastaziraju u limfne čvorove na vratu. T3 i T4 tumori često metastaziraju, pa je i u slučaju klinički negativnog vrata neophodno planirati i liječenje vrata. Limfnu drenažu usne šupljine čine čvorovi skupina I-III, i to su prvi čvorovi u kojima se pojavljuju metastaze tumora usne šupljine. Metastaze u skupinama IV i V, bez postojanja metastaza u skupinama I-III izuzetno su rijetke (19). Iznimno su opisane izolirane metastaze samo u skupini IV kod karcinoma srednje trećine mobilnog dijela jezika (19). Kod tumora usne šupljine metastaze se pojavljuju rijetko kod tumora tvrdog nepca, a često kod tumora dna usne šupljine.

Prema podacima Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC) u trenutku postavljanja dijagnoze 37% bolesnika je u stadiju I, 36% u stadiju II, 18% u stadiju III, a 9% u stadiju IV (19). Najvažniji prognostički čimbenik karcinoma usne šupljine je stadij bolesti u trenutku postavljanja dijagnoze. Stope izliječenja ovisno o stadijima su 75-95% u stadiju I, 65-85% u stadiju II, 45-65% u stadiju III i 10-35% u stadiju IV (19).

1.3.2. Orofarinks

Orofarinks se proteže od prednjeg nepčanog luka prema straga, do hipofarinksa. Orofarinks ili mezofarinks dijelimo na nekoliko podjedinica (16): 1. baza jezika (uključujući faringoepiglotski i glosopiglotski nabor); 2. tonzilarna regija (tonzilarna udubina i prednji i stražnji tonzilarni nabor); 3. meko nepce i uvula; 4. faringealni zidovi (lateralni i stražnji; gore do visine mekog nepca, a dolje do visine hioidne kosti), (slika 5).



Slika 5. Anatomija orofarinksa (prilagođeno iz ref.19).

Dobno standardizirana incidencija (svjetska populacija) karcinoma orofarinksa kreće se od 0,5 (Kina) do 10,5 (Francuska) na 100.000 muškaraca (23). Prema podacima Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo u 2006. godini u Hrvatskoj je registrirano 191 novootkrivenih bolesnika s karcinomom orofarinksa (prema MKB obuhvaća šifre: C01, C05, C09 i C10), incidencija 4.3/100 000 stanovnika (10). Najčešće zastupljene lokalizacije su baza jezika i meko nepce.

Veličina primarnog tumora (T) klasificira se prema TNM klasifikaciji (17).

Primarni tumor (T)

T1 tumor veličine do 2 cm

T2 tumor veličine od 2 do 4 cm

T3 tumor veći od 4 cm

T4 tumor infiltrira okolne strukture (larinks, duboki mišići jezika /genioglosus, hioglosus, palatoglosus i stiloglosus/, medijalni pterigoidni mišić, tvrdo nepce, mandibula, lateralni pterigoidni mišić, pterigoidni nastavci, lateralni epifarinks, lubanjska baza, prevertebralna fascija ili karotidna arterija).

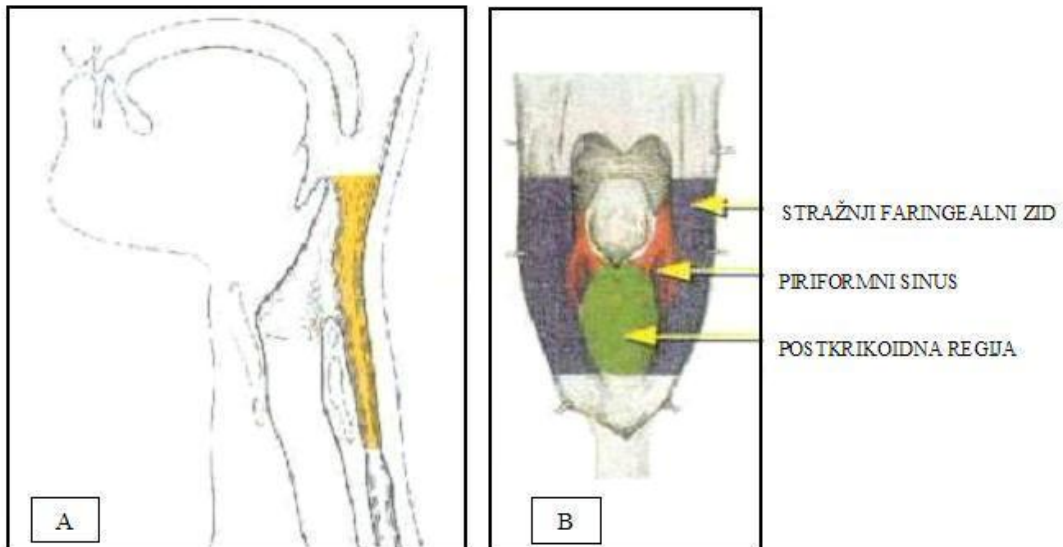
Tumori orofarinksa metastaziraju često. Pojavljivanje metastaza ne pokazuje jasnu korelaciju s veličinom tumora (19). Metastaze se pojavljuju prvo u skupini II, te potom u skupinama III i IV. Metastaze u limfne čvorove skupina I i V bez metastaza u limfnim čvorovima skupina II, III i IV iznimno su rijetke (19). Moguće je pojavljivanje metastaza u retrofaringealnim limfnim čvorovima (14). Tumori smješteni blizu medijalne linije ili tumori koji prelaze medijalnu liniju mogu imati obostrane metastaze (14, 19).

Karcinomi smješteni u području baze jezika i tonzile u patohistološkoj slici češće su slabo diferencirani (24).

Prema podacima Memorial Sloan-Kettering Cancer Center u trenutku postavljanja dijagnoze 34% bolesnika je u stadiju I, 31% u stadiju II, 25% u stadiju III, a 10% u stadiju IV (19). Stope izliječenja ovisno o stadijima i lokalizaciji su 55-85% u stadiju I, 50-80% u stadiju II, 10-60% u stadiju III i 10-55% u stadiju IV (19). Tumori baze jezika i tonzile imaju bolju prognozu od tumora mekog nepca i faringealnih zidova.

1.3.3. Hipofarinks

Hipofarinks je najdonji dio farinksa, proteže se od visine vrška epiglotisa do donjeg ruba krikoidne hrskavice (slika 6). Sastoji se od: piriformnih sinusa, stražnjeg faringealnog zida i postkrikoidne regije. Najčešće sijelo planocelularnih karcinoma je u piriformnim sinusima.



Slika 6. Anatomija hipofarinksa: A. područje hipofarinksa; B. anatomske podjedinice (prilagođeno iz ref.19).

Dobno standardizirana incidencija (svjetska populacija) karcinoma hipofarinksa kreće se od 0,1 (Kina) do 10 (Francuska) na 100.000 muškaraca (23). Prema podacima Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo u 2006. godini u Hrvatskoj je registrirano 121 novootkrivenih bolesnika s karcinomom hipofarinksa (prema MKB obuhvaća šifre: C12 i C13), incidencija 2.7/100 000 stanovnika (10).

Veličina primarnog tumora (T) klasificira se prema TNM klasifikaciji (17).

Primarni tumor (T)

T1 tumor ograničen na jednu podjedinicu hipofarinksa i veličine do 2 cm

T2 tumor zahvaća više od jedne podjedinice hipofarinksa ili strukturu u neposrednoj blizini, ili veličine od 2 do 4 cm, bez fiksacije hemilarinksa

T3 tumor veći od 4 cm ili tumor koji fiksira hemilarinks

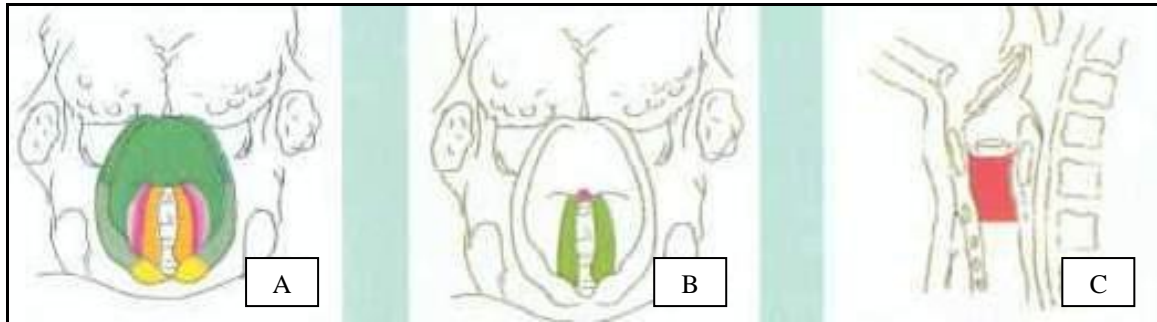
T4 tumor infiltrira okolne strukture (tiroidna/krikoidna hrskavica, hioidna kost, štitna žlijezda, jednjak, meka tkiva centralnog dijela vrata, prevertebralna fascija, karotidna arterija ili medijastinalne strukture).

Zbog anatomske lokalizacije mali tumori hipofarinksa rijetko izazivaju simptome i rijetko se dijagnosticiraju, a većina simptomatskih tumora uznapredovalog je T stadija. Hipofarinks ima bogatu limfnu mrežu i metastaze u regionalne limfne čvorove su česte i javljaju se brzo nakon početka bolesti. Tumori hipofarinksa prvo metastaziraju u limfne čvorove skupina II i III (14), te IV (19). Rizik pojavljivanja metastaza u limfnim čvorovima skupina I i V uz negativne čvorove u skupinama II-IV je zanemariv (14, 19). Tumori koji prelaze medijalnu liniju, kao i tumori medijalnog zida piriformnog sinusa češće daju i metastaze u limfnim čvorovima kontralateralne strane vrata (19). U trenutku postavljanja dijagnoze 11% bolesnika je u stadiju I, 11% u stadiju II, 36% u stadiju III i 42% u stadiju IV (19). Pozitivne regionalne limfne čvorove ima 66% bolesnika s primarnim karcinomom hipofarinksa, od preostalih 34% bolesnika s klinički N0 stadijem ukoliko se učini elektivna disekcija kod 41% naći će se okultne metastaze, ukoliko se ne učini elektivna disekcija kod 25% pojaviti će se regionalne metastaze tijekom praćenja (19).

Ukupno 5-godišnje preživljenje je od 28 do 40%, a 5-godišnje preživljenje bez znakova bolesti je 42-50% (19). Prema stadijima bolesti 5-godišnje preživljenje bez znakova bolesti je 68% za stadij I, 52% za stadij II, 50% za stadij III, te 20% za stadij IV (19). Od bolesnika liječenih u Memorial Sloan-Kettering Cancer Center u 58% razvija se recidiv bolesti, a podjednako su zastupljeni lokalni i regionalni recidivi, kao i diseminacija bolesti (19).

1.3.4. Larinks

Normalna funkcija larinksa omogućava disanje i gutanje, te nastanak govora. Svaki poremećaj anatomskih odnosa ili funkcionalni nedostatak u području larinksa može poremetiti sve tri funkcije: disanje, gutanje i govor. Larinks se proteže od vrha epiglotisa do donjeg ruba krikoida (slika 7). Larinks dijelimo u 3 podjedinice: supraglotis, glotis i subglotis.



■	EPIGLOTIS	■	GLASNICA
■	ARIEPIGLOTSKI NABOR	■	PREDNJA KOMISURA
■	ARITENOID		
■	VENTRIKULARNI NABOR		
■	VENTRIKUL		
■	GLASNICA		

Slika 7. Anatomija larinksa: A. supraglotis; B. glotis; C. subglotis (prilagođeno iz ref. 19).

Dobno standardizirana incidencija (svjetska populacija) karcinoma larinksa kreće se između 2 (Japan) i 8 (Španjolska) na 100.000 stanovnika (23). Prema podacima Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo u 2003. godini u Hrvatskoj je registrirano 399 novootkrivenih bolesnika s karcinomom larinksa (prema MKB šifra C32), incidencija 9.0/100 000 stanovnika (10).

Karcinom larinksa javlja se najčešće u području supraglotisa ili glotisa, dok je u području subglotisa izrazito rijedak. Postoje zemljopisne razlike incidencije supraglotičkog i glotičkog karcinoma larinksa. Za karcinom glotisa pušenje kao samostalni etiološki čimbenik je značajnije nego kod ostalih lokalizacija planocelularnog karcinoma u području glave i vrata. Kod bolesnika s karcinomom supraglotisa u etiologiji su obično prisutni i pušenje i povećana konzumacija alkohola, kao i u ostalim lokalizacijama.

Veličina primarnog tumora (T) klasificira se prema TNM klasifikaciji (17).

Primarni tumor (T)

Supraglotis

T1 tumor ograničen na jednu podjedinicu supraglotisa uz normalnu mobilnost glasnice

T2 tumor zahvaća sluznicu više od jedne podjedinice supraglotisa ili glotisa ili regije u neposrednoj blizini (sluznica baze jezika, velekule, medijalnog zida piriformnog sinusa) bez fiksacije hemilarinksa

T3 tumor ograničen na larinks s fiksacijom hemilarinksa i/ili infiltracijom postkrikoidne regije, preepiglotskog ili paraglotskog prostora, i/ili s manjom erozijom tiroidne hrskavice (npr. unutarnji korteks)

T4 tumor prolazi kroz tiroidnu hrskavicu, i/ili infiltrira okolne strukture (traheja, meka tkiva vrata uključujući duboke mišiće jezika /genioglosus, hioglosus, palatoglosus i stiloglosus/, infrahioidna muskulatura, štitna žlijezda, jednjak, prevertebralni prostor ili karotidna arterija)

Glottis

T1 tumor ograničen na jednu glasnicu (može zahvaćati prednju ili stražnju komisuru) uz normalnu mobilnost glasnice

T2 tumor se širi na supraglotis i/ili subglottis, i/ili prisutna poremećena mobilnost glasnice

T3 tumor ograničen na larinks s fiksacijom hemilarinksa i/ili infiltracijom paraglotskog prostora, i/ili s manjom erozijom tiroidne hrskavice (npr. unutarnji korteks)

T4 tumor prolazi kroz tiroidnu hrskavicu, ili infiltrira okolne strukture (traheja, meka tkiva vrata uključujući duboke mišiće jezika /genioglosus, hioglosus, palatoglosus i stiloglosus/, infrahioidna muskulatura, štitna žlijezda, jednjak, prevertebralni prostor, medijastinalne strukture ili karotidna arterija)

Subglottis

T1 tumor ograničen na subglottis

T2 tumor se širi na jednu ili obje glasnice uz normalnu ili poremećenu mobilnost glasnice

T3 tumor ograničen na larinks s fiksacijom glasnice

T4 tumor prolazi kroz krikoidnu ili tiroidnu hrskavicu, i/ili infiltrira okolne strukture (traheja, meka tkiva vrata uključujući duboke mišiće jezika /genioglosus, hioglosus, palatoglosus i stiloglosus/, infrahioidna muskulatura, štitna žlijezda, jednjak, prevertebralni prostor, medijastinalne strukture ili karotidna arterija)

Kod tumora larinksa metastaze se pojavljuju rijetko kod tumora glotisa, a češće kod tumora supraglotisa i subglotisa. Prvi zahvaćeni limfni čvorovi pripadaju skupinama II-IV (14, 19). Metastaze u limfnim čvorovima skupina I i V uz negativne čvorove u skupina II-IV iznimno su rijetke (19). Tumori koji prelaze medijalnu liniju, najčešće tumori supraglotisa mogu stvarati i metastaze na kontralateralnoj strani vrata (19).

Prema podacima Memorial Sloan-Kettering Cancer Center u trenutku postavljanja dijagnoze supraglotičkog karcinoma larinksa 9% bolesnika je u stadiju I, 21% u stadiju II, 34% u stadiju III, a 36% u stadiju IV, kod glotičkog karcinoma larinksa 53% bolesnika je u

stadiju I, 22% u stadiju II, 23% u stadiju III, a 2% u stadiju IV (19). Ukupno 5-godišnje preživljenje je 51% za supraglotičke tumore, 81% za glotičke tumore i 77% za subglotičke tumore (19). Prema stadijima bolesti 5-godišnje preživljenje bez znakova bolesti je za supraglotičke tumore 84% za stadij I, 83% za stadij II, 73% za stadij III, te 44% za stadij IV, a za glotičke 90% za stadij I, 85% za stadij II, 75% za stadij III, te 45% za stadij IV (19).

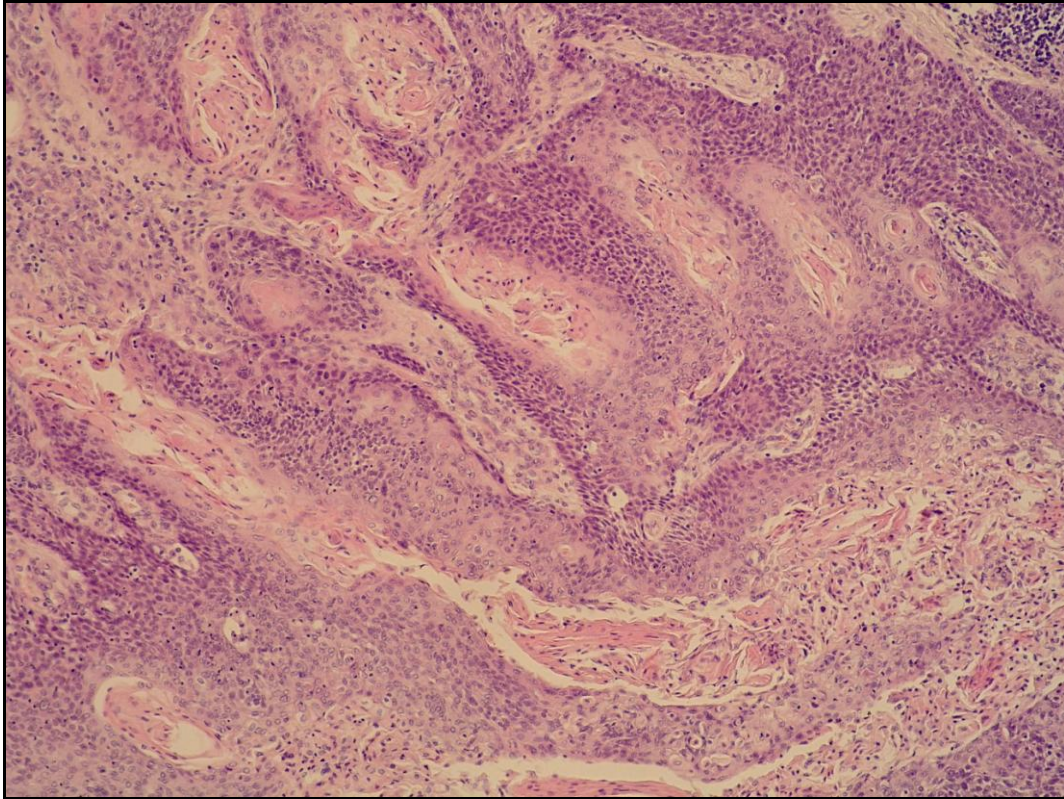
1.4. PTOHISTOLOŠKA SLIKA PLANOCELULARNOG KARCINOMA

Gornji respiratorni i probavni sustav prekriven je sluznicom, koja je najvećim dijelom građena od mnogoslojnog pločastog epitela, samo dijelovi sluznice larinksa građeni su od višerednog cilindričnog epitela. Planocelularni karcinom nastaje iz mnogoslojnog pločastog epitela ili iz cilindričnog epitela nakon pločaste metaplazije.

Karakteristike planocelularnog karcinoma su pločasta diferencijacija tumorskih stanica i invazivni rast. Pločasta diferencijacija očituje se keratinizacijom uz različitu učestalost formiranja „perli“. Keratinske perle su kuglasto oblikovani dezmosomski dodaci i intracitoplazmatski snopovi keratinskih tonofilamenata. Invazivni rast očituje se probijanjem bazalne membrane i infiltracijom podležeceg tkiva, te infiltracijom krvnih žila i živaca (9). Planocelularni karcinomi mogu biti i nekeratinizirajući, ali i tada proizvode najčešće prepoznatljivu količinu unutarstaničnog ili izvanstaničnog keratina (11). Tumori se mogu podijeliti u dobro, srednje i slabo diferencirane.

Gradus I

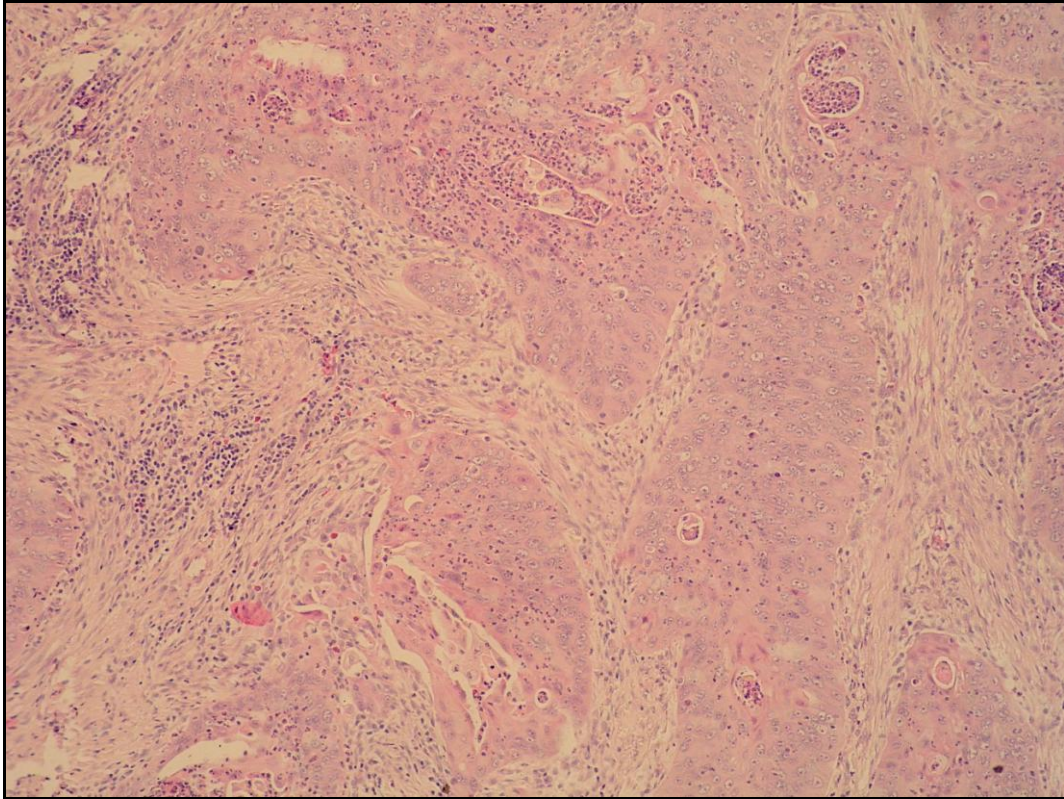
Dobro diferencirani planocelularni karcinom sličan je normalnom pločastom epitelu (slika 8). Ove tumore karakterizira obilna keratinizacija, rijetke mitoze i rijedak polimorfizam jezgara.



Slika 8. Planocelularni karcinom gradus I (HE, 100x).

Gradus II

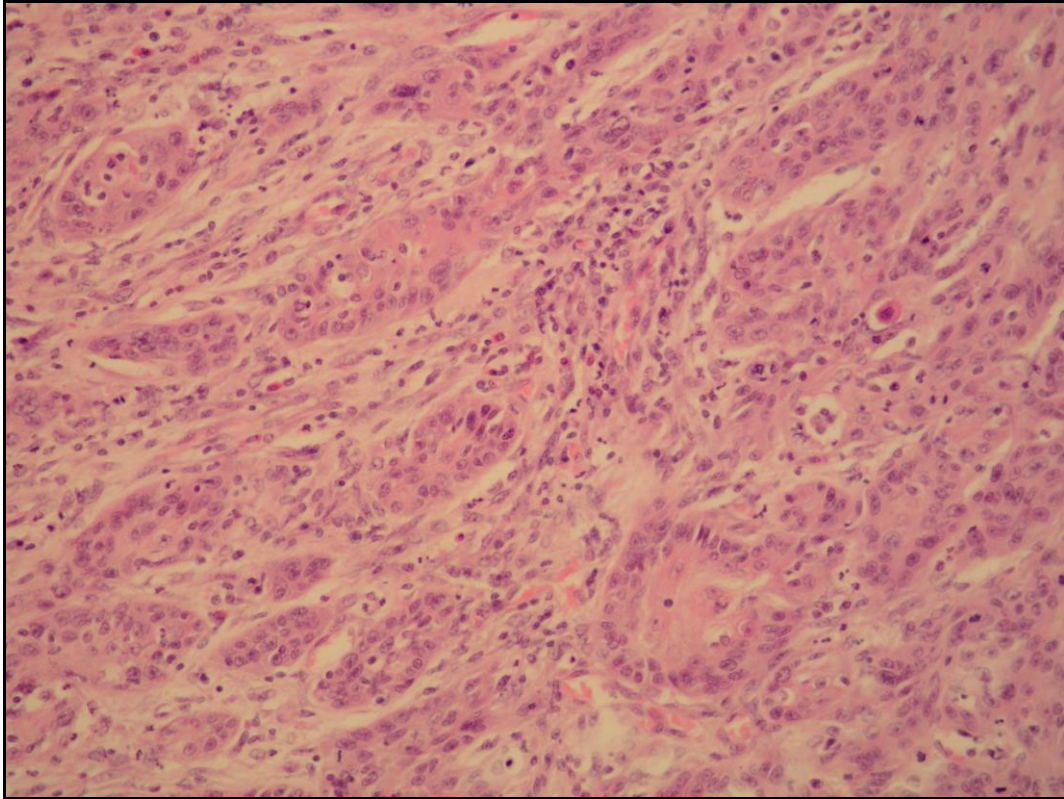
Srednje diferencirani planocelularni karcinom ima jasan pleomorfizam jezgara i vidljive mitoze, uključujući i abnormalne mitoze, obično ima manje izraženu keratinizaciju (slika 9).



Slika 9. Planocelularni karcinom gradus II (HE, 100x).

Gradus III

Slabo diferencirani planocelularni karcinom sastoji se od nezrelih stanica, s brojnim tipičnim i atipičnim mitozama i minimalnom keratinizacijom (slika 10).



Slika 10. Planocelularni karcinom gradus III (HE, 200x).

Sluznica u neposrednoj blizini planocelularnog karcinoma često pokazuje premaligne promjene, vjerojatno uzrokovane istim karcinogenima (15, 25). U tako promijenjenoj sluznici moguće je dokazati genetske promjene stanica, a predstavlja rizično mjesto za nastanak drugog primarnog tumora (25).

1.5. GENETSKE PROMJENE U PLANOCELULARNOM KARCINOMU GLAVE I VRATA

Za homeostazu stanice ključna je sposobnost metaboliziranja karcinogena i prokarcinogena, popravak oštećenja DNA, te kontrola staničnog signaliranja i staničnog ciklusa (2). Planocelularni karcinom nastaje kao posljedica brojnih molekularnih promjena induciranih čimbenicima okoline (pušenje, konzumacija alkohola i drugi), ponekad virusima uz genetsku predispoziciju (1, 2).

Genetska predispozicija očituje se kroz nemogućnost metaboliziranja karcinogena ili prokarcinogena, te neučinkovitost sustava popravka oštećenja DNA (1, 2, 8).

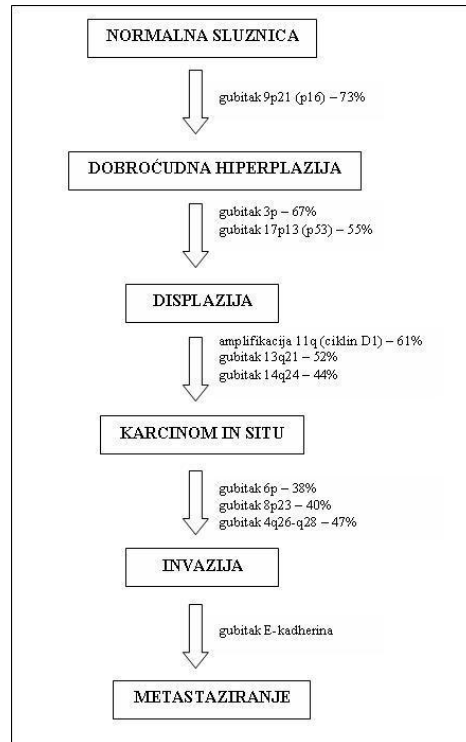
Enzim glutation-S-transferaza sudjeluje u metaboliziranju karcinogena iz duhana. Neki od mogućih oblika tog enzima povezani su sa povećanim rizikom nastanka planocelularnog karcinoma glave i vrata (6, 14).

U planocelularnom karcinomu glave i vrata često je prisutna nestabilnost genoma, česte su citogenetske aberacije, neravnoteža alela/gubitak heterozigotnosti (LOH) i nestabilnost mikrosatelita što govori u prilog neadekvatnog sustava popravka DNA kod bolesnika (1, 13). Nestabilnost genoma sa progresivnom akumulacijom genetskih promjena ovisi o zatvorenom krugu interakcija između čimbenika oštećenja iz okoliša i mehanizma popravka DNA (1). Učinkovitost sustava popravka DNA ovisi o primjerenj kontrolni staničnog ciklusa i kapacitetu popravka DNA (1). Važni čimbenici u kontrolni staničnog ciklusa su inaktivacija p53 ili p16 tumor supresor gena ili amplifikacija protoonkogeni ciklin D1 (1).

Najčešće citogenetske abnormalnosti u planocelularnom karcinomu glave i vrata su neuravnotežene translokacije koje dovode do gubitka kromosoma: 3p13-q24 (>60% tumora), 4p (43% tumora), 5q12-q23 (30% tumora), 8p22-p23 (65% tumora), 9p21-p24 (p16, 43% tumora), 10p (39% tumora), 13q12-q24 (30% tumora), 18q22-23 (>60% tumora) i 21q (52% tumora), (14). Također gubitak inaktivnog X kromosoma i gubitak ili promjene Y kromosoma prisutni su u više od 70% tumora (14). Gubitak alela uz inaktivaciju tumor supresor gena pojavljuje se na 3p, 5q, 9p (p16), 9q, 11q (ciklin D1, EMS1), 13q, 17p (p53) i 18q (5, 14).

Smatra se da većina sporadičnih solidnih tumora nastaje kao posljedica nakupljanja niza genetskih promjena. Potrebno je 10-tak i više takvih genetskih promjena da bi stanica razvila maligni potencijal. Predložen je model progresije genetskih promjena (nakon izlaganja karcinogenima) od normalne sluznice, preko dobroćudnih promjena do planocelularnog karcinoma glave i vrata prema kojem se gubitak heterozigotnosti (LOH) analiziranih alela odvija određenim slijedom (slika 11). Rani događaji su gubitak heterozigotnosti na 3p, 9p21

(p16) i 17p13 (p53), potom na 11q (ciklin D1), 13q11 i 14q, a kasni su gubitak heterozigotnosti na 6p, 4q i 8 (5, 25, 26). Akumulacija navedenih genetskih promjena povezana je s histopatološkom progresijom (5, 25, 26).



Slika 11. Progresija genetskih promjena u nastanku planocelularnog karcinoma (prema ref. 5 i 25)

Na molekularnoj razini u planocelularnim karcinomima glave i vrata dolazi do aktivacije onkogeni i inaktivacije tumor supresor gena (5).

Onkogeni su promijenjeni regulatorni geni koji kontroliraju rast. Primjećena je amplifikacija ili pojačana izraženost onkogeni kao što su ras, myc, EGFR i ciklin D1 (5, 13). U karcinomima usne šupljine u Indiji u 35% tumora opisana je mutacija H-ras onkogeni (5, 13). Pojačana izraženost c-myc opisana je u 9-48% planocelularnih karcinoma glave i vrata (5,13), te se povezuje s lošijom prognozom. Pojačana izraženost gena za receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR) prisutna je u 67% tumora, uz progresivno povećanje izraženosti u normalnom epitelu, premalignim lezijama i planocelularnom karcinomu (13, 14, 27, 28), također se povezuje s lošijom prognozom (5, 27, 28). Amplifikacija ili pojačana izraženost gena koji kodira ciklin D1 primjećena je u 20-64% planocelularnih karcinoma glave i vrata, povezana je s lošijom prognozom (28). Ciklin D1 je jedan od proteina koji

kontroliraju prelazak stanice iz G1 u S fazu, povećana količina ciklina D1 dovodi do nekontroliranog dijeljenja (5, 13, 14).

Mutacije ili delecije često dovode do inaktivacije tumor supresor gena kao što su p16 i p53. Produkt gena p16 je inhibitor kompleksa ciklin D-ciklin ovisna kinaza. Inaktivacija p16 nalazi se u 20-80% planocelularnih karcinoma glave i vrata, bez jasne povezanosti s prognozom (5, 13, 14, 28). Gen p53 smatra se čuvarom genoma, jer omogućava apoptozu stanice s oštećenom DNA (6, 28). Poremećaj funkcije produkta p53 dovodi do nestabilnosti genoma (6). Mutacije gena p53 nalaze se u oko 60% planocelularnih karcinoma glave i vrata (5, 14, 28), povezanost s prognozom različita je u različitim studijama.

U planocelularnim karcinomima glave i vrata često je združena amplifikacija ili pojačana izraženost ciklina D1 i gubitak p16 (6).

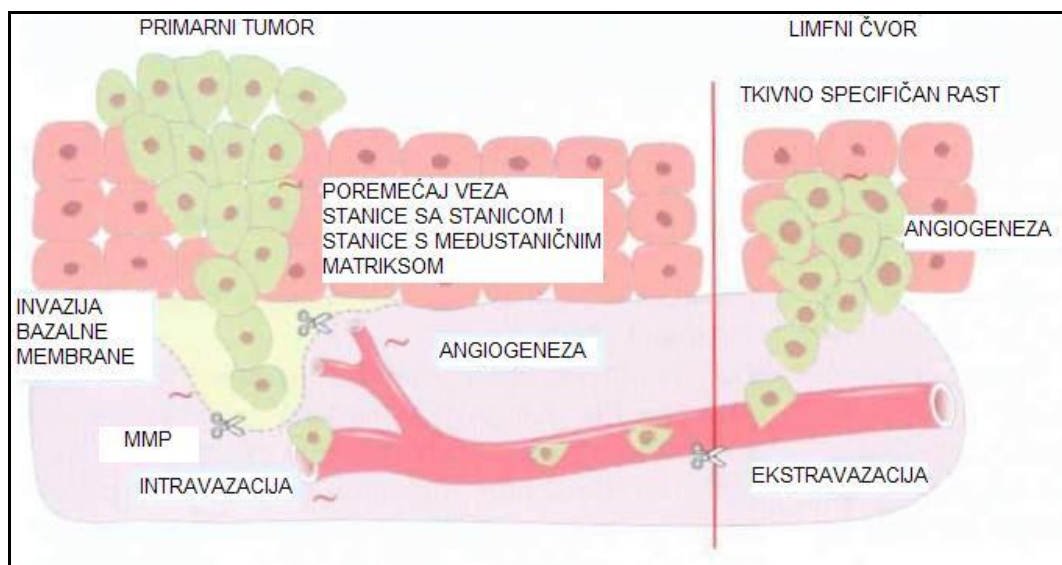
Neke promjene izraženosti gena povezane su s čimbenicima okoline. Mutacije gena p53 povezane su s pušenjem, također delecije ili gubitak alela 9p češći su kod planocelularnog karcinoma pušača (15). Pušenje se povezuje i sa smanjenom ekspresijom nm23 gena (29).

DNA mikročipovi su novija metoda koja omogućava simultanu analizu izraženosti tisuća gena. Analiza promjena izraženosti gena u planocelularnom karcinomu glave i vrata učinjena je i pomoću DNA mikročipova (30, 31), analiza pokazuje promijenjenu izraženost gena koji kodiraju proteine citoskeleta i ekstracelularnog matriksa, medijatore upale, proteine epidermalne diferencijacije i adhezijske molekule stanice (31). Smanjena je izraženost gena koji kodiraju proteine ribosoma i enzime puta biosinteze kolesterola, a pojačana izraženost gena koji kodiraju metaloproteinaze matriksa i gena koji utječu na upalni odgovor (31). Jedan od gena je EMS1, koji kodira protein citoskeleta - kortaktin, pojačana izraženost dovodi do redistribucije kortaktina iz citoplazme u međustanični prostor i pridonosi invazivnosti tumorskih stanica, pojavljuje se u 20% planocelularnih karcinoma glave i vrata i povezana je s lošijim preživljenjem (14).

Konačni cilj istraživanja genetskih promjena u tumorskim stanicama je razvijanje novih dijagnostičkih i terapijskih modaliteta (14, 32). Mogućnosti razvoja dijagnostičkih metoda su (13, 14): identifikacija rizičnih premalignih lezija; razvoj metoda probira; te lokalizacija tumora radioimunoscintigrafskom metodom. Genska terapija je unošenje genetskog materijala u tumorsku ili netumorsku stanicu s terapijskim ciljem (32, 33). Razvijeni su brojni virusni i ne-virusni vektori koji omogućavaju unos terapijskih gena u tumor (32, 33). Učinak unošenja terapijskog gena može biti ispravak postojeće genetske abnormalnosti, ubijanje stanice direktno ili indirektno uništavanje tumora aktivacijom imunološkog sustava (14, 32, 33).

1.6. PATOFIZIOLOGIJA METASTAZIRANJA TUMORA

Jedno od osnovnih obilježja zloćudne stanice je sposobnost metastaziranja. Metastaziranje tumora je složeni proces, koji se sastoji od niza događaja na razini stanice koji dovode do širenja tumorskih stanica sa primarnog mjesta nastanka na druge lokalizacije, gdje nastaju sekundarni tumori (34, 35). Preduvjet za „odlazak“ tumorske stanice iz tumora je poremećaj veza tumorske stanice s međustaničnim matriksom i poremećaj komunikacije između tumorskih stanica (34). Prirodne tkivne prepreke širenju tumora su međustanični matriks i bazalne membrane. Na tumorskim stanicama smanjen je broj kadherina, adhezijskih molekula za prijanjanje uz istovrsne stanice. Tumorske stanice stvaraju manje međusobnih sveza – dezmosoma, te se lako odjeljuju. Integrini su adhezijske molekule koje omogućavaju vezanje uz molekule međustaničnog matriksa (kolagen, fibronektin) i bazalnih membrana (laminin). Povećan broj integrina na tumorskim stanicama olakšava invaziju i intravazaciju zloćudnih stanica. Preduvjet intravazacije je postojanje krvnih žila u tumoru, koje nastaju angiogenezom u tumoru. Metaloproteaze matriksa su enzimi koji razgrađuju proteine međustaničnog matriksa i bazalnih membrana. Zbog navedenih karakteristika (slabije međusobne veze, izlučivanje metaloproteaza, vezanje uz međustanični matriks i bazalne membrane) tumorske stanice mogu metastazirati (35). U planocelularnim karcinomima glave i vrata smanjena je ili promijenjena ekspresija E-cadherina, promijenjena je ekspresija integrina, MET-onkogeni i EGFR receptora, te pojačana ekspresija metaloproteaza i katepsina D (36).



Slika 12. Metastaziranje tumora (iz ref.14).

1.7. GEN nm23

Metastaziranje tumora vodeći je uzrok smrti kod bolesnika s karcinomom (34, 35). Gen nm23 jedan je od gena koji suprimiraju metastatski potencijal tumora (34, 35, 37). Utvrđeno je da je gen nm23 kvantitativno slabije izražen u metastatskim stanicama na razini mRNA i proteina (34). Niska izraženost nm23 povezana je s lošom prognozom, niskim preživljenjem, metastazama u limfne čvorove, kao i histopatološkim indikatorima visokog metastatskog potencijala u nekoliko vrsta karcinoma (karcinom dojke, jajnika i kolona, te melanom), (34, 38). Prema literaturi pojačana izraženost nm23 povezana je s početnim, a smanjena izraženost s uznapredovalim stadijima tumora (35).

Gen nm23 kodira enzime nukleozid difosfat (NDP) kinaze (35).

Biokemijska istraživanja pokazala su da je aktivnost NDP kinaze, koja katalizira transfer nukleozid trifosfata u nukleozid difosfat, očuvana i prisutna u organizmima od bakterija do čovjeka (39). NDP kinaze su različito izražene u različitim tkivima i smještene na različitim lokacijama unutar stanice, što upućuje na različite moguće funkcije u stanici, ovisno o lokalizaciji (39). U normalnim fiziološkim uvjetima NDP kinaze sudjeluju u proliferaciji, razvoju i diferencijaciji (39). NDP kinaze sudjeluju u metabolizmu mitohondrija, osiguravaju energiju za fosforilaciju struktura citosola, te osiguravaju nukleotide za sintezu nukleinskih kiselina (39). U novijim studijama NDP kinaze povezuju se s procesima sinteze DNA i proteina, polimerizacijom mikrotubula, prometom vezikula i prijenosom signala (35).

Do danas je izolirano 8 homologa obitelji nm23/NDP kinaza (35, 39). U humanim karcinomima opsežno su istraživana 2 homologa: nm23-H1 (nm23/NDP kinaza-A) i nm23-H2 (nm23/NDP kinaza-B). U studijama gdje nije specificirana izoforma enzima nm23/NDP kinaza odnosi se ili samo na nm23-H1 ili na oba enzima zajedno (34). Geni za oba enzima nalaze se na kromosomu 17, na lokusu 17q21 (34, 38), NME1 za nm23/NDP kinaza-A i NME2 za nm23/NDP kinaza-B (34). Nomenklatura se kroz literaturu ne koristi uvijek dosljedno: NDP kinaza uvijek označava protein, NME1 i NME2 uvijek označavaju gen, dok se nm23-H1 i nm23-H2 koriste kao ime gena, a protein se naziva produkt nm23 gena.

Gen nm23-H1 otkriven je zbog smanjene izraženosti u staničnoj liniji na mišjem modelu metastatskog melanoma (34, 39), a nm23-H2 otkriven je zbog homologije s nm23-H1 (39).

Molekularni mehanizmi djelovanja produkta gena nm23 u kontroli migracije stanica i metastaziranju nisu u potpunosti razjašnjeni, a ne mogu se objasniti do sada opisanom enzimskom funkcijom prijenosa fosfata (35). Dosadašnja istraživanja pokazala su da aktivnost

NDP kinaze nije povezana s metastaziranjem, kao i da su mutacije gena nm23 rijetke, što ukazuje da nm23 modulira metastatski potencijal razinom izraženosti gena i vjerojatno interakcijom s drugim proteinima (35). Uloga produkta gena nm23 u procesu metastaziranja je višestruka.

Izoformni oblici NDP kinaze sudjeluju u progresiji tumora, diferencijaciji i apoptozi (39). NDP kinaza modulira izraženost gena vezanjem za DNA sa posljedičnim strukturnim promjenama (35, 40). Prema radu Postel (41) nm23/NDP kinaza je multifunkcionalni regulatorni enzim neophodan za ekspresiju gena i obranu stanice od nakupljanja oštećenja DNA. Neki od gena za koje je pokazana regulatorna funkcija NDP kinaza su onkogeni c-myc i ras (35, 40).

NDP kinaze sudjeluju u odgovoru stanice na ekstracelularne podražaje (35).

Produkt gena nm23 sudjeluje u modificiranju organizacije citoskeleta i prometa proteina, indirektno promovirajući adheziju za ekstracelularni matriks u nekim tipovima stanica (37). Produkti gena nm23 mogu se naći povezani s molekulama citoskeleta, kao što su tubulin i vimentin (42). Također regulira izraženost integrinskih receptora na površini stanice i metaloproteaza matriksa, te tako direktno kontrolira adheziju stanica (37). Kompleks nm23-H2/ICAP-1 ima ulogu u integrinskom signaliziranju (37, 42). ICAP-1 (prema engl. integrin cytoplasmic domain – associated protein 1 α) je negativni regulator adhezije stanica posredovane β 1 integrinom, a usmjerava nm23 u lamelipodije i stanične protruzije, te sudjeluje u migraciji i metastaziranju stanica (37, 42).

U radu Fana i suradnika (43) produkt gena nm23-H1 identificiran je kao granzim A-aktivirana DN-aza (Gzm A). Gzm A se oslobađa iz citotoksičnih T limfocita i inducira apoptozu tumorskih stanica ili stanica inficiranih virusima.

Usporedba izraženosti nm23/NDP kinaze u različitim staničnim linijama planocelularnog karcinoma pokazuje smanjenu izraženost nm23/NDP kinaze B u metastatskim stanicama (44). Stanice s pojačanom izraženosti nm23-H1 iz stanične linije CAL 27 imaju smanjen migracijski i invazivni potencijal, te jače adheriraju uz kolagen IV i fibronektin (45). Transfekcija gena nm23-H2 u staničnu liniju humanog planocelularnog oralnog karcinoma (LMF4) smanjuje metastatski potencijal tih stanica (46). Transfekcija gena nm23 u metastatske stanice rezultira inhibicijom rasta metastaza, bez utjecaja na veličinu primarnog tumora (47).

Do sada je opisana izraženost nm23 u planocelularnim karcinomima pojedinih lokalizacija u području glave i vrata. Neki radovi sugeriraju niski metastatski potencijal tumora s visokom izraženosti proteina nm23, dok druga istraživanja ne potvrđuju te rezultate.

Analiza izraženosti nm23 u karcinomima larinksa, farinksa i usne šupljine ne pokazuje razliku između pojedinih lokalizacija planocelularnog karcinoma glave i vrata (48).

Prema studiji Pavelića i suradnika (49) provedenoj na uzorku od 120 planocelularnih karcinoma glave i vrata izraženost nm23-H1 veća je u tumorima uznapredovalog (stadij 3 i 4) nego početnog stadija (stadij 1 i 2).

U radu McDonalda i suradnika (50) povećana izraženost nm23-H1 proteina povezana je s većim tumorima i lošijim ukupnim preživljenjem; analiza je učinjena imunohistokemijskom metodom na 47 bolesnika s planocelularnim karcinomom glave i vrata.

Prema studiji Songa i suradnika (51) provedenoj na 70 planocelularnih karcinoma glave i vrata, analizirana je izraženost proteina nm23-H1 kod N0 i N+ tumora. N0 tumori u 56% slučajeva imali su visoku izraženost nm23-H1 proteina, dok je 88% N+ tumora imalo nisku izraženost. Unatoč ovoj jasnoj razlici u učestalosti, prema Kaplan-Meierovoj krivulji nije bilo razlike u preživljenju između nm23 pozitivnih i negativnih tumora.

Analiza izraženosti nm23 u primarnim tumorima i u metastatskim limfnim čvorovima na vratu pokazuje smanjenu izraženost nm23 u metastazama nego u primarnom tumoru, sugerirajući važnost izraženosti nm23 u procesu metastaziranja (21).

U istraživanju Mhaweč-Fauceglia i suradnika (52) analizirana je izraženost nm23-H1 na uzorku od 120 planocelularnih karcinoma glave i vrata. Kod 60 tumora postojala je visoka izraženost, dok je kod 53 izraženost bila smanjena, nije nađena korelacija s analiziranim kliničkim ni patohistološkim obilježjima.

Izraženost nm23 u karcinomima usne šupljine analizirana je u nekoliko studija. Prema Otsuki (53) imunohistokemijska izraženost nm23 H1 proteina povezana je s manjom učestalosti metastaza u limfnim čvorovima vrata; analiza je učinjena na 56 uzoraka planocelularnog karcinoma usne šupljine. Izraženost NDP kinaze nije korelirala s veličinom tumora, histološkim stupnjem diferencijacije, ni načinom invazije tumora (54). U radu Lo Muzija (55) nm23-H1 izraženost povezana je s manjom učestalosti pozitivnih limfnih čvorova. Prema Wangu (29) kod planocelularnih tumora usne šupljine (analizirano 86 tumora) javlja se u nešto manje od 50% primarnih tumora, korelira s veličinom tumora, a smanjena izraženost kod manjih tumora korelira s povećanom incidencijom metastaza u regionalne limfne čvorove i lošijim preživljenjem. U drugom radu istih autora (56) korelacija izraženosti nm23 u primarnim karcinomima usne šupljine i metastazama u limfnim čvorovima pokazuje također kao i u radu Takesa (21) smanjenu izraženost nm23 u metastazama u odnosu na primarni tumor, a nm23 negativni tumori povezani su s lošijim preživljenjem.

Izraženost nm23 u karcinomima larinksa također je analizirana je u nekoliko studija. U istraživanje Leea i suradnika (57) uključena su 22 bolesnika s karcinomom larinksa, smanjena izraženost nm23 primjećena je u 10 karcinoma, te u 4 od 5 analiziranih metastaza, a povezana je s kraćim preživljenjem. Rad Gunduza i suradnika (58) pokazuje pojačanu izraženost nm23 kod većine primarnih tumora, nema razlike u distribuciji po dobi, spolu i stadiju tumora između nm23 pozitivnih i nm23 negativnih tumora, a niska izraženost nm23 povezana je s histološki niskim stupnjem diferenciranosti tumora, pojavljivanjem udaljenih metastaza i /ili recidivnog tumora. Prema radu Pesterelija (59) 96% tumora (26/28) pokazalo je pozitivnu izraženost nm23, bez razlike u izraženosti između metastatskih i ne-metastatskih tumora. Prema radu Sikorske i sur. (60) imunohistokemijska izraženost nm23 proteina kod karcinoma larinksa bila je značajno niža kod bolesnika s metastazama, u usporedbi s bolesnicima bez metastaza. Bolesnici s niskom izraženosti nm23 proteina imali su lošije preživljenje od bolesnika s visokom izraženosti nm23. Studija provedena na 25 uznapredovalih karcinoma larinksa nije pokazala korelaciju s metastatskom bolesti ili drugim prognostičkim pokazateljima (38).

1.8. TUMORSKI ANTIGENI I IMUNOLOŠKA REAKCIJA NA TUMOR

Spontana regresija tumora opisana je kod više različitih tumora, najčešće melanoma i karcinoma bubrega. Spontana regresija tumora, kao i veća učestalost i brži rast tumora kod imunokompromitiranih bolesnika impliciraju interakciju imunološkog sustava s tumorom – tumorskim antigenom (61, 62), a rast tumora i metastaziranje posljedica su izmicanja tumorskih stanica imunološkom nadzoru. Histološki dokaz imunoreakcije na tumor je infiltracija tumora limfocitima, makrofagima i plazma-stanicama.

Tumorski antigen je molekula iz tumorske stanice, koja nije prisutna u normalnim stanicama istoga tkiva i stadija razvoja, a koju imunološki sustav može prepoznati kao stranu, te posljedično nastaje protutumorska imunološka reakcija (63, 64). Tumorski antigeni mogu se nalaziti na staničnoj membrani, u citoplazmi stanice ili u izvanstaničnoj tekućini (65, 66). Idealan tumorski antigen trebao bi ispuniti 4 uvjeta:

1. visoka izraženost u tumorskim stanicama,
2. nema izraženost u normalnim stanicama,
3. laka dostupnost cirkulaciji,
4. prepoznatljivost za imunološki sustav.

Imunološki sustav protiv tumorskih stanica može reagirati nespecifičnim i specifičnim oblicima (stanična i humoralna) imunosti.

T stanice usmjerene protiv tumorski udruženih antigena mogu se često detektirati kod bolesnika s karcinomom (61, 67, 68). Prirodni odgovori T stanica na tumor opisani su kod bolesnika s uznapredovalim tumorima, vrlo je mali broj studija koje uspoređuju bolesnike u ranim i uznapredovalim stadijima bolesti (67).

Tumorski antigeni sintetiziraju se na ribosomima tumorske stanice. U proteosomima se razgrađuju na peptide od desetak aminokiselina. Proteini mogu imati jedan ili više peptida ili epitopa koje prepoznaju T stanice. Pomoću transportnih proteina prebacuju se u endoplazmatsku mrežicu gdje se vežu s molekulom MHC (prema engl. major histocompatibility complex) razreda I i kao kompleks putuju putem Golgijeva aparata na staničnu membranu.

Osnova specifične stanične imunosti je prepoznavanje imunogeničnog kompleksa (antigen spregnut s MHC molekulom razreda I) od strane citotoksičnih limfocita (66). Antigen specifični receptori limfocita T su transmembranski heterodimeri koji se sastoje od α i β lanca. Svaki lanac ima varijabilnu i konstantnu domenu. Varijabilni dio je specifičan za određeni klon limfocita i prepoznaje kompleks antigena peptida i varijabilni dio molekule

MHC. Konstantni dio prepoznaje konstantni dio molekule MHC. Citotoksični limfociti (CD8+ limfociti) prepoznaju endogene antigene koji su prezentirani na stanicama koje ih sintetiziraju – tumorske stanice, stanice zaražene virusima i različite druge stanice koje nisu profesionalne antigen prezentirajuće stanice. Sazrijevanjem CD8+ limfocita nastaju citotoksične (ubilačke) stanice koje mogu izravno ubiti stanicu koja na površini izražava isti antigen i MHC molekulu kao i stanica na koju su inicijalno bili senzibilizirani. Jaka aktivnost citotoksičnih limfocita može biti inducirana ex vivo u prisutnosti veće količine citokina i antigena, ali još uvijek je nedostatno razumijevanje funkcije citotoksičnih limfocita in vivo i njihov utjecaj na rast tumora (69).

Manji broj tumorskih antigena prezentiranih u sprezi s MHC II molekulom prepoznaju CD4+ limfociti (66).

Humoralna imunost temelji se na vezanju protutumorskih protutijela na tumorsku stanicu, te aktivaciji komplementa, koji litičkim kompleksom (C5b-C9) perforira membranu ciljane stanice. Uloga humoralnog odgovora u obrani od tumora je manje važna. Protutumorska protutijela prisutna su u bolesnika s rakom, ali njihova koncentracija ne korelira sa stadijem bolesti (70).

Najčešće nedovoljna imunološka reakcija posljedica je izbjegavanja imunološkog odgovora od strane tumora. Poznato je nekoliko mehanizama kojima tumorske stanice izbjegavaju imunološki odgovor organizma. Jedan od načina je smanjeno izražavanje HLA molekula na tumorskim stanicama. Drugi način je otpuštanje topljivih molekula HLA, otpuštene molekule vežu se za receptore T-limfocita, te u limfocitima pokreću apoptozu. Treći način je izraženost Fas liganda na membrani tumorskih stanica što uzrokuje smrt citotoksičnih limfocita nakon vezivanja.

Tijekom posljednjih godina rezultati istraživanja pokazuju aberantnu izraženost normalnih proteina testisa u tumorski promijenjenim stanicama (71). Skupina imunogeničnih proteina koji pokazuju pojačanu izraženost u normalnim testisima i u velikom broju tumora različite histologije naziva se karcinom-testis antigeni, i obuhvaća gene MAGE, BAGE, GAGE, HOM-MEL-40 (SSX2), LAGE i NY-ESO-1 (71, 72, 73). U nekim slučajevima karcinom-testis antigeni izraženi su i u jajnicima i trofoblastu (68). Do izraženosti karcinom-testis antigena u različitim vrstama tumora dolazi zbog poremećaja regulacije gena u malignoj stanici (68).

Zajedničke karakteristike karcinom-testis antigena su (68, 73):

1. izraženost u normalnim testisima
2. pripadnost skupinama više sličnih gena („obitelji gena“)

3. često se nalaze na X kromosomu
4. heterogena izraženost u karcinomima
5. vjerojatna povezanost s tumorskom progresijom
6. indukcija izraženosti zbog hipometilacije i/ili acetilacije histona
7. imunogeničnost u bolesnika s karcinomom.

Geni MAGE-3 i NY-ESO-1 nalaze se na X kromosomu. Analiza izraženosti mRNA u staničnim linijama tumora i uzorcima tumora ne pokazuje koordiniranu izraženost različitih karcinom-testis antigena, što govori da je regulacija njihove izraženosti neovisna (73). Vjerojatni mehanizam izraženosti karcinom testis antigena je derepresija, do derepresije dolazi lakše kod gena smještenih na X-kromosomu jer postoji samo jedan aktivan kromosom (73). Neki karcinom testis antigeni (MAGE, BAGE) češće su izraženi u metastazama nego u primarnom tumoru, što ukazuje da je derepresija ovih gena kasniji događaj u progresiji tumora (73).

Antigenske produkte izraženosti MAGE-3 i NY-ESO-1 na karcinomskim stanicama prepoznaju citolitički CD8 (+) T limfociti (61, 62, 67, 68, 69, 70, 71, 74). Izraženost antigena NY-ESO-1, kao i antigena MAGE-A inducira i spontani humoralni odgovor (68, 73).

Izraženost ove skupine antigena na testisima moguća je jer se testisi smatraju imunološki privilegiranim mjestom. Stanice sjemenika, zahvaljujući manjku izravnog dodira s imunskim stanicama nisu dostupne imunološkom sustavu (73). Na površini zametnih stanica nema izraženih molekula MHC razreda I (73). Imunohistokemijska reakcija pokazuje najjaču MAGE izražajnost u sjemenskim kanalićima – na spermatogonijama, te na spermatocitima na svim razinama lumena kanalića. Što je stanica zrelija, imunohistokemijsko bojenje je slabije (41). U Sertolijevim stanicama i spermatidama nema proteina MAGE (75).

Novija metoda detekcije tumorskih antigena je serološka analiza biblioteke cDNA (SEREX). Biblioteka cDNA (prema engl. complementary DNA) sadrži odsječke DNA iz uzorka tumora, a nastaje prepisivanjem pomoću enzima reverzne transkriptaze na kalupu izdvojene mRNA. Izlaganjem pripremljenog uzorka bolesnikovom serumu identificiraju se antigeni koji su izazvali humoralni odgovor s visokim titrom IgG protutijela (73). Metoda omogućava ne samo detekciju antigena na staničnoj površini, nego i intracelularnih antigena (73).

Identifikacija tumorskih antigena koje imunološki sustav prepoznaje (61, 62, 71) uz razumijevanje mehanizma prirodne T stanične imunosti (67) otvara nove mogućnosti za razvoj ciljane, antigen specifične imunoterapije tumora posredovane citotoksičnim limfocitima. Opisane su dugotrajne regresije tumora kod bolesnika liječenih indukcijom

antigen specifičnih citotoksičnih limfocita (61, 62). Progresija tumora tijekom imunizacije nastaje ili gubitkom izraženosti antigena ili nestankom MHC I molekule na tumorskoj stanici (61, 62). Karcinom testis antigeni imaju dobre karakteristike za razvoj imunoterapije, kao ciljni antigeni za specifične inducirane (peptidom ili cijepljenjem) citotoksične limfocite (62,63).

1.9. GEN MAGE-3

MAGE geni su porodica gena koji kodiraju antigene povezane s melanomom (prema engl. melanoma-associated antigene gene), a pripadaju skupini karcinom-testis antigena. Antigeni MAGE otkriveni su u stanicama melanoma, dok su daljnja istraživanja pokazala izraženost izrazito vezanu uz različite maligne stanice (67, 74, 76). Otkriće antigena MAGE-1 objavljeno je 1991. godine (66).

Porodica gena MAGE ima 3 potporodice MAGE A, MAGE B i MAGE C s barem 17 gena (75). U potporodicu MAGE A pripada 12 gena. Geni MAGE A smješteni su na q terminalnom kraju X kromosoma (Xq28), (76, 77, 78).

Obrazac izraženosti gena MAGE u testisima sugerira da se radi o obitelji gena uključenoj u razvoj germinativnih stanica (71). Geni iz porodice MAGE izraženi su u koži u 1. tjednu oporavka rane, procesu u kojem različite vrste stanica migriraju i proliferiraju. Proliferacija i migracija stanica dio su procesa rasta tumora i metastaziranja.

Produkt gena MAGE-1 je citoplazmatski protein klasteriran u paranuklearnim strukturama nalik organelama (79), prepoznaju ga citotoksični T limfociti. MAGE-1 pozitivitet pokazan je i u karcinomima dojke, karcinomima pluća ne-malih stanica i u tumorima središnjeg živčanog sustava (79).

Produkt gena MAGE-3 ili MAGE-A4 je citoplazmatski protein (78). Fiziološka uloga proteina MAGE-3 nije poznata. Antigen MAGE-3 izražen je u histološki različitim vrstama tumora, bez izraženosti u normalnim odraslim tkivima osim testisa i placente (80). Kod tumora je imunohistokemijskim određivanjem antigena MAGE-3 reaktivnost nađena samo u zloćudno promijenjenim stanicama, ali ne i u stromi tumora ili u okolnom tkivu. Kod većine tumora imunoreaktivnost je citoplazmatska, no katkad se može vidjeti i pozitivna reakcija u jezgri (75).

Za antigene MAGE 1, 2 i 3 poznati su epitopi koje prikazane s molekulom HLA razreda I prepoznaju citotoksični T-limfociti. Za antigen MAGE-3 otkrivena su 4 epitopa, poznati su njihovi peptidni slijedovi kao i prezentirajuća molekula MHC. Tumorsku stanicu koja na svojoj staničnoj membrani ima odgovarajući MAGE-3 epitop i molekulu MHC razreda I može ubiti inducirani citotoksični limfocit (74, 75, 76).

Antigen MAGE-3 izražen je u do 65% kožnih melanoma, a pojačana izraženost nađena je i u tumorima glave i vrata, karcinomu pluća, sinovijalnom sarkomu, karcinomu mokraćnog mjehura i seminomu (74, 81, 82). Izraženost antigena iz obitelji MAGE u melanomu i karcinomu dojke negativno korelira s histološkim stupnjem diferenciranosti

tumora (82). Izraženost u tumorskim stanicama izrazito raste s progresijom tumora (75, 81, 83). U karcinomu mokraćnog mjehura izraženost MAGE-3 češća je kod planocelularnog karcinoma, nego kod ostalih histoloških vrsta tumora, a pozitivitet korelira s invazivnim tumorima (84)

Za razliku od ostalih antigena iz skupine karcinom-testis antigena antigenski produkti gena MAGE rijetko induciraju spontani imunološki odgovor citotoksičnih limfocita (61, 62, 67). Antigenski produkt gena MAGE-3 korišten je kao cjepivo kod bolesnika s melanomom, te je primjećena regresija tumora u više od 30% liječenih bolesnika (61, 62, 85). Prva istraživanja adjuvantne primjene kod karcinoma pluća ne-malih stanica pokazuju obećavajuće rezultate (86).

U do sada objavljenim studijama MAGE-3 pokazuje visoki stupanj izraženosti kod planocelularnih karcinoma glave i vrata, bez jasne korelacije s prognozom bolesti (87).

Prema studiji Eura i suradnika (88) u kojoj je analizirana izraženost MAGE-1, -2 i -3 antigena u 20 karcinoma maksilarnog sinusa, 70% tumora pokazuje izraženost barem jednog od analiziranih MAGE antigena. U drugoj studiji istih autora (89) analizirana je izraženost MAGE-1, -2, -3, -4, -41 i -6 antigena na uzorku od 83 planocelularna karcinoma glave i vrata, ukupno 59 tumora pokazalo je izraženost barem jednog od analiziranih MAGE antigena, 36/83 tumora pokazalo je izraženost MAGE-3 antigena, uz različitu distribuciju ovisno o lokalizaciji primarnog tumora i histološkom stupnju diferenciranosti.

U istraživanju Leea i suradnika (90) MAGE-3 antigen detektiran je u 45% (18/40) planocelularnih karcinoma glave i vrata, bez korelacije s kliničkim stadijem bolesti i pojavljivanjem metastaza. U drugom radu istih autora (91) pokušana je detekcija MAGE mRNA u sputumu bolesnika s planocelularnim karcinomom glave i vrata, kod 13 od analiziranih 17 uzoraka detektiran je jedan od MAGE A1-6 gena.

U studiji Atanackovica i suradnika (92) MAGE-A3 bio je izražen u 72% analiziranih planocelularnih karcinoma glave i vrata, u analizu je uključen 51 bolesnik.

U radu Kienstre (87) i suradnika MAGE-3 bio je izražen u 44.4% (20/45) analiziranih planocelularnih karcinoma glave i vrata, bez korelacije s karakteristikama tumora i prognozom bolesti.

Prema istraživanju Riesa i suradnika (93) u karcinomima usne šupljine 71% (15/21) pokazuje izraženost barem jednog od 6 analiziranih MAGE antigena (-A1 do -A6). Najčešće je primjećena izraženost MAGE-3 antigena, u 62% tumora.

Studija Iwamota i suradnika (94) pokazuje mogućnost detektiranja MAGE-4 proteina u serumu bolesnika s planocelularnim karcinomom glave i vrata, preoperativno visoke

vrijednosti nakon operacije su se normalizirale, a kod jednog bolesnika porast razine u serumu nakon završetka liječenja prethodio je recidivu bolesti. Prema ovom istraživanju MAGE-4 pokazuje sva obilježja serumskog tumorskog markera.

1.10. GEN NY-ESO-1

Antigenski produkt gena NY-ESO-1 ili LAGE-1 pripada skupini karcinom-testis antigena (61, 62). Izraženost antigena NY-ESO-1 nalazi se u normalnim testisima i jajnicima, u manjoj mjeri u stanicama placente, te u velikom broju tumora različite histologije (melanom, karcinom dojke, karcinom prostate i hepatocelularni karcinom), (62, 67, 73). Pločasti epitel (koža, sluznica jednjaka) ne pokazuje NY-ESO-1 izraženost (73). Gen se nalazi na Xq28 kromosomu (87). Gen NY-ESO-1 kodira protein koji ne pokazuje homologiju s do sada poznatim proteinima (73).

Fiziološka uloga proteina NY-ESO-1 nije poznata, strukturne analize pokazuju da bi se moglo raditi o transmembranskom proteinu (73).

Antigenski produkt izraženosti gena NY-ESO-1 otkriven je SEREX metodom (62, 73). Antigen je kloniran iz karcinoma jednjaka.

Antigenski produkt gena NY-ESO-1 se smatra jednim od najimunogenijih izoliranih antigena jer inducira spontani imunološki odgovor domaćina u 50% bolesnika s tumorima koji pokazuju NY-ESO-1 izraženost (61, 62, 71, 87). Kod bolesnika s karcinomom jednjaka i melanomom izraženost NY-ESO-1 može izazvati i humoralni i CD8⁺ i CD4⁺ stanični protutumorski imunski odgovor (95). U in vitro uvjetima antigenski produkt izraženosti NY-ESO-1 gena inducira jaki odgovor citotoksičnih limfocita (61). Jedan je od najistraživanijih antigena od otkrića do danas (96).

U radu Fujita i suradnika (97) analizirana je izraženost NY-ESO-1 antigena na uzorku od 123 planocelularna karcinoma jednjaka, 33% tumora bilo je pozitivno, češće su bili pozitivni tumori uznapređovalog stadija, histološki bolje diferencirani, ali su bolesnici imali bolje preživljenje u usporedbi s bolesnicima čiji tumori nisu pokazivali izraženost NY-ESO-1. Humoralni odgovor zabilježen je u samo 2 od 51 analiziranog bolesnika.

Iako početno otkriven u planocelularnom karcinomu jednjaka u do sada objavljenim studijama pokazuje nisku izraženost u planocelularnim karcinomima glave i vrata (87). Od ukupno 45 analiziranih planocelularnih karcinoma glave i vrata samo su 3 pokazivala izraženost NY-ESO-1, korištena je RT-PCR metoda, kod svih bolesnika radilo se o uznapređovanoj bolesti s metastazama u limfnim čvorovima na vratu, te o histološki nezrelim tumorima.

U studiji Atanackovica i suradnika (92) NY-ESO-1 pokazuje nisku izraženost u planocelularnim karcinomima glave i vrata, izraženost prisutna u 3 od 51 analiziranog uzorka, ali uz detektabilna protutijela u serumu bolesnika.

2. Hipoteza

Hipoteze su:

1. Smanjena izraženost nm23 povezana je s povećanim rizikom metastaziranja planocelularnog karcinoma glave i vrata.
2. Povećana izraženost MAGE-3 povezana je s lošijom prognozom planocelularnog karcinoma glave i vrata.
3. Povećana izraženost NY-ESO-1 povezana je s boljom prognozom planocelularnog karcinoma glave i vrata.

3. Cilj istraživanja

Cilj istraživanja je utvrditi:

1. imunohistokemijsku izraženost proteina nm23, MAGE-3 i NY-ESO-1 u plano-celularnim karcinomima glave i vrata,
2. povezanost izraženosti proteina nm23, MAGE-3 i NY-ESO-1 s proširenosti tumora (TNM) u trenutku postavljanja dijagnoze,
3. povezanost izraženosti proteina nm23, MAGE-3 i NY-ESO-1 sa stupnjem diferenciranosti tumora,
4. povezanost izraženosti proteina nm23, MAGE-3 i NY-ESO-1 s metastatskim potencijalom, biološkim ponašanjem tumora i preživljenjem bolesnika.

4. Materijal i metode istraživanja

Provedeno je retrospektivno istraživanje. U studiju su uključeni bolesnici s planocelularnim karcinomom glave i vrata, kod kojih je liječenje započelo u Službi za tumore glave i vrata Klinike za tumore u periodu od 1996. do 1998. godine, te su praćeni tijekom najmanje 5 godina. Uključeno je ukupno 198 bolesnika s lokalizacijom primarnog tumora u području usne šupljine, orofarinksa, hipofarinksa i larinksa. Histološka slika planocelularnog karcinoma jedinstvena je i neovisna o navedenim lokalizacijama tumora. Analizom bioptičkog materijala kod bolesnika sa poznatim prognostičkim čimbenicima (TNM i stupanj diferenciranosti tumora) i poznatim tijekom bolesti (lokalni recidiv, regionalni recidiv, diseminacija, preživljenje) pokazana je izraženost navedenih proteina.

Uvjeti za uključivanje u istraživanje bili su:

1. patohistološka dijagnoza planocelularnog karcinoma glave i vrata (usna šupljina, orofarinks, hipofarinks i larinks)
2. dostupan materijal za analizu (parafinske kocke tumora iz arhive Službe za kliničku patologiju Klinike za tumore)
3. dostupan podatak o TNM stadiju bolesti u trenutku postavljanja dijagnoze
4. dostupan podatak o vrsti liječenja
5. poznat tijek bolesti (bez recidiva, recidiv, diseminacija)
6. podatak o datumu i uzroku smrti (iz povijesti bolesti, ambulantnih kontrolnih pregleda, te iz podataka Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo).

Operacijski materijal uključenih bolesnika fiksiran je u 10% puferiranom formalinu, uklopljen u parafin, rezan i bojen standardnom rutinskom patohistološkom metodom hemalaun-eozin kako bi se svjetlosnim mikroskopom potvrdila patohistološka dijagnoza, te odredio stupanj diferenciranosti tumora.

Dodatni rezovi primarnog tumora obojeni su imunohistokemijski na nm23, MAGE-3 i NY-ESO-1 upotrebom :

1. poliklonskog kunićjeg protutijela na nm23 (A0096; 1:50; DAKO),
2. nerazrijeđenog supernatanta hibridoma koji stvara mišje monoklonsko protutijelo 57B za MAGE-3. Ono je dobiveno imunizacijom miševa s rekombinantnim proteinom MAGE-3 i specifično je za protein MAGE-3 (G. Spagnoli, University of Basel, Switzerland).

3. NY-ESO protutijelo, B9.8.1.1 monoklonsko protutijelo, specifično za protein NY-ESO-1 (93).

Imunohistokemijska obrada učinjena je upotrebom automatskog aparata DAKO TechMate™ Horizon automated immunostainer metodom MSIP prema preporuci proizvođača za nm23, dok je obrada na MAGE-3 i NY-ESO-1 učinjena prema standardnom imunohistokemijskom protokolu s tim da su primarna protutijela za MAGE-3 bila ostavljena preko noći na temperaturi +4°C, a za NY-ESO-1 jedan sat.

Rezultati imunohistokemijskog bojenja izraženi su semikvantitativnom metodom, što znači: nema obojenja u tumorskim stanicama (-); do 10% tumorskih stanica ima pozitivnu reakciju, slabo pozitivna reakcija (+); od 10 do 50% tumorskih stanica pozitivno, umjereno pozitivna reakcija (++); više od 50% tumorskih stanica pozitivno, jako pozitivna reakcija (+++).

Podaci o bolesnicima (dob, spol), tumorima (lokalizacija, TNM status), liječenju (operacija, radioterapija, kemoterapija) prikupljeni su iz arhiviranih povijesti bolesti. Podaci o 5-godišnjem preživljenju prikupljeni su u suradnji s Registrom za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo.

Analiza podataka:

Svi dobiveni rezultati obrađeni su deskriptivnim statističkim metodama.

Za testiranje razlike u učestalosti nezavisnih stanja - pojava primjenjen je χ^2 test. Kod malih opaženih frekvencija korišten je χ^2 test uz Yatesovu korekciju odnosno Fischerov egzaktni test. Za analizu preživljenja primijenjena je metoda po Kaplan-Meieru. Razlika u preživljenju između dviju skupina analizirana je log-rank testom dok je razlika između više skupina analizirana generaliziranim log-rank testom.

Jakost i smjer povezanosti varijabli testirana je Spermanovim testom korelacije ranga.

Statistički značajnom smatrana je vrijednost empirijske razine značajnosti p od 0.05 ($p < 0.05$).

U analizi podataka korišten je programski paket Statistica verzija 7.0, licenca Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu,.

5. Rezultati

5.1. ANALIZA OBILJEŽJA TUMORA ODABRANIH ZA IMUNOHISTOKEMIJSKU OBRADU

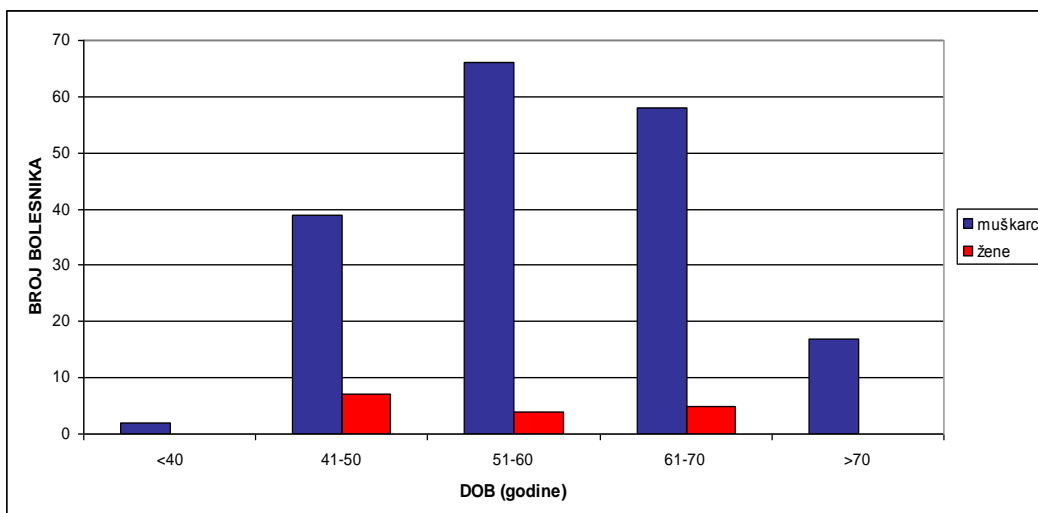
U istraživanje je uključeno 198 bolesnika. Učinjena je analiza dobne i spolne raspodjele, raspodjele po lokalizacijama, po TNM klasifikaciji i stadiju bolesti, te po gradusu tumora.

Dobna raspodjela analizirana je po desetljećima. Broj bolesnika s planocelularnim karcinomima glave i vrata ispod 40 godine života je mali i zatim raste uz maksimum u 6. i 7. desetljeću života, nakon čega se ponovno smanjuje (tablica 1, slika 13). U ukupnom broju ispitanika bilo je 16 žena (8.1%) i 182 muškarca (91.9%). Tumori kod žena javili su se u dobi od 40 do 70 godina.

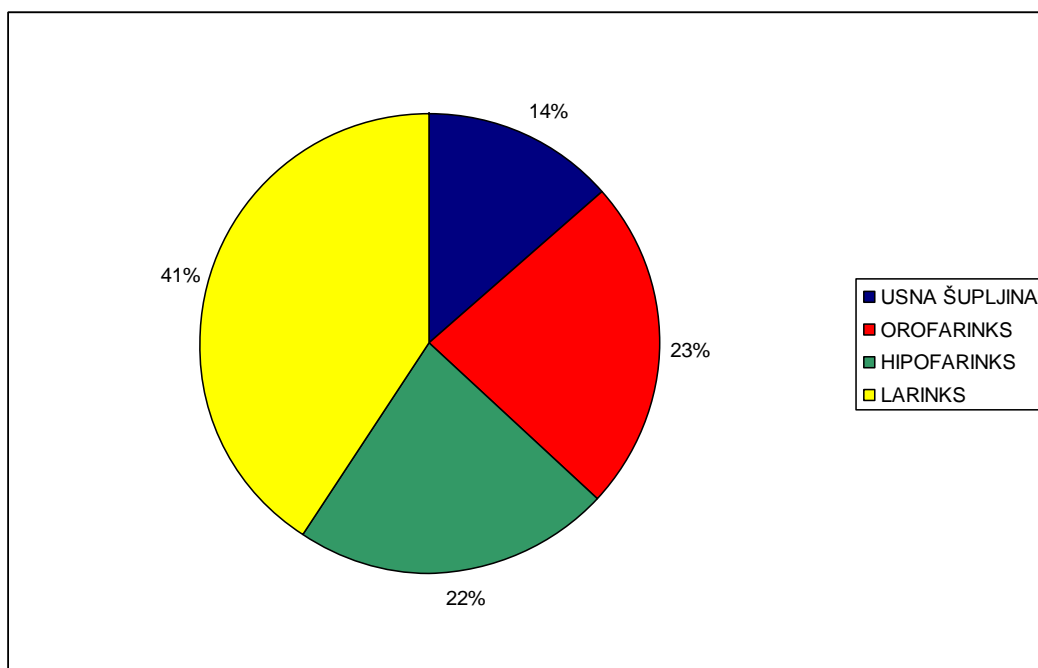
Tablica 1. Dobna i spolna raspodjela bolesnika.

DOB	BROJ MUŠKARACA	BROJ ŽENA	UKUPNO
<40	2	0	2
41-50	39	7	46
51-60	66	4	70
61-70	58	5	63
>70	17	0	17
UKUPNO	182	16	198

Prema lokalizaciji u istraživanje je uključen 81 (40.9%) bolesnik s karcinomom larinksa, 46 (23.2%) s karcinomom orofarinksa, 44 (22.2%) s karcinomom hipofarinksa, te 27 (13.6%) bolesnika s karcinomom usne šupljine (slika 14). Najveću skupinu čine bolesnici s planocelularnim karcinomom larinksa. Prema pojedinim lokalizacijama bilo je 6 žena s karcinomom usne šupljine, 4 s karcinomom orofarinksa, 1 s karcinomom hipofarinksa i 5 s karcinomom larinksa (tablica 2).



Slika 13. Grafički prikaz dobne i spolne raspodjele.

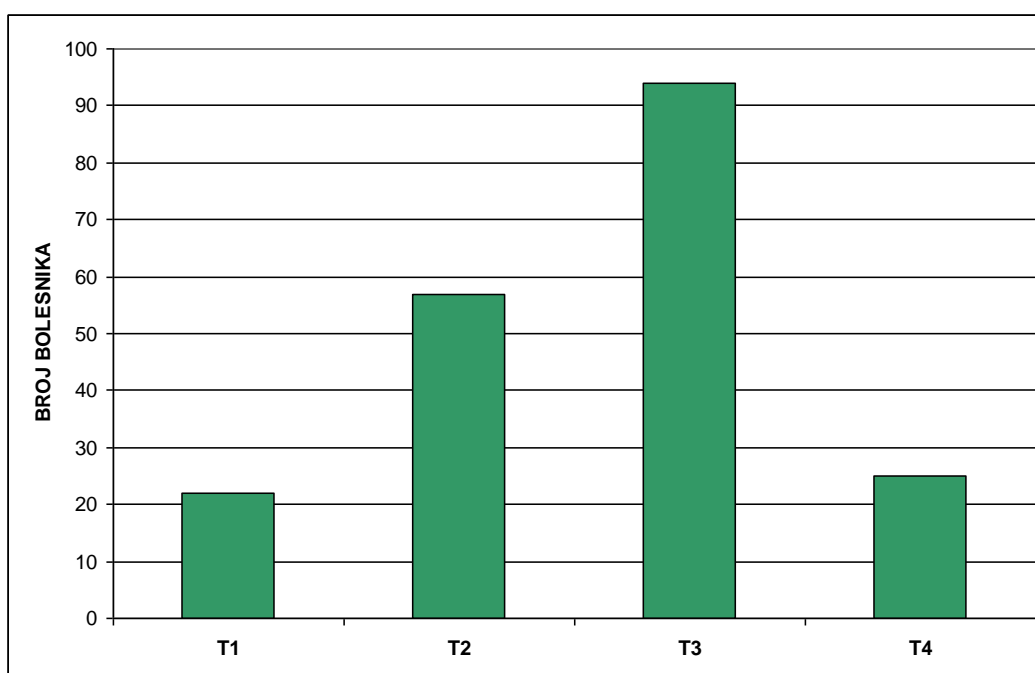


Slika 14. Raspodjela lokalizacija primarnih tumora.

Tablica 2. Raspodjela bolesnika prema lokalizacijama i spolu. Postotak označava udio oboljelih muškaraca odnosno žena u ukupnom broju tumora pojedine lokalizacije.

LOKALIZACIJA	MUŠKARCI		ŽENE		UKUPNO
	n	%	n	%	
USNA ŠUPLJINA	21	77.8	6	22.2	27
OROFARINKS	42	91.3	4	8.7	46
HIPOFARINKS	43	97.7	1	2.3	44
LARINKS	76	93.8	5	6.2	81
UKUPNO	182	91.9	16	8.1	198

U TNM klasifikaciji tumori se prema veličini primarnog tumora klasificiraju u 4 stadija (T1-T4). Prema veličini tumora bilo je 22 (11.1%) T1 tumora, 57 (28.8%) T2 tumora, 94 (47.5%) T3 tumora, te 25 (12.6%) T4 tumora (slika 15). Tumore se može prema veličini podijeliti i u početne (T1-T2) i lokalno uznapredovale (T3-T4), nakon takve podjele na analiziranom uzorku bilo je 79 (39.9%) početnih tumora i 119 (60.1%) lokalno uznapredovalih tumora.



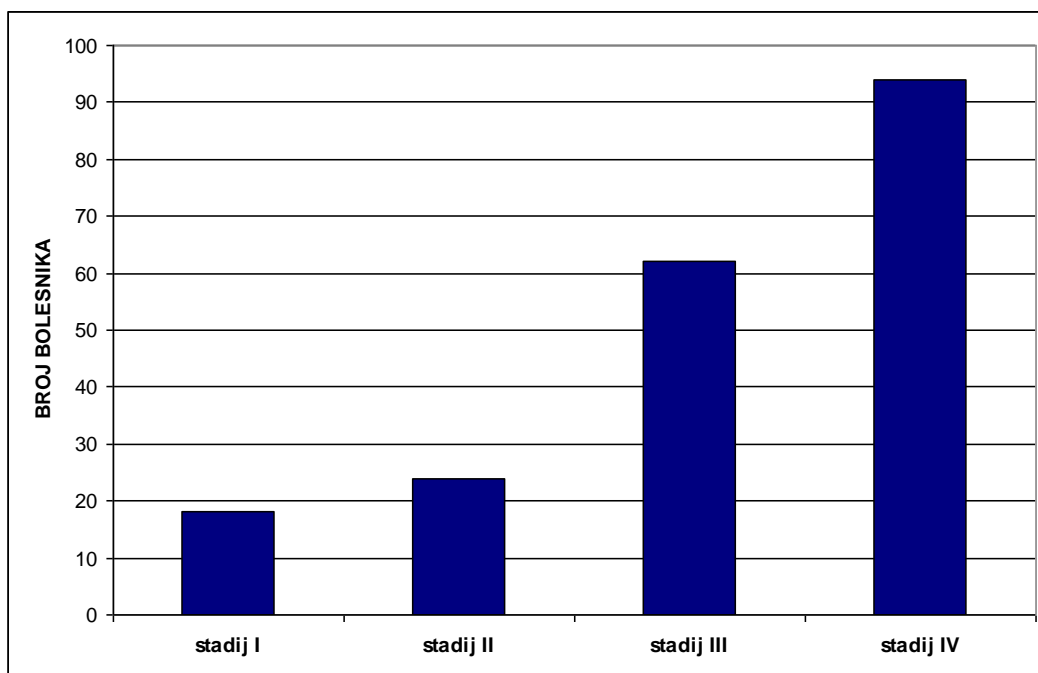
Slika 15. Raspodjela T stadija primarnog tumora.

Prema N stadiju bolesnici se klasificiraju također u 4 grupe, N0 što znači bez metastaza na vratu, te N1-3 ovisno o broju i veličini regionalnih metastaza (tablica 3). S obzirom na mali broj bolesnika u N1 i N3 stadijima za ovo istraživanje bolesnici su podijeljeni u 2 skupine: N0 96 (48.5%) bolesnika bez metastaza, te N+ 102 (51.5%) bolesnika s metastazama na vratu.

Tablica 3. N stadiji bolesti.

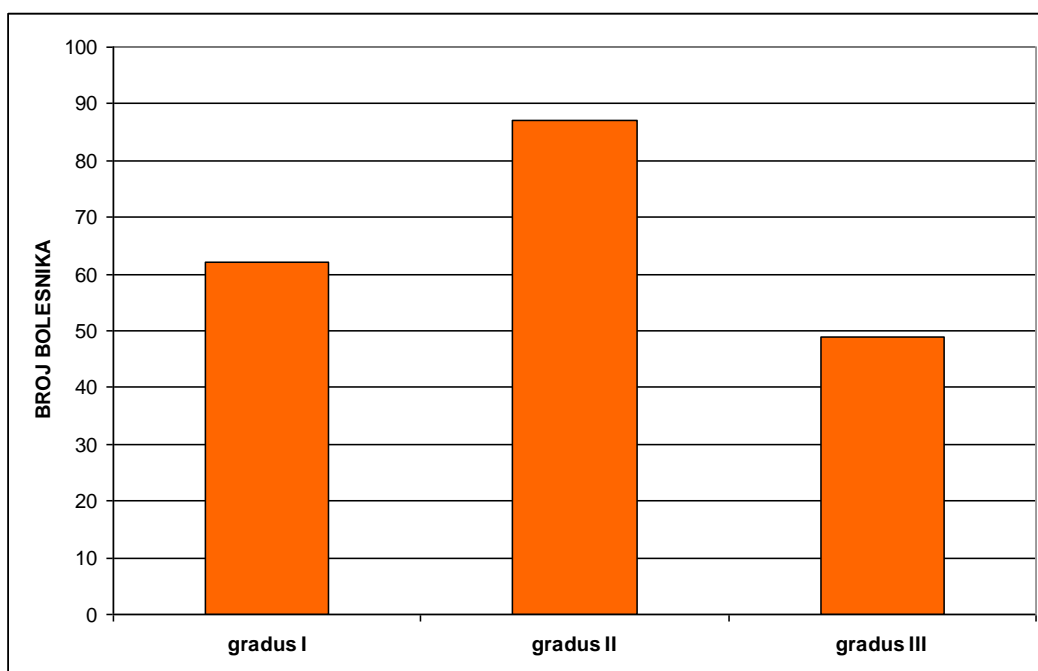
N stadij	BROJ BOLESNIKA	% BOLESNIKA
N0	96	48.5
N1	19	9.6
N2	70	35.3
N3	13	6.6
UKUPNO	198	100

Prema AJCC stadijima (I-IV) bolesti bilo je 18 (9.1%) bolesnika u stadiju I, 24 (12.1%) bolesnika u stadiju II, 62 (31.3%) bolesnika u stadiju III, te 94 (47.5%) bolesnika u stadiju IV (slika 16). Kao i kod T veličine primarnog tumora i ovdje se bolesnike može podijeliti na skupinu bolesnika s rano dijagnosticiranom bolesti (stadiji I i II), te skupinu s uznapređovalom bolesti u trenutku postavljanja dijagnoze (stadiji III i IV). U ukupnom broju analiziranih bolesnika bilo je 42 (21.2%) bolesnika s rano postavljenom dijagnozom, te 156 (78.8%) bolesnika u uznapređovalim stadijima bolesti.



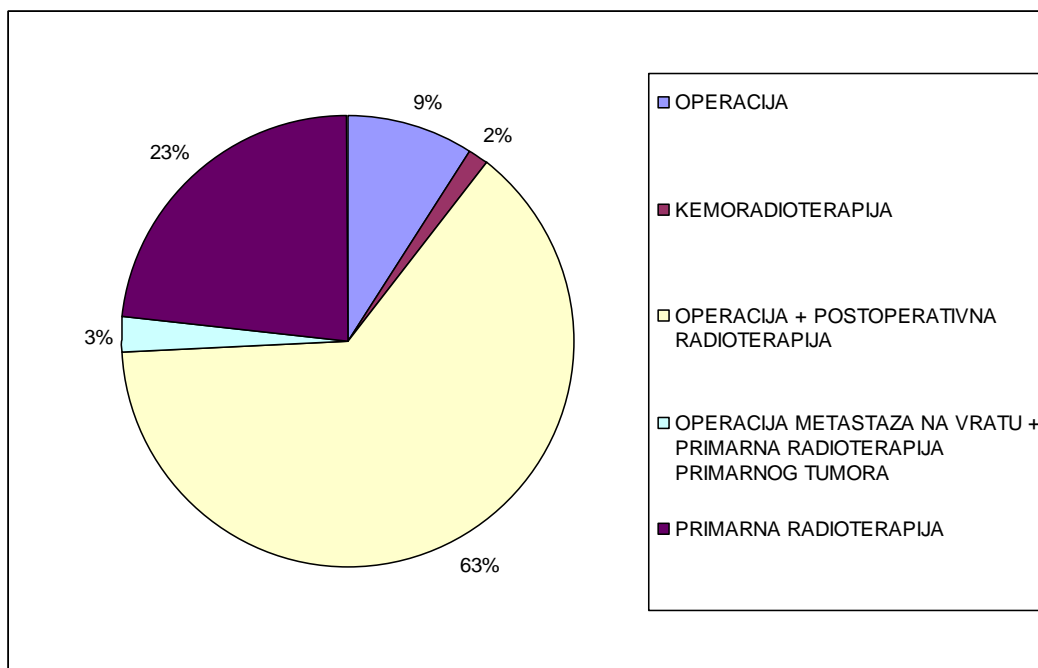
Slika 16. Raspodjela prema AJCC stadijima u trenutku postavljanja dijagnoze.

Na standardnom patohistološkom preparatu rutinski se određuje stupanj diferencijacije tumora i klasificira kao gradus I-III. U analizu je uključeno 62 (31.3%) bolesnika s planocelularnim karcinomom gradusa I, 87 (43.9%) gradusa II, te 49 (24.7%) gradusa III (slika 17).



Slika 17. Raspodjela tumora prema histološkom stupnju diferenciranosti.

U liječenju istraživane skupine bolesnika primjenjeno je nekoliko modaliteta liječenja (slika 18). Većina bolesnika (63%) liječena je kirurški, uz postoperativnu primjenu radioterapije. Manji dio bolesnika (23%) liječen je primarnom radioterapijom. Kod treće skupine bolesnika (9%) provedeno je kirurško liječenje kao jedini modalitet liječenja. Kod 3% bolesnika učinjena je operacija metastatske bolesti na vratu, uz primarnu radioterapiju primarnog tumora. Samo 2% bolesnika liječeno je kemoradioterapijom.



Slika 18. Primjenjeni terapijski modaliteti.

5.2. ANALIZA MEĐUODNOSA OBILJEŽJA ODABRANIH TUMORA

Učinjena je analiza međusobnih odnosa do sada navedenih obilježja bolesnika uključenih u istraživanje.

5.2.1. Odnos lokalizacije i veličine tumora

Analiza učestalosti pojavljivanja tumora različite veličine (T stadij) u odnosu na lokalizaciju tumora prikazana je u tablici 4. U trenutku postavljanja dijagnoze tumori su češće uznapređovalog T stadija (T3 i T4 tumori), u ukupnom broju bolesnika 60.1% ima tumor uznapređovalog T stadija. Izrazito rijetko, u manje od 5% bolesnika nalazi se T1 tumor u području orofarinksa i hipofarinksa.

Tablica 4. Odnos lokalizacije tumora i T stadija u trenutku postavljanja dijagnoze.

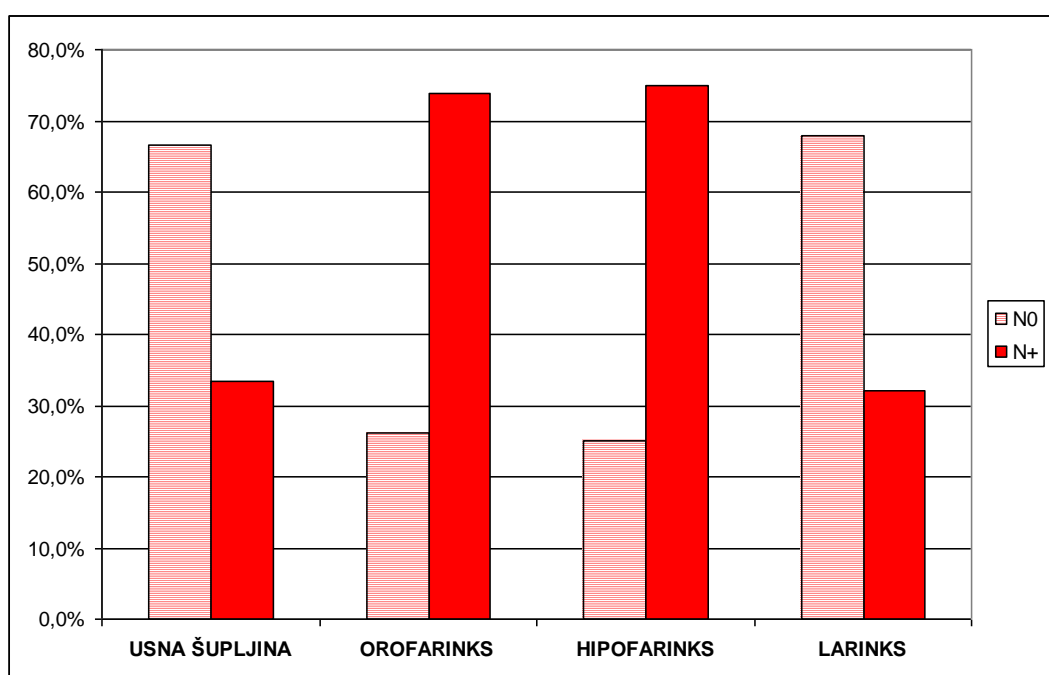
LOKALIZACIJA	T1		T2		T3		T4		UKUPNO
	n	%	n	%	n	%	n	%	
USNA ŠUPLJINA	6	22.2	10	37.0	9	33.3	2	7.4	27
OROFARINKS	2	4.3	19	41.3	18	39.1	7	15.2	46
HIPOFARINKS	1	2.3	12	27.3	26	59.1	5	11.4	44
LARINKS	13	16.0	16	19.8	41	50.6	11	13.6	81
UKUPNO	22	11.1	57	28.8	94	47.5	25	12.6	198

5.2.2. Odnos lokalizacije i metastaza u limfne čvorove na vratu

Analiza učestalosti pojavljivanja metastaza na vratu (N stadij) u odnosu na lokalizaciju primarnog tumora prikazana je u tablici 5. U ukupnom broju bolesnika 48.5% je bolesnika bez metastaza na vratu i 51.5% bolesnika s metastazama na vratu. Analiza po lokalizacijama pokazuje gotovo istu distribuciju N0 i N+ stadija za bolesnike s tumorima usne šupljine i larinksa, te za bolesnike s tumorima orofarinksa i hipofarinksa (slika 19). Kada su bolesnici grupirani na navedeni način postoji statistički značajna razlika u učestalosti tumora N0 i N+ stadija ($\chi^2=34.73$, $df=1$, $p<0.001$) (tablica 6).

Tablica 5. Odnos lokalizacije tumora i N stadija u trenutku postavljanja dijagnoze.

LOKALIZACIJA	N0		N+		UKUPNO
	n	%	n	%	
USNA ŠUPLJINA	18	66.7	9	33.3	27
OROFARINKS	12	26.1	34	73.9	46
HIPOFARINKS	11	25.0	33	75.0	44
LARINKS	55	67.9	26	32.1	81
UKUPNO	96	48.5	102	51.5	198



Slika 19. Učestalost N0 i N+ stadija bolesti po pojedinim lokalizacijama.

Tablica 6. Odnos N stadija i lokalizacija tumora (grupirani zajedno orofarinks i hipofarinks, te usna šupljina i larinks).

LOKALIZACIJA	N0		N+		UKUPNO
	n	%	n	%	
USNA ŠUPLJINA LARINKS	73	67.6	35	32.4	108
OROFARINKS HIPOFARINKS	23	25.6	67	74.4	90
UKUPNO	96	48.5	102	51.5	198

5.2.3. Odnos lokalizacije, T stadija i metastaza u limfnim čvorovima na vratu

Učinjena je analiza odnosa T stadija i pojavljivanja metastaza na vratu posebno za skupinu karcinoma usne šupljine i larinksa, te za skupinu karcinoma orofarinksa i hipofarinksa (tablica 7).

Tablica 7. Odnos veličine primarnog tumora i pojavljivanja metastaza na vratu ovisno o lokalizaciji.

	USNA ŠUPLJINA LARINKS		OROFARINKS HIPOFARINKS	
	N0	N+	N0	N+
T1-T2	36	9	6	28
T3-T4	37	26	17	39
	$\chi^2=5.42, df=1, p=0.020$		$\chi^2=1.19, df=1, p=0.275$	

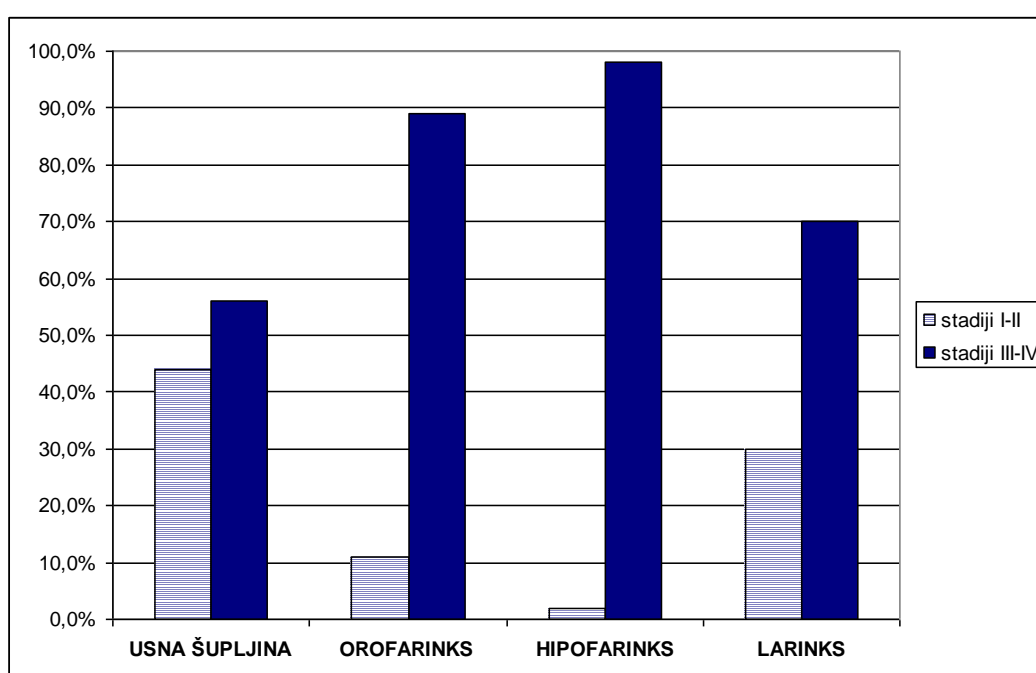
Analiza pokazuje da kod karcinoma usne šupljine i larinksa postoji statistički značajna razlika u pojavljivanju metastaza na vratu između početnih i lokalno uznapredovalih tumora, dok razlika kod karcinoma orofarinksa i hipofarinksa nije bila statistički značajna.

5.2.4. Odnos lokalizacije i stadija tumora

Analiza odnosa lokalizacija primarnog tumora i stadija bolesti u trenutku postavljanja dijagnoze prikazana je u tablici 8. Veliki broj bolesnika otkriva se u uznapredovalim stadijima bolesti, 78.8% bolesnika je u stadiju III i IV. Analiza prema lokalizacijama ponovno pokazuje razliku u učestalosti pojavljivanja početnih (stadij I i II) i uznapredovalih stadija (stadij III i IV) s tendencijom grupiranja tumora usne šupljine i larinksa, te orofarinksa i hipofarinksa (slika 20). Analiza razlike u frekvencijama pokazuje statistički značajnu razliku učestalosti početnih i uznapredovalih stadija ovisno o ovako definiranim skupinama ($\chi^2=20.89, df=1, p<0.001$) (tablica 9).

Tablica 8. Odnos lokalizacija tumora i stadija bolesti.

LOKALIZACIJA	I		II		III		IV		UKUPNO
	n	%	n	%	n	%	n	%	
USNA ŠUPLJINA	5	18.5	7	25.9	6	22.2	9	33.3	27
OROFARINKS	1	2.2	4	8.7	9	19.6	32	69.6	46
HIPOFARINKS	0	0.0	1	2.3	15	34.1	28	63.6	44
LARINKS	12	14.8	12	14.8	32	39.5	25	30.9	81
UKUPNO	18	9.1	24	12.1	62	31.3	94	47.5	198



Slika 20. Raspodjela početnih i uznapredovalih stadija bolesti ovisno o lokalizaciji.

Tablica 9. Odnos stadija bolesti (grupirani zajedno stadiji I i II, te III i IV) i lokalizacija tumora (grupirani zajedno orofarinks i hipofarinks, te usna šupljina i larinks).

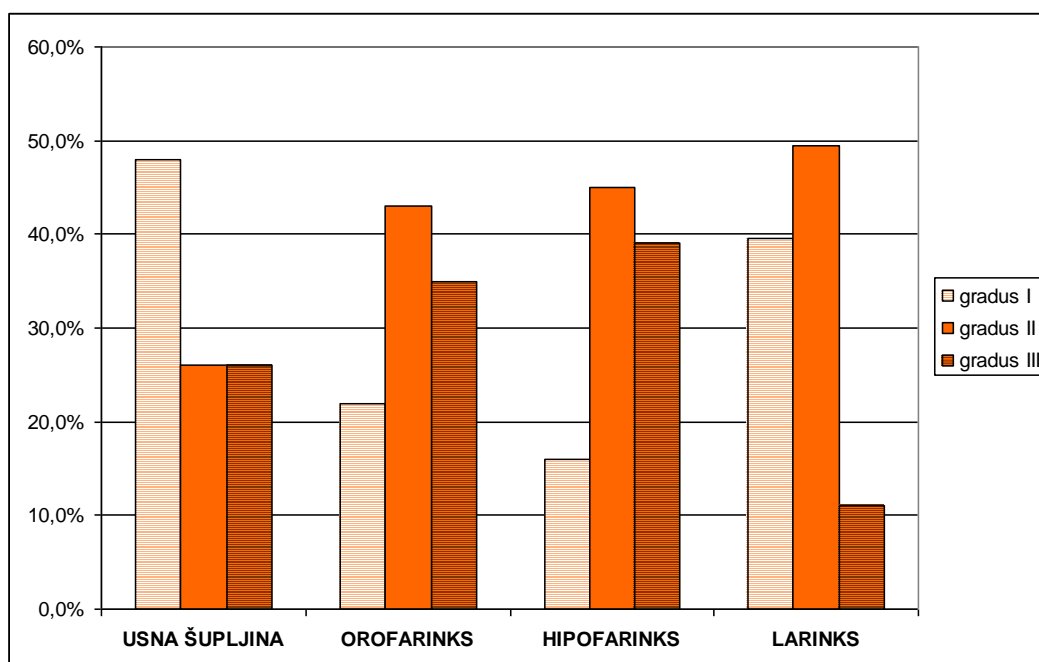
LOKALIZACIJA	I-II		III-IV		UKUPNO
	n	%	n	%	
USNA ŠUPLJINA LARINKS	36	33.3	72	66.7	108
OROFARINKS HIPOFARINKS	6	6.7	84	93.3	90
UKUPNO	42	21.2	156	78.8	198

5.2.5. Odnos lokalizacije i PH gradusa tumora

Analiza odnosa lokalizacije primarnog tumora i PH gradusa prikazana je u tablici 10. Ponovno je vidljivo slično grupiranje frekvencija u usnoj šupljini i larinksu, te u orofarinksu i hipofarinksu (slika 21). Analiza razlike u frekvencijama između skupine tumora usne šupljine i larinksa i skupine orofarinksa i hipofarinksa pokazuje statistički značajnu razliku ($\chi^2=11$, $df=3$, $p=0.012$) (tablica 11).

Tablica 10. Odnos lokalizacije primarnog tumora i PH gradusa.

LOKALIZACIJA	I		II		III		UKUPNO
	n	%	n	%	n	%	
USNA ŠUPLJINA	13	48.1	7	25.9	7	25.9	27
OROFARINKS	10	21.7	20	43.5	16	34.8	46
HIPOFARINKS	7	15.9	20	45.5	17	38.6	44
LARINKS	32	39.5	40	49.4	9	11.1	81
UKUPNO	62	31.3	87	43.9	49	24.7	198



Slika 21. Odnos PH gradusa i lokalizacija tumora.

Tablica 11. Odnos PH gradusa i lokalizacija tumora (grupirani zajedno orofarinks i hipofarinks, te usna šupljina i larinks).

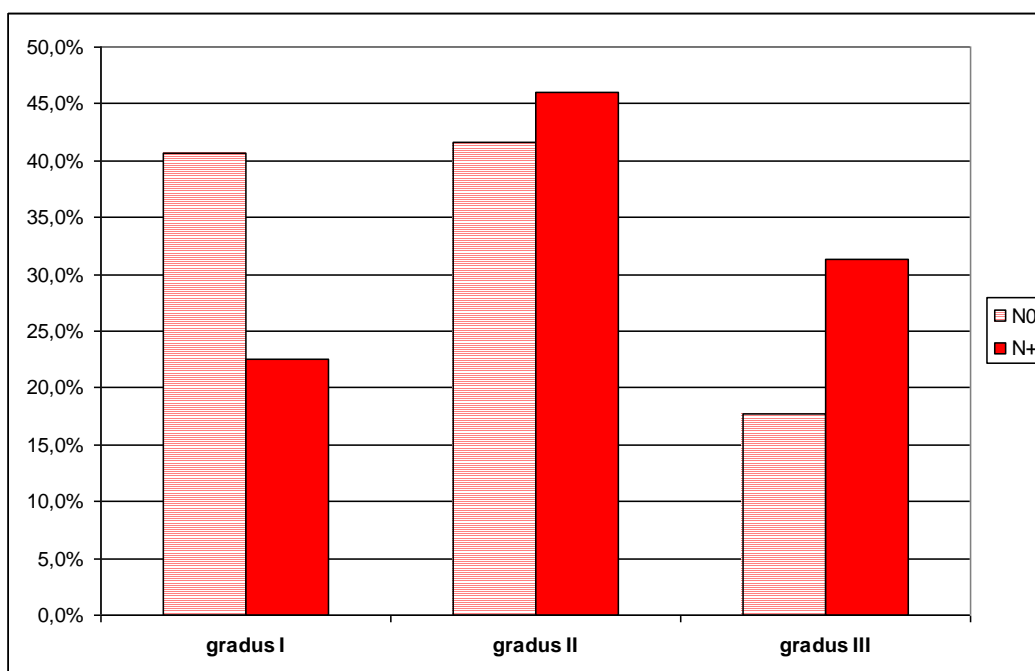
LOKALIZACIJA	I		II		III		UKUPNO
	n	%	n	%	n	%	
USNA ŠUPLJINA LARINKS	45	41.7	47	43.5	16	14.8	108
OROFARINKS HIPOFARINKS	17	18.9	40	44.4	33	36.7	90
UKUPNO	62	31.8	87	43.4	49	24.7	198

5.2.6. Odnos PH gradusa i metastaza u limfne čvorove na vratu

Analiza odnosa PH gradusa i metastaza u limfnim čvorovima prikazana je u tablici 12. Vidljiva je veća učestalost N0 statusa vrata kod dobro diferenciranih tumora, kao i veća učestalost N+ statusa vrata kod slabo diferenciranih tumora, razlika u učestalosti je statistički značajna ($\chi^2=9.11$, $df=2$, $p=0.011$) (slika 22).

Tablica 12. Odnos PH gradusa i N statusa vrata.

N	I		II		III		UKUPNO
	n	%	n	%	n	%	
N0	39	40.6	40	41.7	17	17.7	96
N+	23	22.5	47	46.1	32	31.4	102
UKUPNO	62	31.3	87	43.9	49	24.7	198



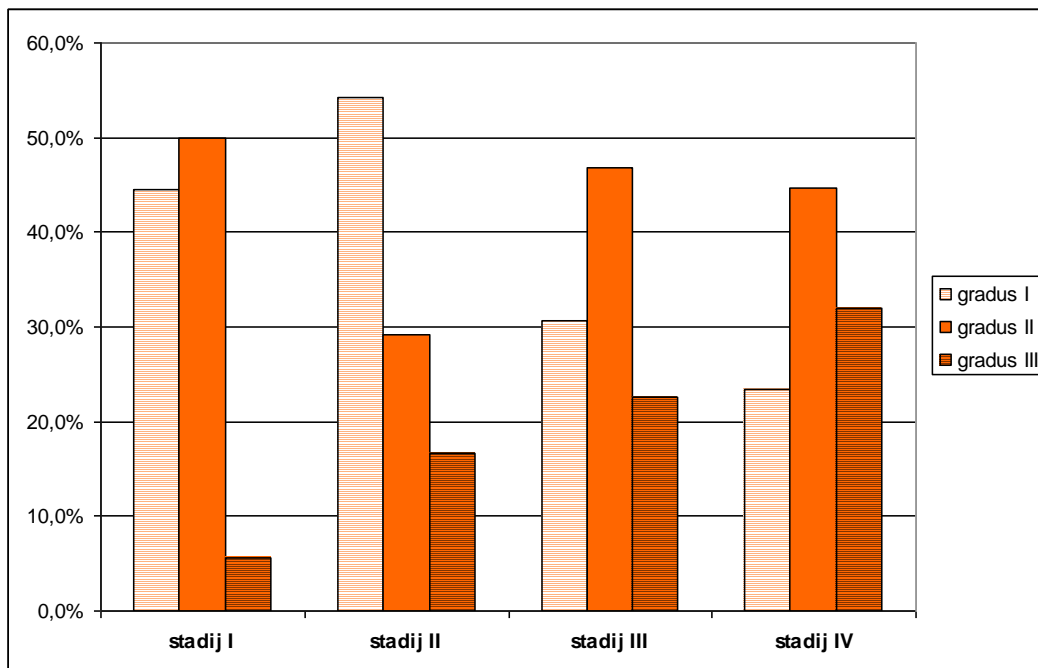
Slika 22. Odnos PH gradusa i N statusa vrata.

5.2.7. Odnos PH gradusa tumora i stadija bolesti

Analiza odnosa PH gradusa i stadija tumora prikazana je u tablici 13. Udio bolesnika s rano postavljenom dijagnozom veći je kod dobro diferenciranih tumora, a izrazito nizak (10.2%) kod slabo diferenciranih tumora (slika 23). Razlika u učestalosti tumora različitog patohistološkog gradusa u stadijima I i II u odnosu na stadije III i IV je statistički značajna ($\chi^2=9.91$, $df=2$, $p=0.007$) (tablica 14).

Tablica 13. Odnos PH gradusa tumora i stadija bolesti.

STADIJ	I		II		III		UKUPNO
	n	%	n	%	n	%	
I	8	44.3	9	50.0	1	5.6	18
II	13	54.2	7	29.2	4	16.7	24
III	19	30.6	29	46.8	14	22.6	62
IV	22	23.4	42	44.7	30	31.9	94
UKUPNO	62	31.3	87	43.9	49	24.7	198



Slika 23. Odnos PH gradusa tumora i stadija bolesti.

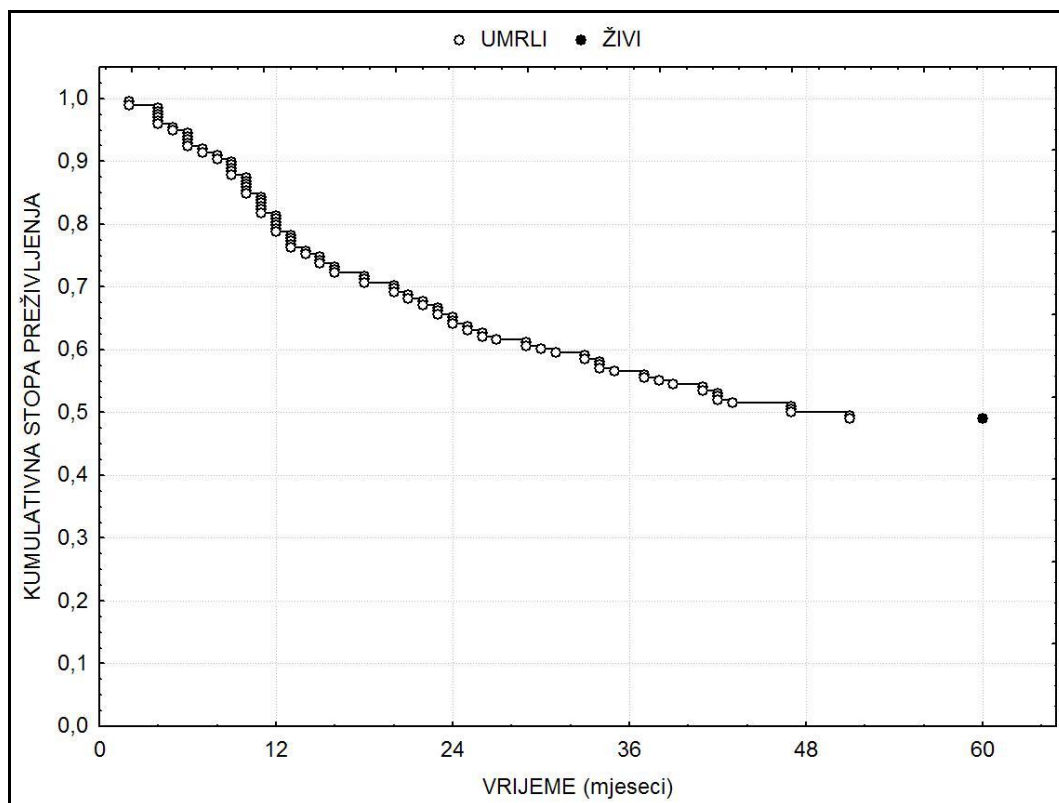
Tablica 14. Odnos PH gradusa tumora i stadija bolesti.

GRADUS	I-II		III-IV		UKUPNO
	n	%	n	%	
I	21	33.9	41	66.1	62
II	16	18.4	71	81.6	87
III	5	10.2	44	89.8	49
UKUPNO	42	21.2	156	78.8	198

5.3. ANALIZA PREŽIVLJENJA

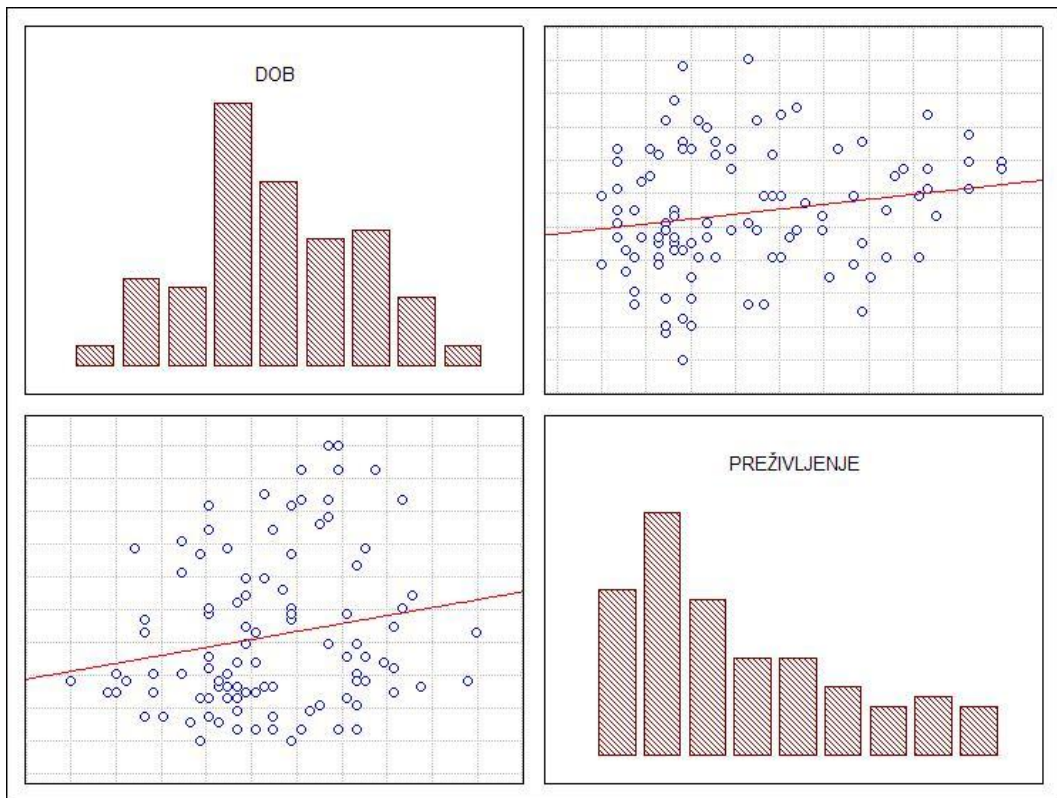
5.3.1. Ukupno preživljenje

Ukupno 5-godišnje preživljenje za 198 bolesnika iznosi 49% (slika 24). Medijan ukupnog preživljenja je 47 mjeseci, 75-ta percentila preživljenja je 14.5 mjeseci.



Slika 24. Grafički prikaz ukupnog preživljanje po Kaplan-Meieru.

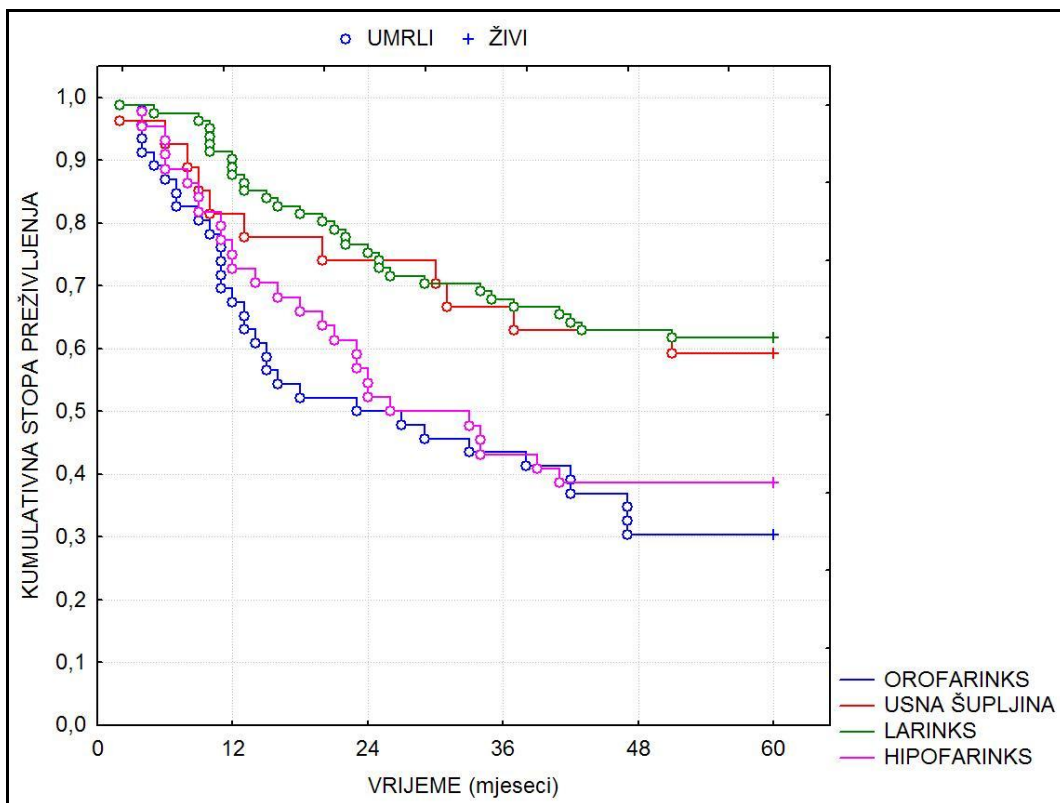
S obzirom na distribuciju bolesnika prema dobi testirano je postojanje korelacije između trenutka smrti i dobi bolesnika Spearmanovim testom korelacije ranga, te nije ustanovljena statistički značajna korelacija između trenutka smrti i dobi bolesnika (slika 25).



Slika 25. Grafički prikaz korelacije dobi i preživljenja.

5.3.2. Preživljenje ovisno o lokalizaciji

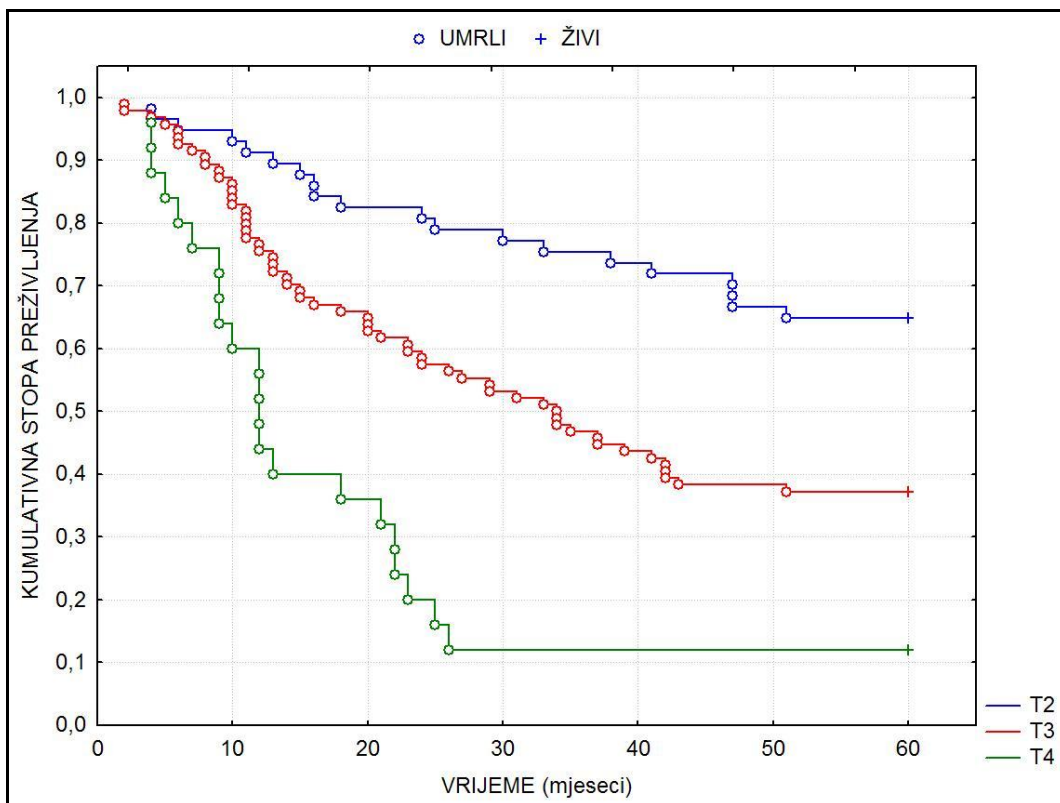
Prema lokalizacijama 5-godišnje preživljenje je 62% za tumore usne šupljine i larinksa, 39% za tumore orofarinksa (slika 26). Medijan preživljenja ovisno o lokalizaciji iznosi 60 mjeseci za tumore usne šupljine i larinksa, 25 mjeseci za tumore orofarinksa, te 29.5 mjeseci za tumore hipofarinksa. Postoji statistički značajna razlika u preživljenju ovisno o lokalizaciji tumora ($\chi^2=15.87$; $df=3$; $p=0.001$).



Slika 26. Kaplan-Meierove krivulje preživljenja ovisno o lokalizaciji primarnog tumora.

5.3.3. Preživljenje ovisno o T stadiju

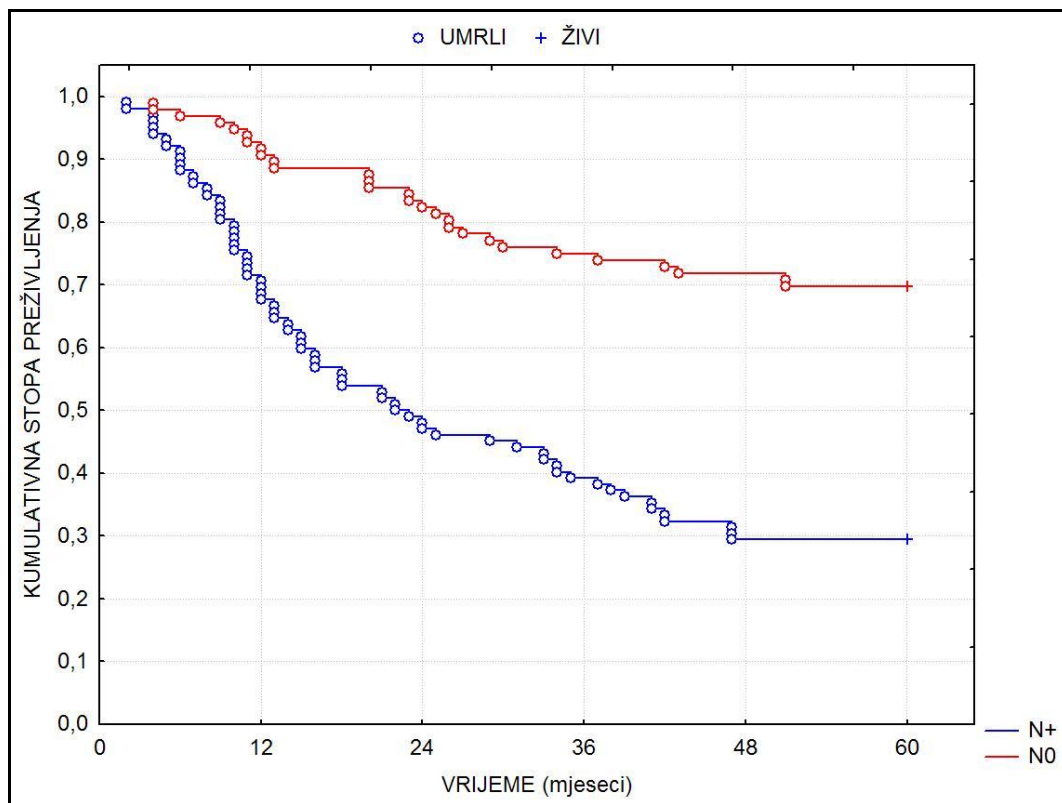
Prema veličini tumora 5-godišnje preživljenje je 100% za T1 tumore, 65% za T2 tumore, 37% za T3 tumore, te 12% za T4 tumore (slika 27). Svi bolesnici s T1 tumorima bili su živi i bez znakova bolesti nakon 60 mjeseci praćenja. Medijan preživljenja je 60 mjeseci za T2 tumore, 34 mjeseca za T3 tumore, te 12 mjeseci za T4 tumore. Postoji statistički značajna razlika u preživljenju ovisno o T stadiju tumora ($\chi^2=29.40$; $df=2$; $p<0.001$).



Slika 27. Kaplan-Meierove krivulje preživljenja ovisno o T stadiju primarnog tumora.

5.3.4. Preživljenje ovisno o N stadiju

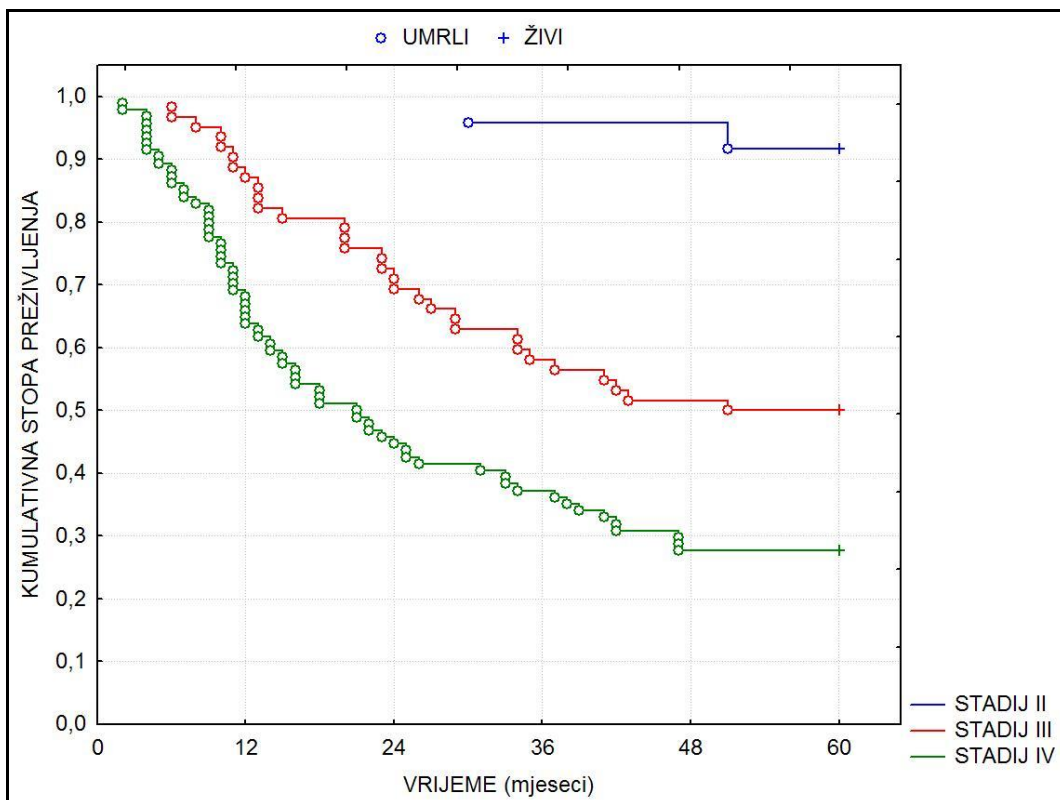
Prema N stadiju 5-godišnje preživljenje za N0 bolesnike je 70%, a za N+ 29% (slika 28). Medijan preživljenja je 60 mjeseci za N0 tumore, te 22 mjeseca za N+ tumore. Razlika u preživljenju je statistički značajna (log-rank test, $p < 0.001$).



Slika 28. Kaplan-Meierove krivulje preživljenja ovisno o N statusu vrata.

5.3.5. Preživljenje ovisno o stadiju bolesti

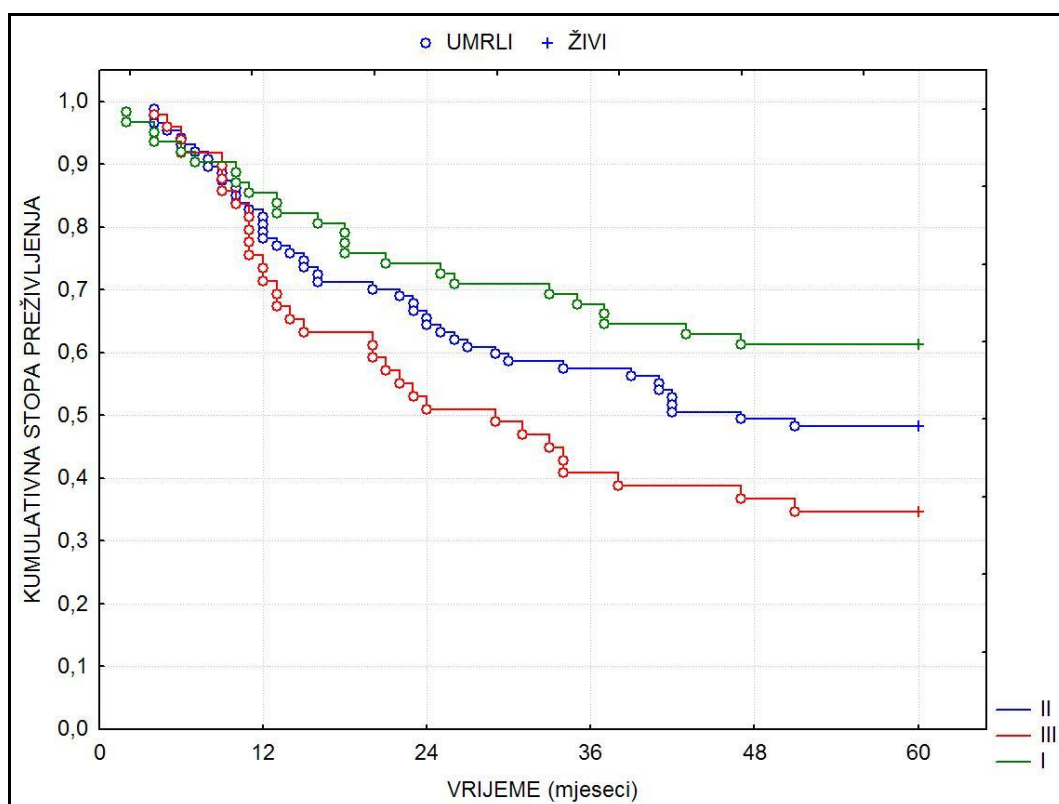
Prema stadijima bolesti 5-godišnje preživljenje je 100% za stadij I, 92% za stadij II, 50% za stadij III, te 28% za stadij IV (slika 29). Svi bolesnici kod kojih je liječenje započelo u stadiju I bolesti bili su živi i bez znakova bolesti nakon 60 mjeseci praćenja. Medijan preživljenja za stadij II je 60 mjeseci, za stadij III 55.5 mjeseci, te za stadij IV 21 mjesec. Postoji statistički značajna razlika u preživljenju ovisno o stadiju bolesti ($\chi^2=36.29$; $df=2$; $p<0.01$).



Slika 29. Kaplan-Meierove krivulje preživljenja ovisno o stadiju bolesti.

5.3.6. Preživljenje ovisno o PH gradusu

Prema PH gradusima 5-godišnje preživljenje je 63% za planocelularne karcinome gradusa I, 48% za gradus II, te 27% za gradus III (slika 30). Medijan preživljenja za tumore PH gradusa I je 60 mjeseci, za tumore gradusa II 47 mjeseci, te za tumore gradusa III 29 mjeseci. Razlika u preživljenju ovisno o PH gradusu je statistički značajna ($\chi^2=6.47$; $df=2$; $p=0.039$).



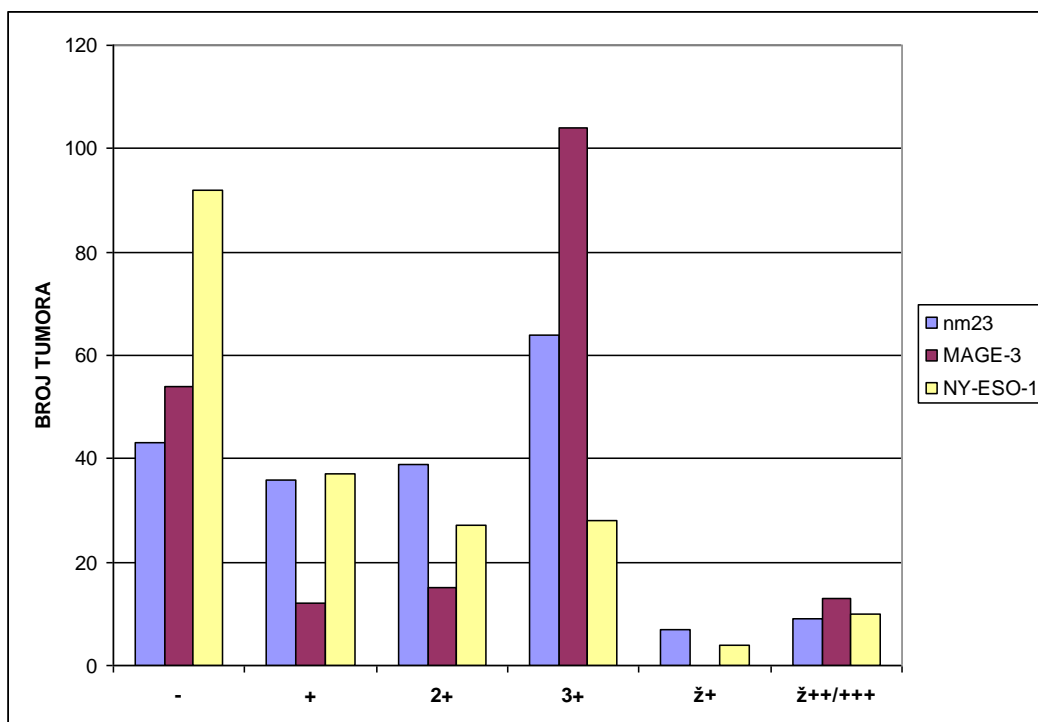
Slika 30. Kaplan-Meierove krivulje preživljenja ovisno o PH gradusu tumora.

5.4. ANALIZA IZRAŽENOSTI ISTRAŽIVANIH PROTEINA

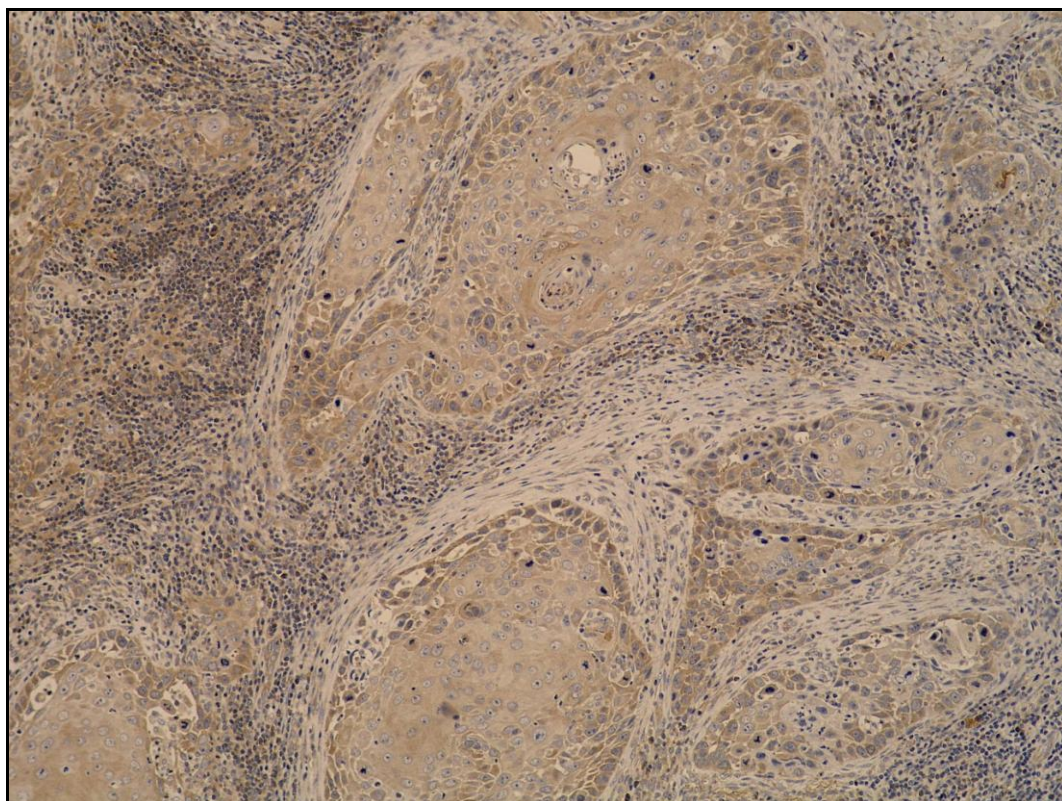
Na patohistološkim preparatima tumora odabranih bolesnika učinjena je analiza izraženosti proteinskih produkata gena nm23, MAGE-3 i NY-ESO-1. U analizu je uključeno ukupno 198 bolesnika. U tablici 15. prikazana je distribucija imunohistokemijske izraženosti proteinskih produkata analiziranih gena (slika 31). Pozitivna imunohistokemijska reakcija očitovala se smeđim obojenjem citoplazme tumorske stanice. Imunohistokemijska reakcija na protein nm23 bila je negativna u 43 bolesnika, slabo pozitivna u 38 bolesnika, umjereno pozitivna u 37 bolesnika (slika 32), jako pozitivna u 64 bolesnika, te žarišno pozitivna u 16 bolesnika. Reakcija na antigen MAGE-3 bila je negativna u 54 bolesnika, slabo pozitivna u 12 bolesnika, umjereno pozitivna u 15 bolesnika, jako pozitivna u 104 bolesnika (slika 33), te žarišno pozitivna u 13 bolesnika. Reakcija na antigen NY-ESO-1 bila je negativna u 92 bolesnika, slabo pozitivna u 38 bolesnika (slika 34), umjereno pozitivna u 26 bolesnika, jako pozitivna u 14 bolesnika, te žarišno pozitivna u 14 bolesnika.

Tablica 15. Analiza izraženosti proteina na odabranim uzorcima.

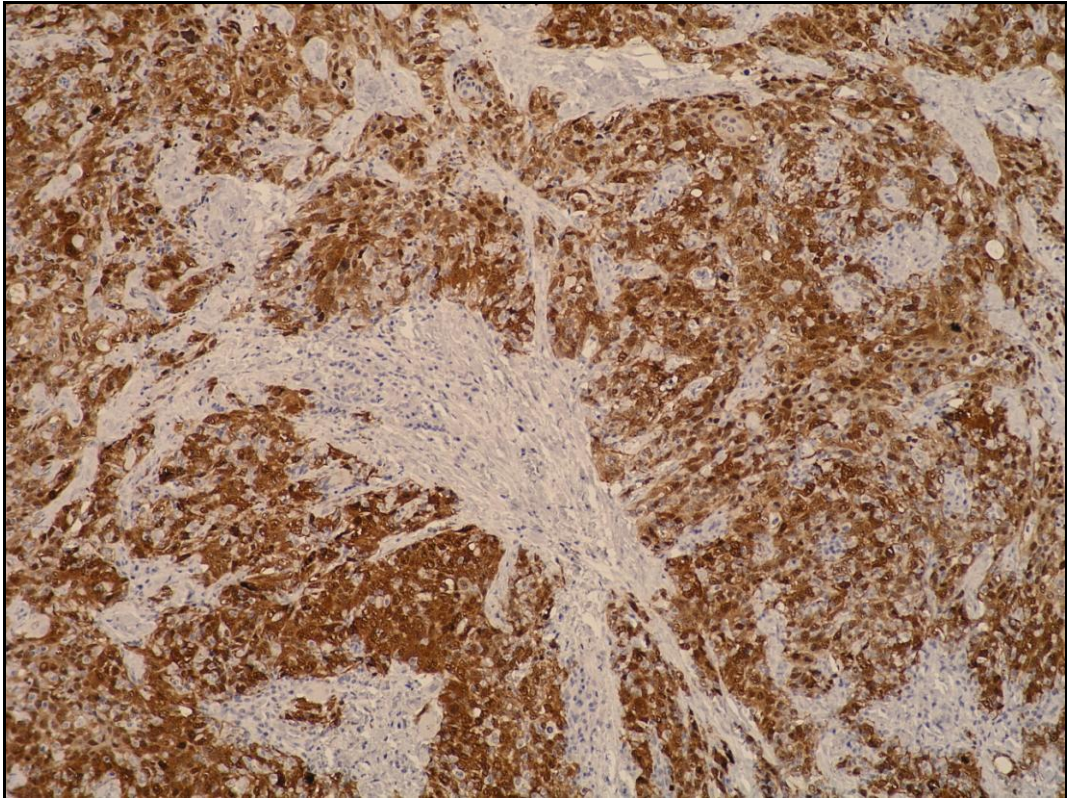
IMUNOHISTOKEMIJSKA REAKCIJA	nm23		MAGE-3		NY-ESO-1	
	n	%	n	%	n	%
negativna (-)	43	21.7	54	27.3	92	46.5
slabo pozitivna (+)	36	18.2	12	6.1	37	18.7
umjereno pozitivna (++)	39	19.7	15	7.6	27	13.6
jako pozitivna (+++)	64	32.3	104	52.5	28	14.1
žarišno slabo pozitivna (+)	7	3.5	0	0	4	2.0
žarišno pozitivna (++)/(+++)	9	4.5	13	6.6	10	5.1
UKUPNO	198	100	198	100	198	100



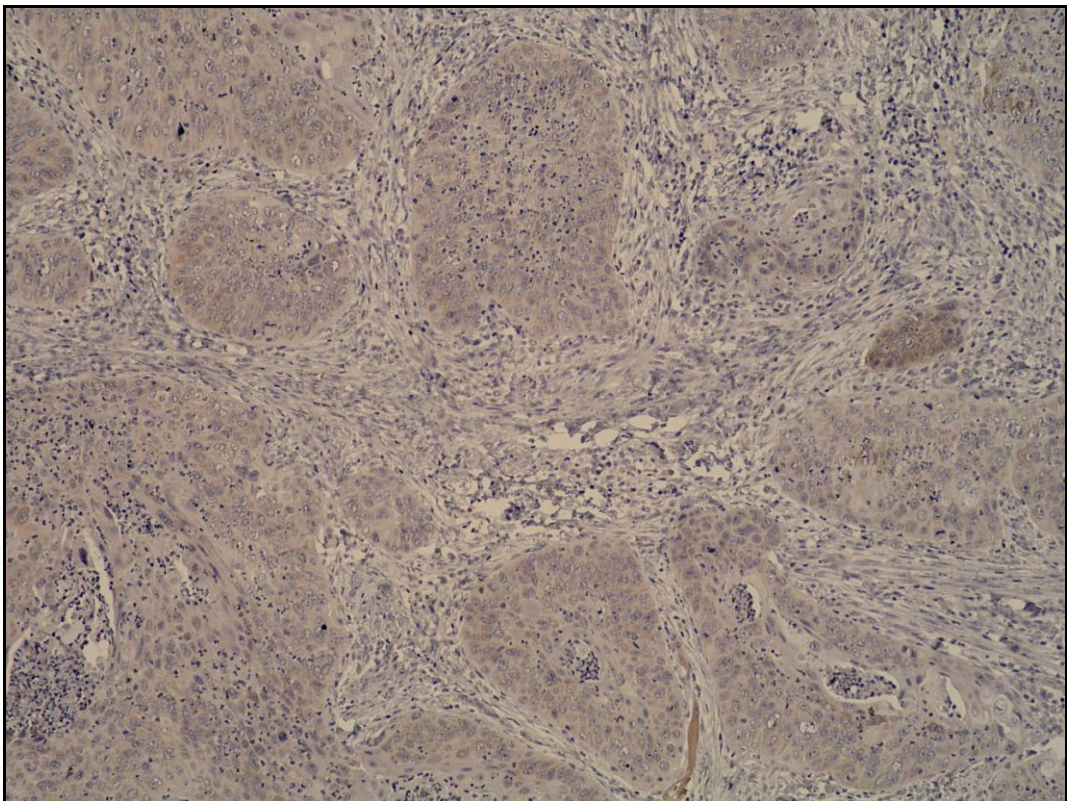
Slika 31. Raspodjela izraženosti analiziranih proteina.



Slika 32. Umjereno pozitivna (++) imunohistokemijska reakcija na proteinski produkt gena nm23 (100x).



Slika 33. Jako pozitivna (+++) imunohistokemijska reakcija na proteinski produkt gena MAGE-3 (100x).



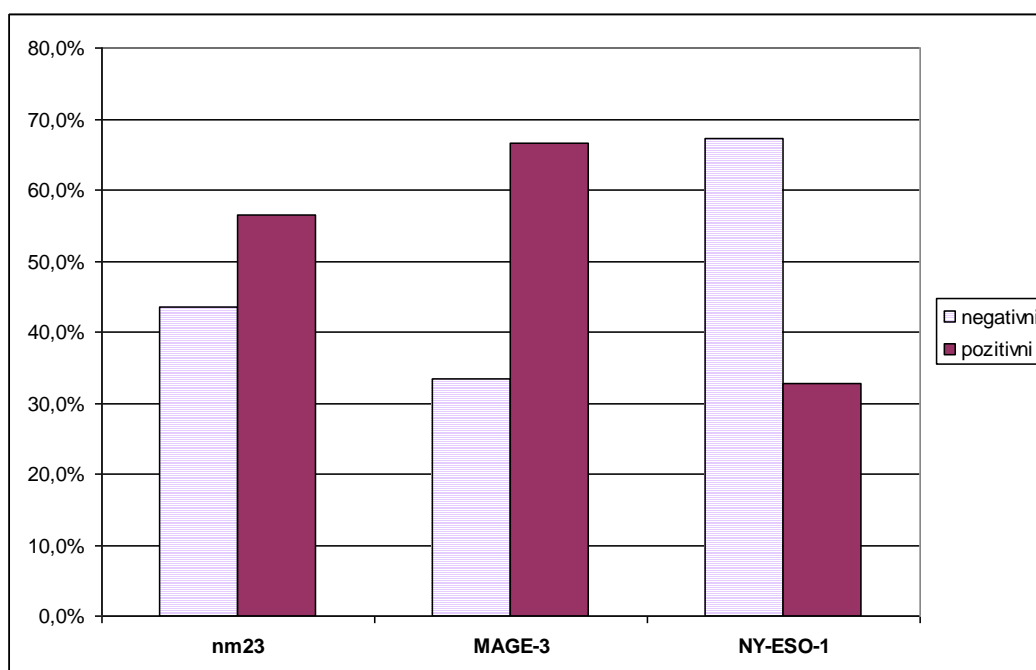
Slika 34. Slabo pozitivna (+) imunohistokemijska reakcija na proteinski produkt gena NY-ESO-1 (100x).

Za detaljniju analizu povezanosti izraženosti analiziranih proteina s do sada navedenim i analiziranim parametrima, izraženost proteina podijeljena je na negativnu i pozitivnu. Negativna izraženost proteina obuhvaća skupinu imunohistokemijski negativnih (-), slabo pozitivnih (+) i žarišno slabo pozitivnih (žarišno +), dok skupina s pozitivnom izraženošću proteina obuhvaća umjereno pozitivnu (++) , jako pozitivnu (+++) i žarišno pozitivnu (žarišno ++/+++) imunohistokemijsku reakciju. Rezultati su prikazani u tablici 16.

Tablica 16. Raspodjela izraženosti proteina (grupirani u „negativne“ i „pozitivne“ tumore).

IZRAŽENOST PROTEINA	nm23		MAGE-3		NY-ESO-1	
	n	%	n	%	n	%
negativna	86	43.4	66	33.3	133	67.2
pozitivna	112	56.6	132	66.7	65	32.8
UKUPNO	198	100	198	100	198	100

Nakon grupiranja na navedeni način izraženost nm23 proteina pozitivna je u 112 (56.6%) tumora, MAGE-3 antigena u 132 (66.7%) tumora, te NY-ESO-1 u 65 (32.8%) tumora (slika 35).



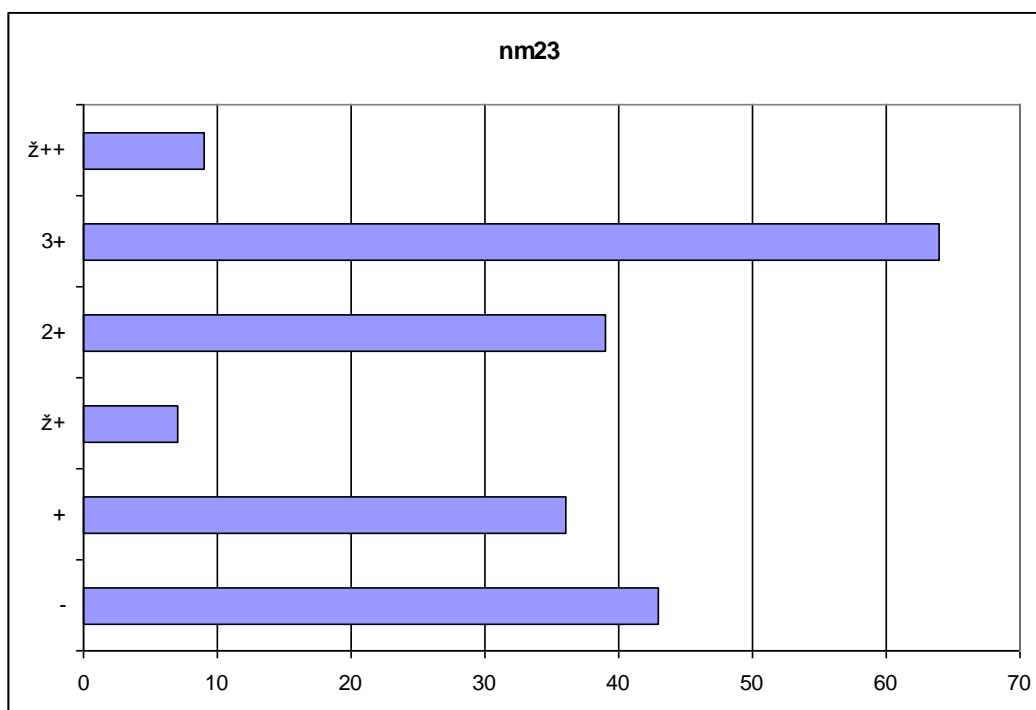
Slika 35. Grafički prikaz izraženosti proteina.

5.4.1. Analiza izraženosti nm23 proteina

Rezultati analize izraženosti proteina nm23 na odabranim tumorima prikazani su u tablicama 17, 18 i 19, te na slici 36.

Tablica 17. Izraženost proteina nm23.

IMUNOHISTOKEMIJSKA REAKCIJA	nm23		IZRAŽENOST PROTEINA
	n	%	
negativna (-)	43	21.7	negativna
slabo pozitivna (+)	36	18.2	negativna
umjereno pozitivna (++)	39	19.7	pozitivna
jako pozitivna (+++)	64	32.3	pozitivna
žarišno pozitivna (+)	7	3.5	negativna
žarišno pozitivna (++/+++)	9	4.5	pozitivna
UKUPNO	198	100	



Slika 36. Izraženost proteina nm23.

Tablica 18. Izraženost proteina nm23.

IZRAŽENOST PROTEINA	nm23	
	n	%
negativna	86	43.4
pozitivna	112	56.6
UKUPNO	198	100

U analiziranom materijalu ukupno je 56.6% nm23 pozitivnih tumora.

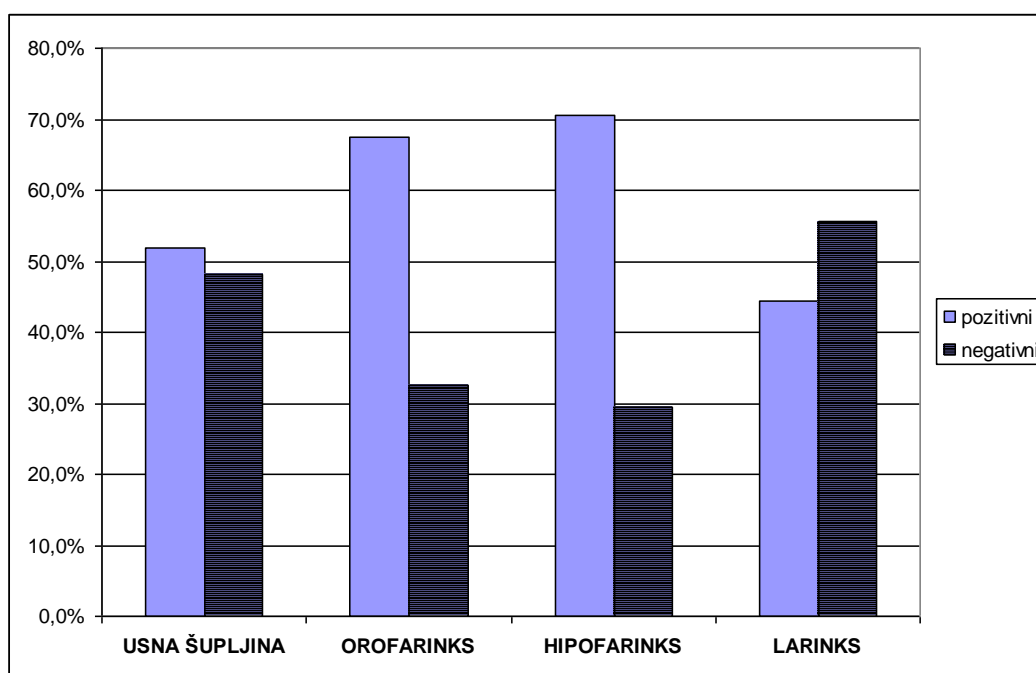
Tablica. 19. Raspodjela izraženosti proteina nm23 u ovisnosti o lokalizaciji, T stadiju,

N

stadiju i PH gradusu.

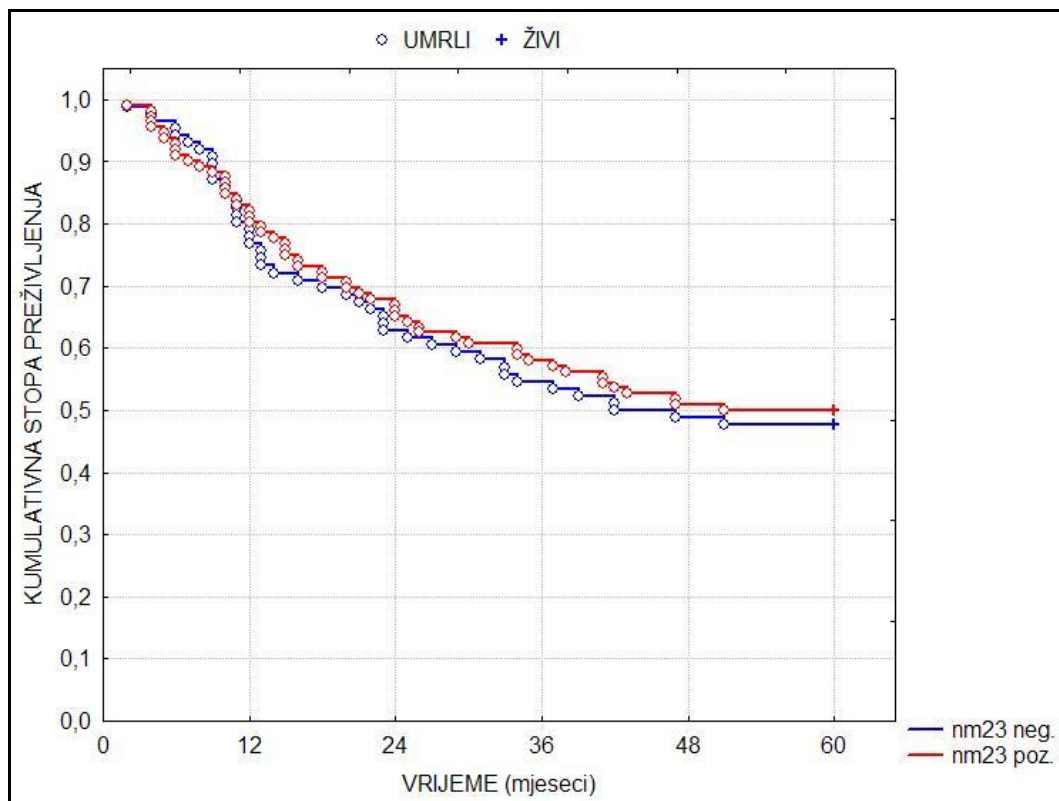
IZRAŽENOST PROTEINA nm23		neg.		poz.		UKUPNO
		BROJ	%	BROJ	%	
LOKALIZACIJA	USNA ŠUPLJINA	13	48.1	14	51.9	27
	OROFARINKS	15	32.6	31	67.4	46
	HIPOFARINKS	13	29.5	31	70.5	44
	LARINKS	45	55.6	36	44.4	81
T	T1	10	45.5	12	54.5	22
	T2	17	29.8	40	70.2	57
	T3	48	51.1	46	48.9	94
	T4	11	44.0	14	56.0	25
N	N0	41	42.7	55	57.3	96
	N+	45	44.1	57	55.9	102
PH GRADUS	I	26	41.9	36	58.1	62
	II	39	44.8	48	55.2	87
	III	21	42.9	28	57.1	49
UKUPNO		86	43.4	112	56.6	198

Analiza izraženosti nm23 proteina na po lokalizacijama pokazuje nejednoliku raspodjelu. Nm23 pozitivnih je 51.9% tumora usne šupljine, 67.4% tumora orofarinksa, 70.5% tumora hipofarinksa, te 44.4% tumora larinksa (slika 37). Analiza izraženosti nm23 proteina po veličini tumora pokazuje nešto veći udio nm23 pozitivnih T2 tumora; nm23 pozitivnih je 54.5% T1, 70.2% T2, 48.9% T3 i 56% T4 tumora. Nema razlike u izraženosti nm23 proteina između bolesnika s prisutnim metastazama na vratu i bolesnika bez metastaza na vratu, kao ni između tumora različitog patohistološkog gradusa.



Slika 37. Prikaz raspodjele nm23 pozitivnih i negativnih tumora prema različitim lokalizacijama.

U ovom istraživanju između skupina s različitom izraženosti nm23 nije bilo statistički značajne razlike u 5-godišnjem preživljenju bolesnika (log-rank test, $p=0.719$) (slika 38).



Slika 38. Kaplan-Meierove krivulje preživljenja ovisno o izraženosti nm23 proteina.

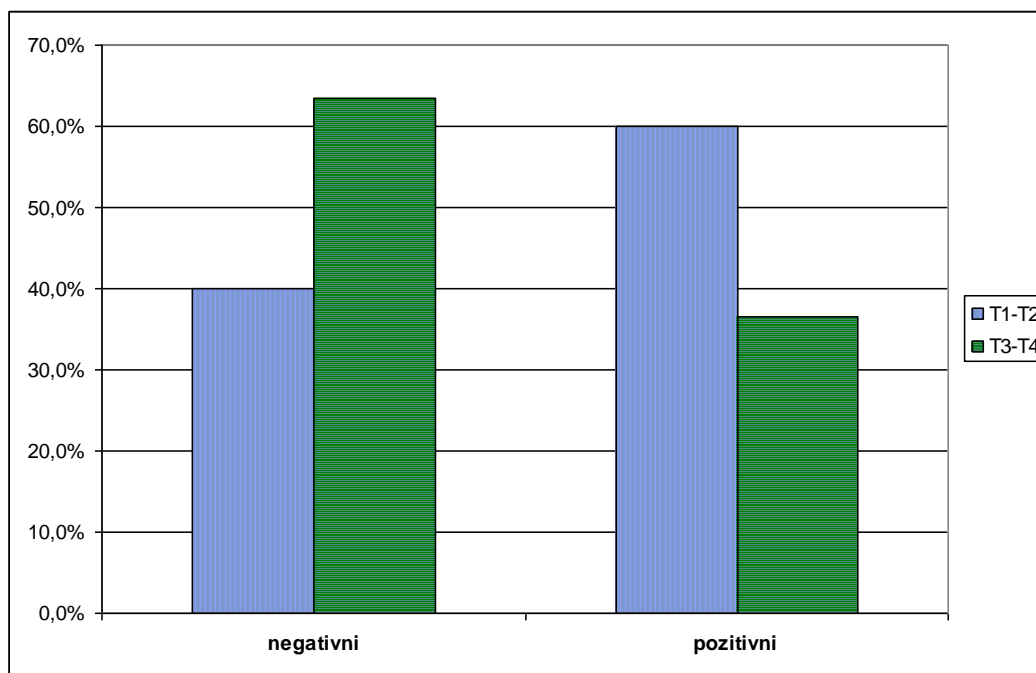
S obzirom na različito biološko ponašanje karcinoma orofarinksa i hipofarinksa od karcinoma usne šupljine i larinksa dodatna analiza učinjena je nakon podjele bolesnika u navedene dvije skupine (tablica 20).

Tablica 20. Raspodjela izraženosti proteina nm23 u dvije skupine bolesnika (prema lokalizaciji) u ovisnosti o T stadiju, N stadiju, stadiju bolesti i PH gradusu.

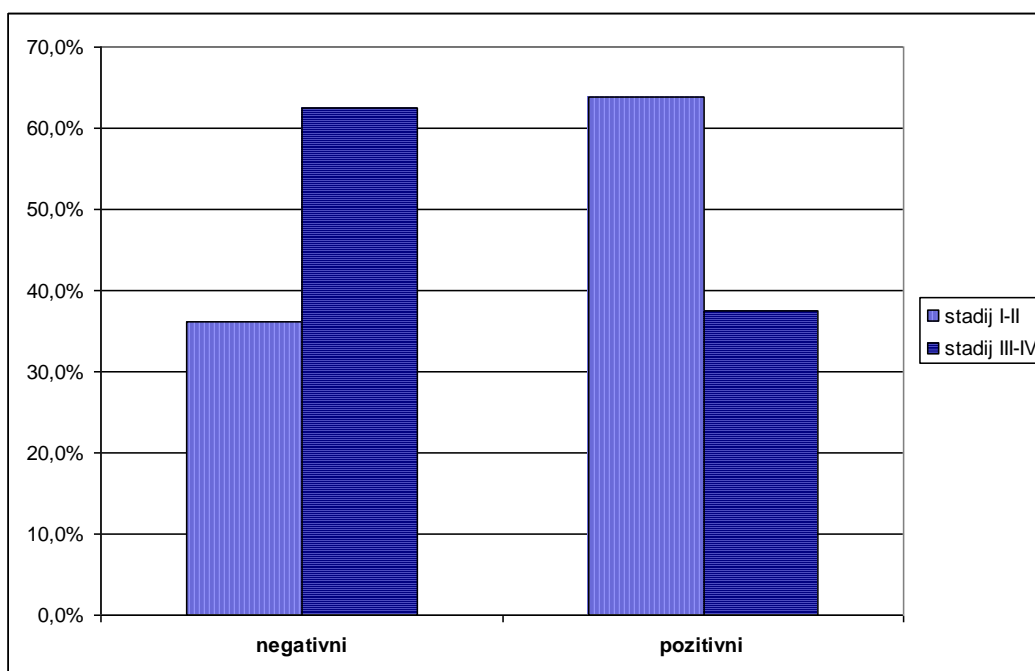
IZRAŽENOST PROTEINA nm23		USNA ŠUPLJINA I LARINKS				OROFARINKS I HIPOFARINKS			
		neg.		poz.		neg.		poz.	
		BROJ	%	BROJ	%	BROJ	%	BROJ	%
T	T1-T2	18	40.0	27	60.0	9	26.5	25	73.5
	T3-T4	40	63.5	23	36.5	19	33.9	37	66.1
N	N0	35	47.9	38	52.1	6	26.1	17	73.9
	N+	23	65.7	12	34.3	22	32.8	45	67.2
STADIJ	I-II	13	36.1	23	63.9	1	16.7	5	83.3
	III-IV	45	62.5	27	37.5	27	32.1	57	67.9
PH GRADUS	I	25	55.6	20	44.4	2	11.8	15	88.2
	II	24	51.1	23	48.9	15	37.5	25	62.5
	III	9	56.3	7	43.8	11	33.3	22	66.7
UKUPNO		58	53.7	50	46.3	28	31.1	62	68.9

U skupini bolesnika s karcinomom usne šupljine i larinksa bilo je 46.3% nm23 pozitivnih tumora. Postoji statistički značajna razlika u učestalosti pojavljivanja nm23 pozitivnih tumora između početnih i lokalno uznapredovalih tumora, pri čemu je veći udio nm23 pozitivnih (60%) u skupini T1 i T2 tumora, ($\chi^2=5.83$; $df=1$; $p=0.016$), (Slika 39). Kod tumora bez metastaza na vratu udio nm23 pozitivnih i negativnih tumora je podjednak. Kod tumora s prisutnim metastazama na vratu veći je udio nm23 negativnih (65.7%). Razlika između skupina nije statistički značajna ($\chi^2=3.00$; $df=1$; $p=0.083$). Kod tumora u početnim stadijima (I i II) veći je udio nm23 pozitivnih (63.9%), dok je u uznapredovalim stadijima veći udio nm23 negativnih tumora (62.5%), razlika je statistički značajna ($\chi^2=6.72$; $df=1$; $p=0.010$), (slika 40). Kod tumora različitog patohistološkog gradusa nema razlike u raspodjeli nm23 pozitivnih i negativnih tumora, ($\chi^2=0.236$; $df=2$; $p=0.889$).

U skupini bolesnika s karcinomima usne šupljine i larinksa nije bilo razlike u preživljenju između nm23 pozitivnih i negativnih tumora (log-rank test, $p=0.720$).



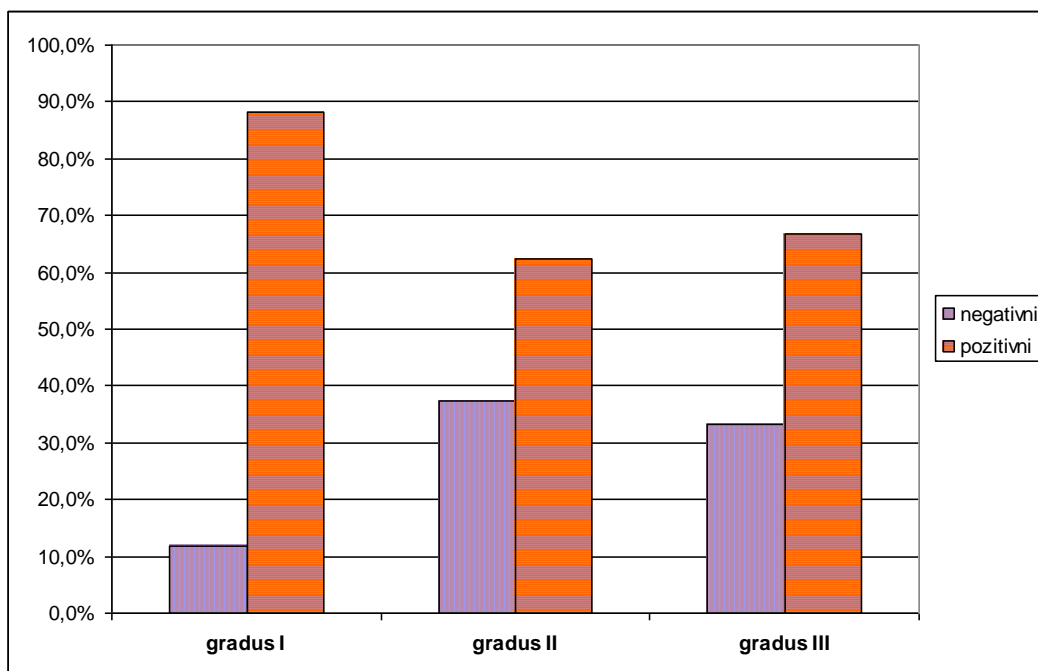
Slika 39. Prikaz raspodjele nm23 pozitivnih i negativnih tumora u skupinama početnih i lokalno uznapredovalih karcinoma usne šupljine i larinksa.



Slika 40. Prikaz raspodjele nm23 pozitivnih i negativnih tumora u skupinama početnih i uznapredovalih karcinoma usne šupljine i larinksa.

U skupini bolesnika s karcinomom orofarinksa i hipofarinksa bilo je 68.9% nm23 pozitivnih tumora. Kod početnih i lokalno uznapredovalih tumora nije bilo statistički značajne razlike u izraženosti nm23 proteina ($\chi^2=0.55$; $df=1$; $p=0.459$), kao ni između tumora s i bez metastaza u limfnim čvorovima na vratu ($\chi^2=0.12$; $df=1$; $p=0.732$). Postoji tendencija većeg udjela nm23 pozitivnih kod početnih tumora i tumora bez metastaza na vratu. Navedena tendencija vidljiva je i u razlici frekvencija kod početnih i uznapredovalih stadija bolesti, s udjelom nm23 pozitivnih u skupini početnih od 83.3%, razlika također nije statistički značajna ($\chi^2=0.11$; $df=1$; $p=0.738$). Kod tumora različitog patohistološkog gradusa veći je udio nm23 pozitivnih tumora u skupini dobro diferenciranih karcinoma, a razlika između skupina je statistički značajna ($p=0.007$), (slika 41).

U skupini bolesnika s karcinomima orofarinksa i hipofarinksa također nije bilo razlike u 5-godišnjem preživljenju između nm23 pozitivnih i negativnih tumora (log-rank test, $p=0.649$).



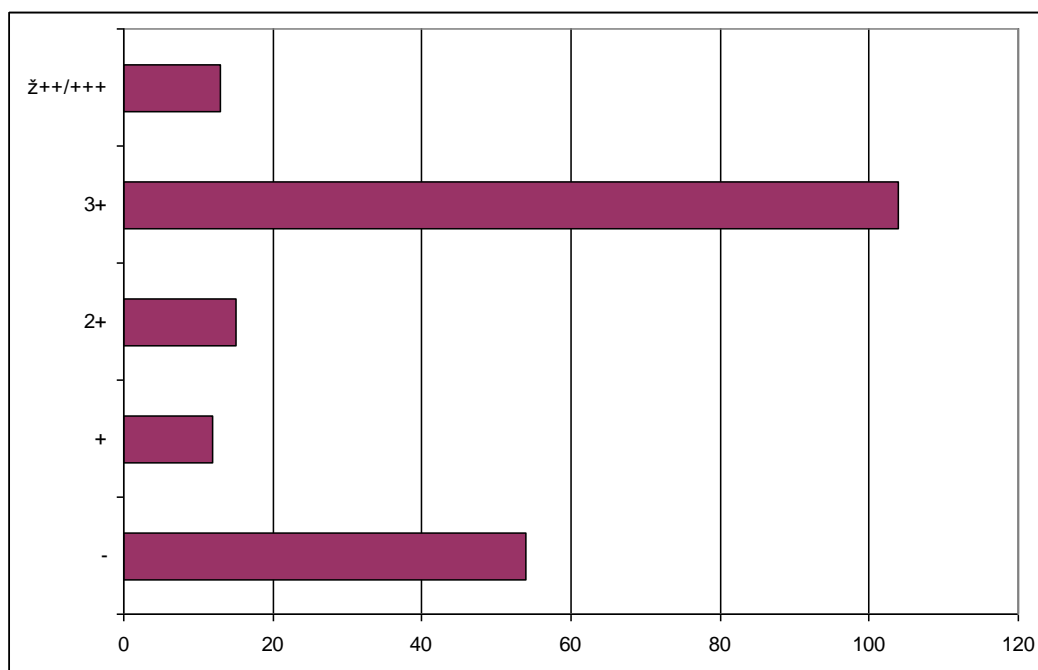
Slika 41. Prikaz raspodjele nm23 pozitivnih i negativnih tumora u skupini karcinoma orofarinksa i hipofarinksa različitog PH gradusa.

5.4.2. Analiza izraženosti MAGE-3 antigena

Rezultati analize izraženosti antigena MAGE-3 na odabranim tumorima prikazani su u tablicama 21, 22 i 23, te na slici 42.

Tablica 21. Izraženost antigena MAGE-3.

IMUNOHISTOKEMIJSKA REAKCIJA	MAGE-3		IZRAŽENOST ANTIGENA
	n	%	
negativna (-)	54	27.3	negativna
slabo pozitivna (+)	12	6.1	negativna
umjereno pozitivna (++)	15	7.6	pozitivna
jako pozitivna (+++)	104	52.5	pozitivna
žarišno pozitivna (++/+++)	13	6.6	pozitivna
UKUPNO	198	100	



Slika 42. Izraženost antigena MAGE-3.

Tablica 22. Izraženost antigena MAGE-3.

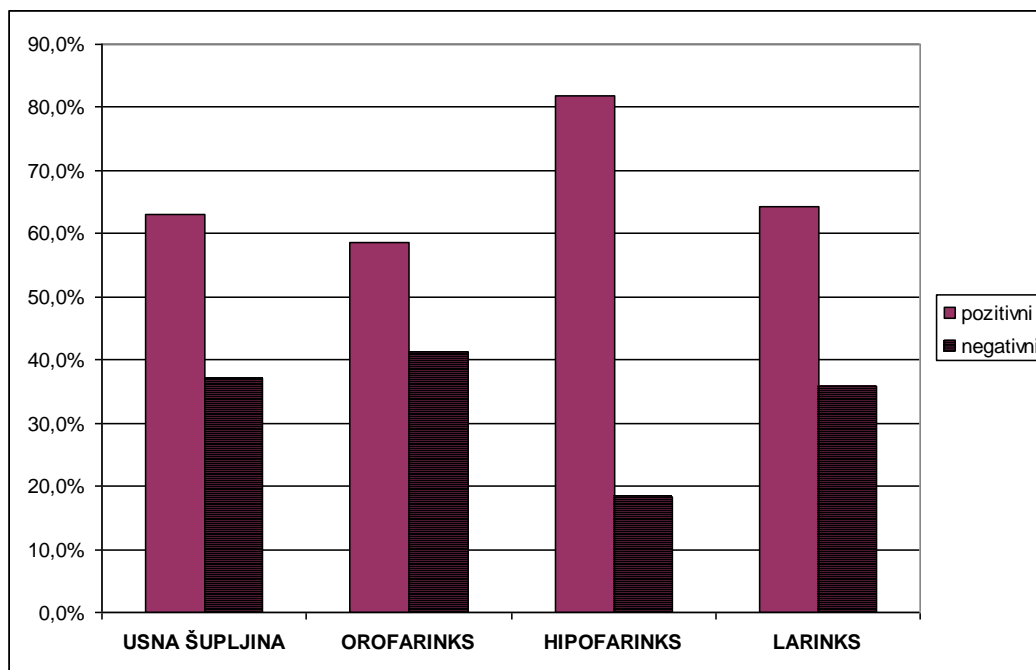
IZRAŽENOST ANTIGENA	MAGE-3	
	n	%
negativna	66	33.3
pozitivna	132	66.7
UKUPNO	198	7.6

U analiziranom materijalu ukupno je 66.7% MAGE-3 pozitivnih tumora.

Tablica 23. Raspodjela izraženosti antigena MAGE-3 u ovisnosti o lokalizaciji, T stadiju, N stadiju i PH gradusu.

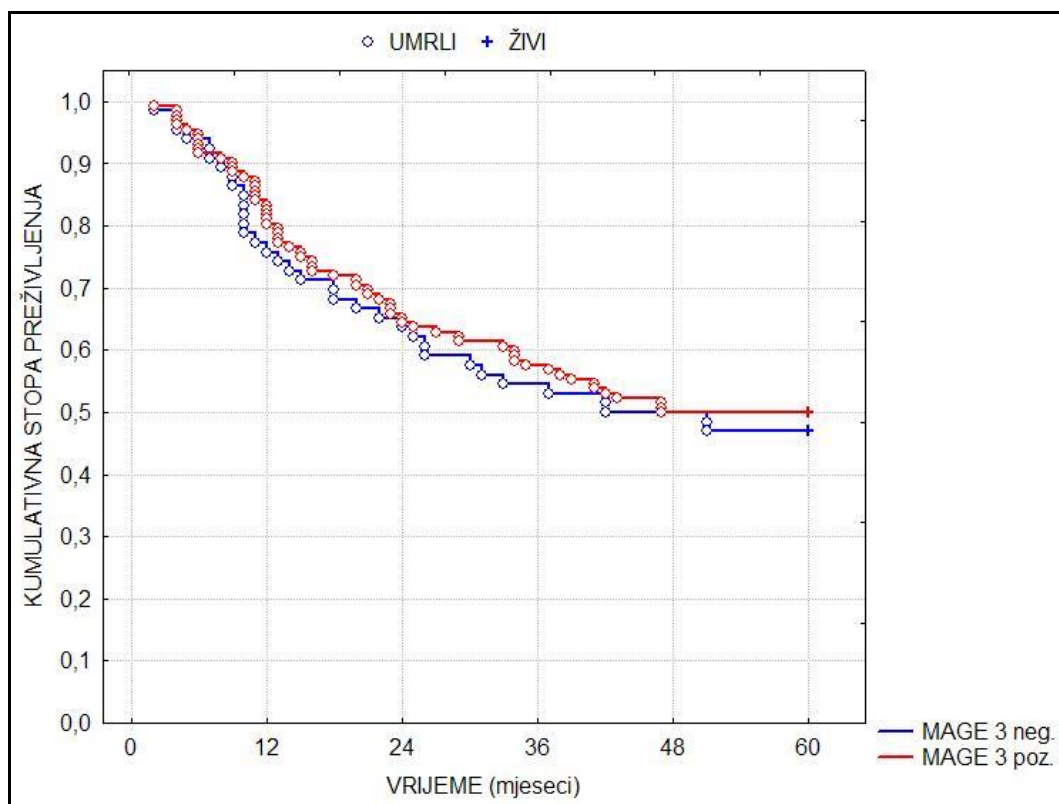
IZRAŽENOST ANTIGENA MAGE-3		neg.		poz.		UKUPNO
		BROJ	%	BROJ	%	
LOKALIZACIJA	USNA ŠUPLJINA	10	37.0	17	63.0	27
	OROFARINKS	19	41.3	27	58.7	46
	HIPOFARINKS	8	18.2	36	81.8	44
	LARINKS	29	35.8	52	64.2	81
T	T1	11	50.0	11	50.0	22
	T2	17	29.8	40	70.2	57
	T3	28	29.8	66	70.2	94
	T4	10	40.0	15	60.0	25
N	N0	31	32.3	65	67.7	96
	N+	35	34.3	67	65.7	102
PH GRADUS	I	24	38.7	38	61.3	62
	II	27	31.0	60	69.0	87
	III	15	30.6	34	69.4	49
UKUPNO		66	33.3	132	66.7	198

Udio MAGE-3 pozitivnih tumora podjednak je za tumore usne šupljine (63%), orofarinksa (58.7%) i larinksa (64.2%), dok je nešto veći kod tumora hipofarinksa (81.8%), (slika 43). Kod tumora različite veličine (T), različitog N stadija i različitog PH gradusa nema značajnih razlika u udjelu MAGE-3 pozitivnih i negativnih tumora.



Slika 43. Prikaz raspodjele MAGE-3 pozitivnih i negativnih tumora prema različitim lokalizacijama.

Analizirajući ukupno 5-godišnje preživljenje na našem uzorku nema razlike između MAGE-3 pozitivnih i negativnih tumora (log-rank test, $p=0.629$), (slika 44).



Slika 44. Kaplan-Meierove krivulje preživljenja ovisno o izraženosti MAGE-3 antigena.

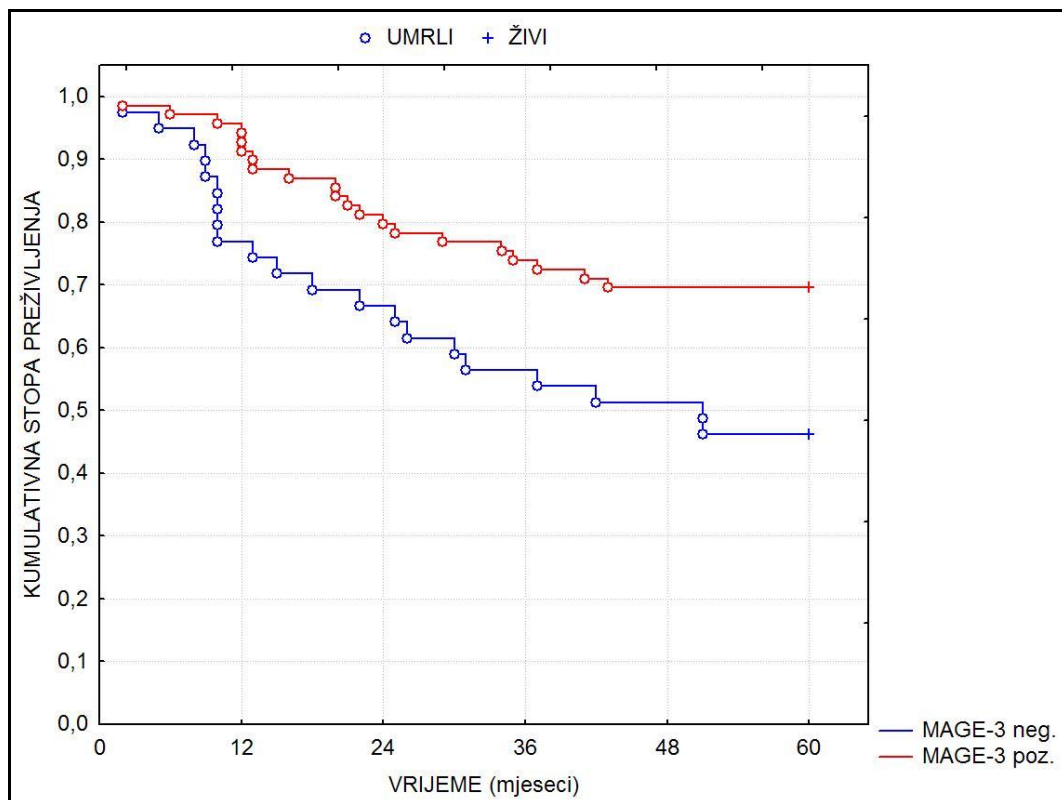
S obzirom na različito biološko ponašanje karcinoma orofarinksa i hipofarinksa od karcinoma usne šupljine i larinksa dodatna analiza učinjena je nakon podjele bolesnika u navedene dvije skupine (tablica 24).

Tablica 24. Raspodjela izraženosti antigena MAGE-3 u dvije skupine bolesnika (prema lokalizaciji) u ovisnosti o T stadiju, N stadiju, stadiju bolesti i PH gradu.

IZRAŽENOST ANTIGENA MAGE-3		USNA ŠUPLJINA I LARINKS				OROFARINKS I HIPOFARINKS			
		neg.		poz.		neg.		poz.	
		BROJ	%	BROJ	%	BROJ	%	BROJ	%
T	T1-T2	18	40.0	27	60.0	10	29.4	24	70.6
	T3-T4	21	33.3	42	66.7	17	30.4	39	69.6
N	N0	22	30.1	51	69.9	9	39.1	14	60.9
	N+	17	48.6	18	51.4	18	26.9	49	73.1
STADIJ	I-II	13	36.1	23	63.9	3	50.0	3	50.0
	III-IV	26	36.1	46	63.9	24	28.6	60	71.4
PH GRADUS	I	17	37.8	28	62.2	7	41.2	10	58.8
	II	26	34.0	31	66.6	11	27.5	29	72.5
	III	6	37.5	10	62.5	9	27.3	24	72.7
UKUPNO		39	36.1	69	63.9	27	30.0	63	70.0

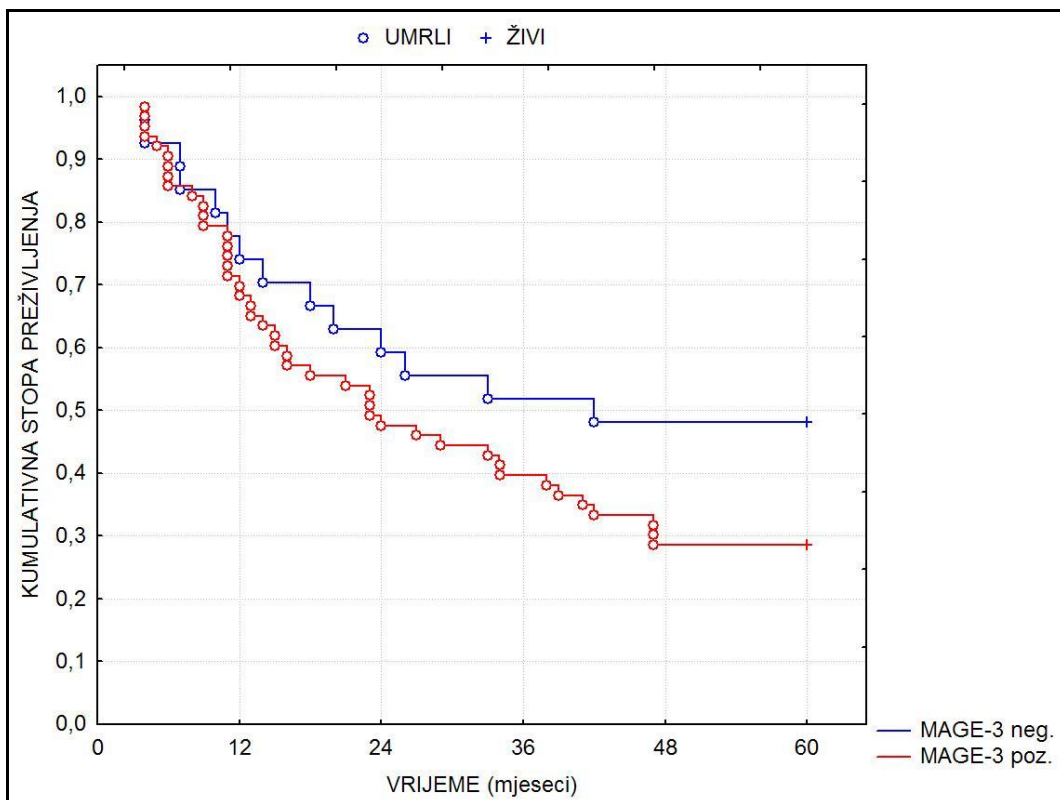
U skupini bolesnika s karcinomom usne šupljine i larinksa ukupno je 63.9% MAGE-3 pozitivnih tumora. Raspodjela je ujednačena u svim analiziranim podskupinama, ne postoji statistički značajna razlika ovisno o veličini tumora ($\chi^2=3.74$; $df=1$; $p=0.053$), prisutnosti metastaza ($\chi^2=3.48$; $df=1$; $p=0.062$), stadiju bolesti u trenutku postavljanja dijagnoze, kao ni o PH gradusu tumora ($\chi^2=0.759$; $df=2$; $p=0.684$).

Analiza preživljenja u skupini bolesnika s karcinomima usne šupljine i larinksa (slika 45) pokazuje bolje preživljenje kod MAGE-3 pozitivnih tumora, razlika između skupina je statistički značajna (log-rank test, $p=0.015$).



Slika 45. Kaplan-Meierove krivulje preživljenja karcinoma usne šupljine i larinksa ovisno o izraženosti MAGE-3 antigena.

U skupini bolesnika s karcinomom orofarinksa i hipofarinksa ukupno je 70% MAGE-3 pozitivnih tumora. Raspodjela je također ujednačena u svim analiziranim podskupinama, ne postoji statistički značajna razlika ovisno o veličini tumora ($\chi^2=0.01$; $df=1$; $p=0.924$), prisutnosti metastaza ($\chi^2=0.71$; $df=1$; $p=0.399$), stadiju bolesti u trenutku postavljanja dijagnoze ($\chi^2=0.42$; $df=1$; $p=0.519$), kao ni o PH gradusu tumora ($\chi^2=1.25$; $df=2$; $p=0.536$). Analiza preživljenja u skupini bolesnika s karcinomima orofarinksa i hipofarinksa (slika 46) pokazuje bolje preživljenje kod MAGE-3 negativnih tumora, ali razlika između skupina nije statistički značajna (log-rank test, $p=0.122$).



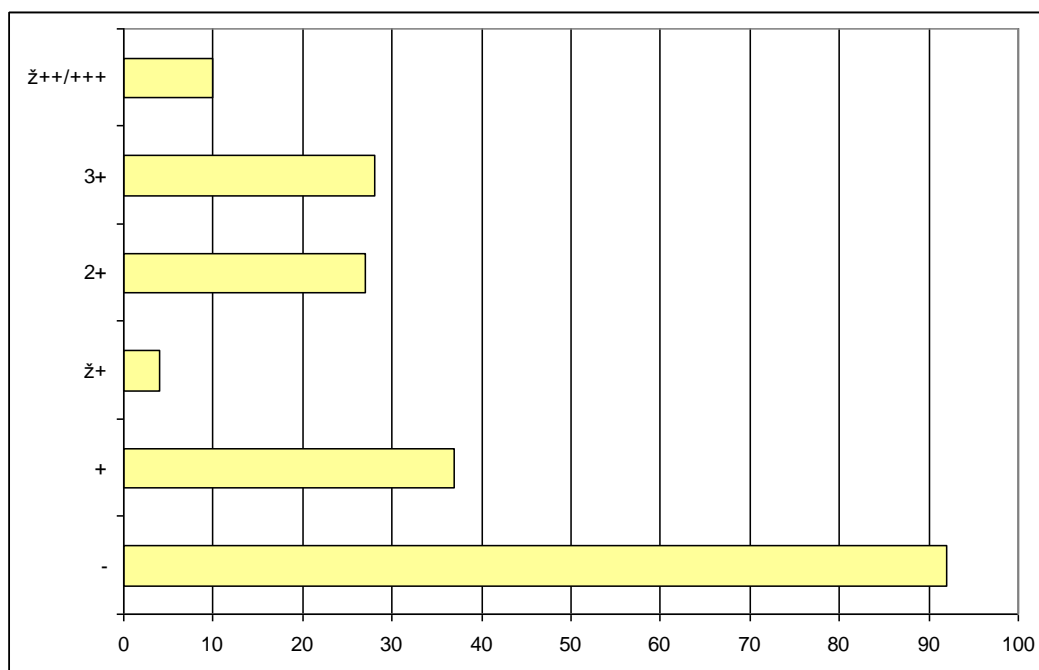
Slika 46. Kaplan-Meierove krivulje preživljenja karcinoma orofarinksa i hipofarinksa ovisno o izraženosti MAGE-3 antigena.

5.4.3. Analiza izraženosti NY-ESO-1 antigena

Rezultati analize izraženosti antigena NY-ESO-1 na odabranim tumorima prikazani su u tablicama 25, 26 i 27, te na slici 47.

Tablica 25. Izraženost antigena NY-ESO-1.

IMUNOHISTOKEMIJSKA REAKCIJA	NY-ESO-1		IZRAŽENOST ANTIGENA
	n	%	
negativna (-)	92	46.5	negativna
slabo pozitivna (+)	37	18.7	negativna
umjereno pozitivna (++)	27	13.6	pozitivna
jako pozitivna (+++)	28	14.1	pozitivna
žarišno pozitivna (+)	4	2.0	negativna
žarišno pozitivna (++)/+++)	10	5.1	pozitivna
UKUPNO	198	100	



Slika 47. Izraženost antigena NY-ESO-1.

Tablica 26. Izraženost antigena NY-ESO-1.

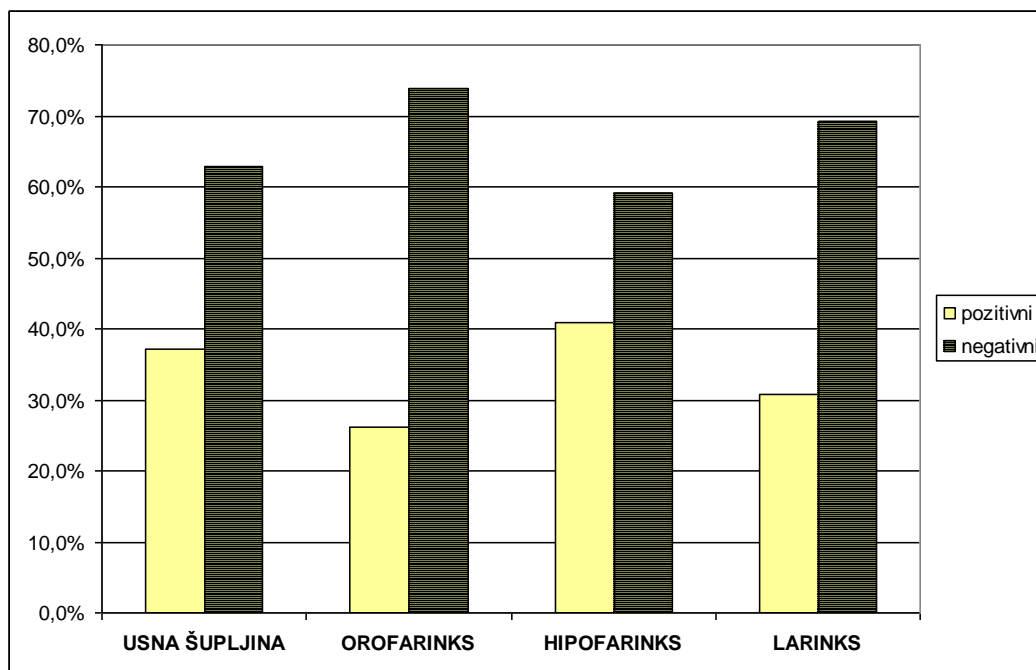
IZRAŽENOST ANTIGENA	NY-ESO-1	
	n	%
negativna	133	65.7
pozitivna	65	34.3
UKUPNO	198	100

U analiziranom materijalu ukupno je 34.3% NY-ESO-1 pozitivnih tumora.

Tablica 27. Raspodjela izraženosti antigena NY-ESO-1 u ovisnosti o lokalizaciji, T stadiju, N stadiju i PH gradusu

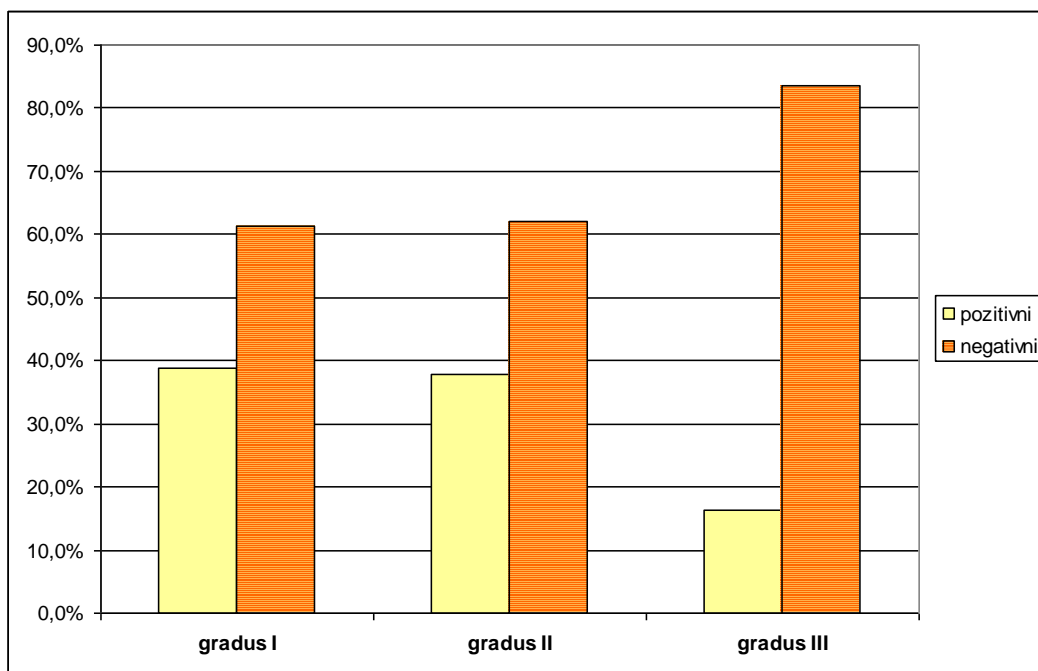
IZRAŽENOST ANTIGENA NY-ESO-1		neg.		poz.		UKUPNO
		BROJ	%	BROJ	%	
LOKALIZACIJA	USNA ŠUPLJINA	17	63.0	10	37.0	27
	OROFARINKS	34	73.9	12	26.1	46
	HIPOFARINKS	26	59.1	18	40.9	44
	LARINKS	56	69.1	25	30.9	81
T	T1	19	86.4	3	13.6	22
	T2	39	68.4	18	31.6	57
	T3	55	58.5	39	41.5	94
	T4	20	80.0	5	20.0	25
N	N0	61	63.5	35	36.5	96
	N+	72	70.6	30	29.4	102
PH GRADUS	I	38	61.3	24	38.7	62
	II	54	62.1	33	37.9	87
	III	41	83.7	8	16.3	49
UKUPNO		133	67.2	65	32.8	198

Analiza izraženosti NY-ESO-1 antigena u različitim lokalizacijama pokazuje 37% pozitivnih tumora usne šupljine, 26.1% tumora orofarinksa, 40.9% tumora hipofarinksa i 30.9% tumora larinksa (slika 48). Prema veličini tumora NY-ESO-1 pozitivnih je 13.6% T1, 31.6% T2, 41.5% T3 i 20% T4 tumora. Po N stadiju NY-ESO-1 pozitivnih je 36.5% N0 tumora i 29.4% N+ tumora. Po gradusima tumora NY-ESO pozitivnih je 38.7% gradus I tumora, 37.9% gradus II tumora i 16.3% gradus III tumora (slika 49).

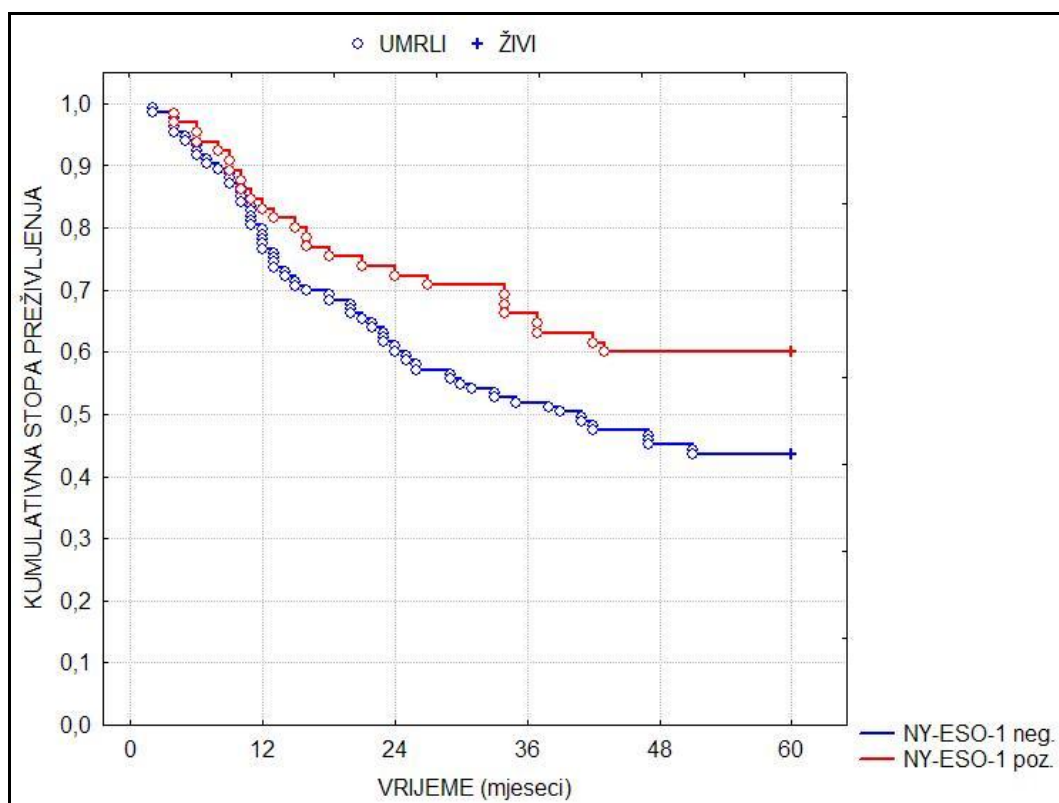


Slika 48. Prikaz raspodjele NY-ESO-1 pozitivnih i negativnih tumora prema različitim lokalizacijama.

Analiza 5-godišnjeg preživljenja pokazuje bolje preživljenje bolesnika s NY-ESO-1 pozitivnim tumorima, a razlika između skupina je statistički značajna (log-rank test, $p=0.035$), (slika 50).



Slika 49. Prikaz raspodjele NY-ESO-1 pozitivnih i negativnih tumora ovisno o PH gradusu.



Slika 50. Kaplan-Meierove krivulje preživljenja ovisno o izraženosti NY-ESO-1 antigena.

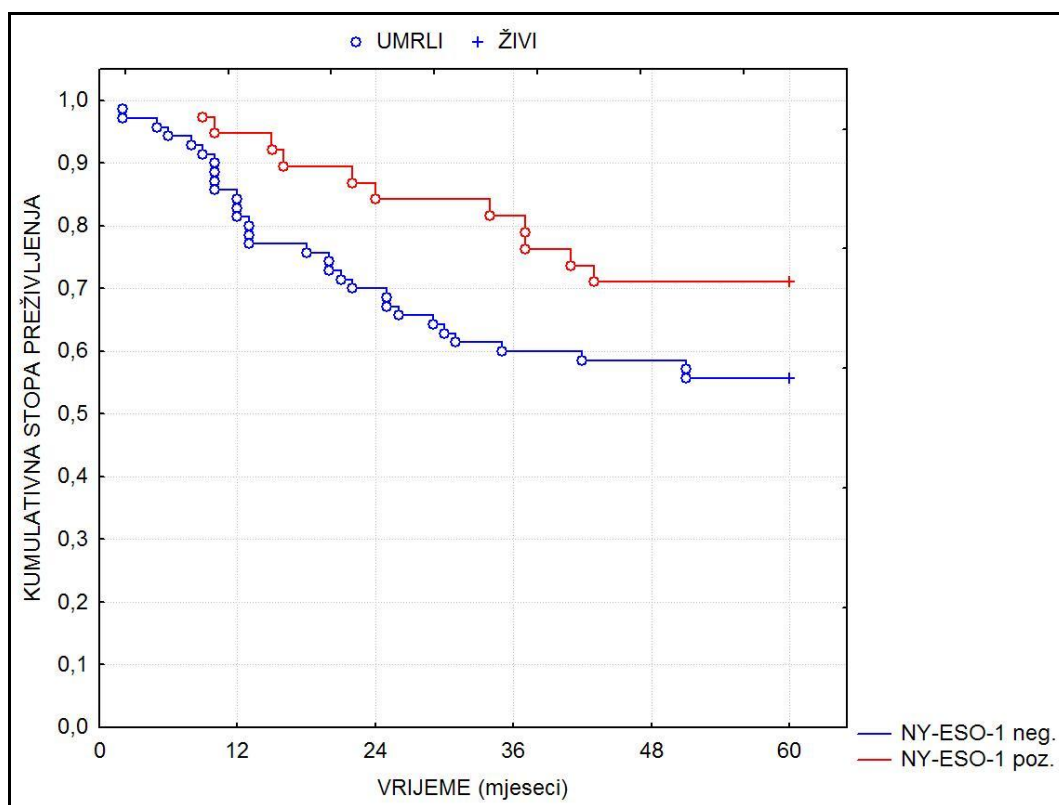
S obzirom na različito biološko ponašanje karcinoma orofarinksa i hipofarinksa od karcinoma usne šupljine i larinksa dodatna analiza učinjena je nakon podjele bolesnika u navedene dvije skupine (tablica 28).

Tablica 28. Raspodjela izraženosti antigena NY-ESO-1 u dvije skupine bolesnika (prema lokalizaciji) u ovisnosti o T stadiju, N stadiju, stadiju bolesti i PH gradu.

IZRAŽENOST ANTIGENA NY-ESO-1		USNA ŠUPLJINA I LARINKS				OROFARINKS I HIPOFARINKS			
		neg.		poz.		neg.		poz.	
		BROJ	%	BROJ	%	BROJ	%	BROJ	%
T	T1-T2	33	73.3	12	26.7	25	73.5	9	26.5
	T3-T4	40	63.5	23	36.5	35	62.5	21	37.5
N	N0	47	64.4	26	35.6	14	60.9	9	39.1
	N+	26	74.3	9	25.7	46	68.7	21	31.3
STADIJ	I-II	26	72.2	10	27.8	4	66.7	2	33.3
	III-IV	47	65.3	25	34.7	56	66.7	28	33.3
PH GRADUS	I	29	64.4	16	35.6	9	52.9	8	47.1
	II	30	63.8	17	36.2	24	60.0	16	40.0
	III	14	87.5	2	12.5	27	81.8	6	18.2
UKUPNO		73	67.6	35	32.4	60	66.7	30	33.3

U skupini bolesnika s karcinomom usne šupljine i larinksa ukupno je 32.4% NY-ESO-1 pozitivnih tumora. Raspodjela je ujednačena u svim analiziranim podskupinama osim ovisno o PH gradusu. Ne postoji statistički značajna razlika ovisno o veličini tumora ($\chi^2=1.16$; $df=1$; $p=0.281$), prisutnosti metastaza na vratu ($\chi^2=1.06$; $df=1$; $p=0.304$) i stadiju bolesti u trenutku postavljanja dijagnoze ($\chi^2=0.53$; $df=1$; $p=0.467$). Postoji statistički značajna razlika u učestalosti pojavljivanja NY-ESO-1 pozitivnih tumora ovisno o PH gradusu tumora ($p=0.007$).

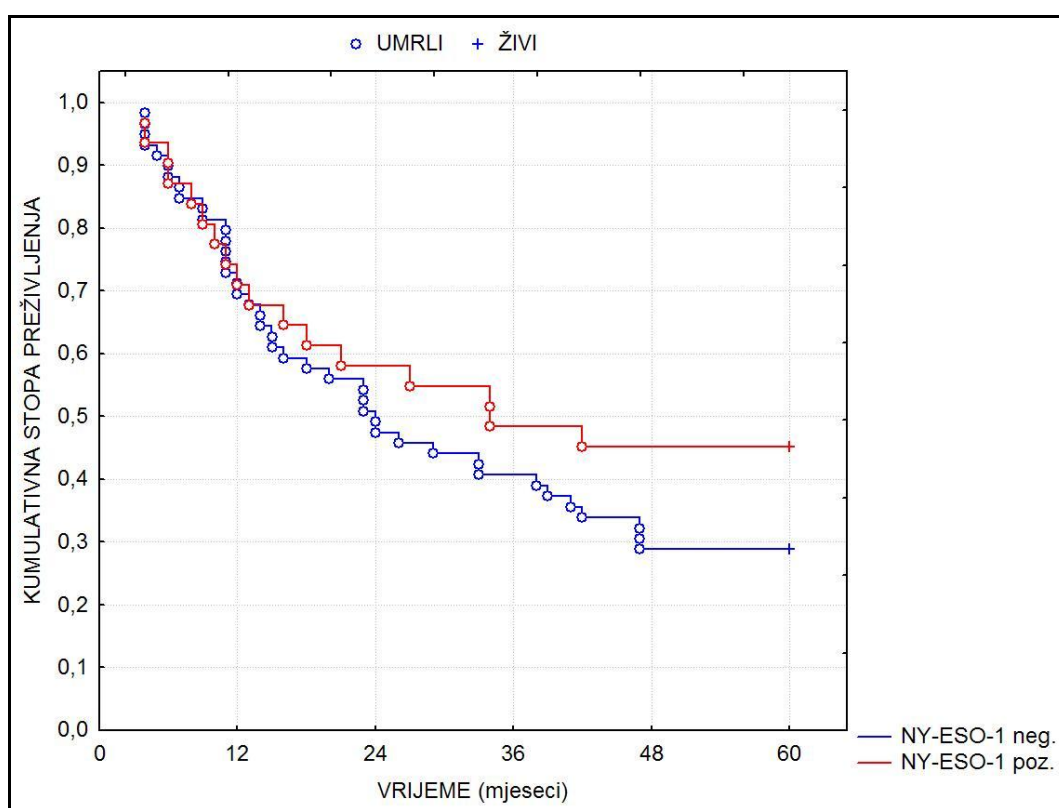
Analiza 5-godišnjeg preživljenja pokazuje bolje preživljenje bolesnika s NY-ESO-1 pozitivnim tumorima, ali razlika između skupina nije statistički značajna (log-rank test, $p=0.081$), (slika 51).



Slika 51. Kaplan-Meierove krivulje preživljenja karcinoma usne šupljine i larinksa ovisno o izraženosti NY-ESO-1 antigena.

U skupini bolesnika s karcinomom orofarinksa i hipofarinksa ukupno je 33.3% NY-ESO-1 pozitivnih tumora. Raspodjela je ujednačena u svim analiziranim podskupinama osim ovisno o PH gradusu. Ne postoji statistički značajna razlika ovisno o veličini tumora ($\chi^2=1.16$; $df=1$; $p=0.282$) i prisutnosti metastaza ($\chi^2=0.47$; $df=1$; $p=0.494$). Postoji statistički značajna razlika u učestalosti NY-ESO-1 pozitivnih tumora ovisno o PH gradusu tumora ($p=0.003$).

Analiza 5-godišnjeg preživljenja pokazuje bolje preživljenje bolesnika s NY-ESO-1 pozitivnim tumorima, ali razlika između skupina nije statistički značajna (log-rank test, $p=0.219$), (slika 52).



Slika 52. Kaplan-Meierove krivulje preživljenja karcinoma orofarinksa i hipofarinksa ovisno o izraženosti NY-ESO-1 antigena.

6. Rasprava

Planocelularni karcinom glave i vrata pripada skupini tumora s lošom prognozom. Planiranje liječenja bolesnika s primarnim planocelularnim karcinomom glave i vrata temelji se na prihvaćenim prognostičkim čimbenicima. S obzirom na ukupnu agresivnost ove skupine tumora važan je multimodalitetni pristup liječenju. Nedovoljno poznavanje biološkog ponašanja tumora pokušava se nadomjestiti procjenom proširenosti bolesti u trenutku postavljanja dijagnoze i određivanjem histološkog stupnja diferenciranosti tumora. Pristup bolesniku s planocelularnim karcinomom glave i vrata, temeljen na prihvaćenim prognostičkim čimbenicima godinama je nepromijenjen, a iskustvo pokazuje da je potrebno preciznije postaviti kriterije u agresivnosti pri terapijskom pristupu pojedinom bolesniku.

Nedostatan napredak u onkologiji glave i vrata naglašava važnost molekularnih genetskih studija, koje bi trebale definirati promjene koje koreliraju s biološkim ponašanjem tumora (5). Redefiniranjem prognostičkih čimbenika, te na njima temeljenih terapijskih protokola upotrebom metoda detekcije gena u tumorskom i okolnom zdravom tkivu, postigao bi se upravo taj cilj.

Provedeno je istraživanje izraženosti proteina nm23, MAGE-3 i NY-ESO-1 na planocelularnim karcinomima glave i vrata.

Početak analize rezultata provedenog istraživanja bila je usporedba obilježja bolesnika odabranih za imunohistokemijsku analizu s podacima iz dostupne literature.

Ukupna incidencija planocelularnog karcinoma glave i vrata u Hrvatskoj je 21.4/100000 stanovnika godišnje (10), što je vrlo visoko u usporedbi s incidencijom u svijetu (23), (tablica 29). Visoka incidencija planocelularnih karcinoma glave i vrata u Hrvatskoj posljedica je raširenih navika pušenja i redovitog konzumiranja većih količina alkoholnih pića. Dobna i spolna raspodjela na istraživanom uzorku odgovara podacima iz literature (11, 12).

Prema podacima o incidenciji u Hrvatskoj očekivana raspodjela tumora pojedinih lokalizacija je 21% tumora usne šupljine, 22.4% tumora orofarinksa, 16.4% tumora hipofarinksa, te 40.2% tumora larinksa u ukupnom broju planocelularnih karcinoma glave i vrata. U ovom istraživanju udio karcinoma orofarinksa i larinksa je očekivan (23.2% bolesnika s karcinomom orofarinksa i 40.9% bolesnika s karcinomom larinksa), dok u usporedbi s očekivanjima ima nešto više karcinoma hipofarinksa (22.2%) i nešto manje karcinoma usne šupljine (13.6%). Nejednaki broj bolesnika u pojedinim grupama posljedica

je dakle različite incidencije tumora pojedinih lokalizacija, ali i različitog udjela bolesnika s pojedinim lokalizacijama tumora u ukupnom broju bolesnika liječenih u Klinici za tumore.

Tablica 29. Incidencija planocelularnih karcinoma glave i vrata u svijetu i u Hrvatskoj.

LOKALIZACIJA	INCIDENCIJA U SVIJETU /100 000 stanovnika (23)	INCIDENCIJA U HRVATSKOJ /100 000 stanovnika (10)
USNA ŠUPLJINA	0.5-4	4.5
OROFARINKS	0.25-5.25	4.8
HIPOFARINKS	0.05-5	3.5
LARINKS	2-8	8.6
UKUPNO	2.8-22.25	21.4

Stadij bolesti u trenutku postavljanja dijagnoze jedan je od najvažnijih prihvaćenih prognostičkih čimbenika. Kod bolesnika uključenih u istraživanje velik je udio bolesnika u uznapredovalim stadijima bolesti. Usporedba dobivenih podataka s podacima iz Memorial Sloan-Kettering Cancer Center pokazuje značajno niži udio bolesnika u stadijima I i II, te viši u stadiju IV u istraživanoj skupini (tablica 30), (19). Otkrivanje bolesti u uznapredovalim stadijima najvećim dijelom je posljedica niskog stupnja educiranosti populacije. Bolesnici koji obolijevaju od planocelularnog karcinoma glave i vrata pripadaju uglavnom nižoj socioekonomskoj skupini stanovnika. Pušenje i konzumacija alkohola smatraju se prihvatljivim navikama, a bolesnici najčešće dolaze na prvi pregled nakon što simptomi postoje nekoliko mjeseci. Posljedica navedenih okolnosti je kasno postavljanje dijagnoze i visoki udio bolesnika s uznapredovalim stadijima bolesti u trenutku postavljanja dijagnoze.

Tablica 30. Stadij bolesti u trenutku postavljanja dijagnoze u MSKCC i u ispitivanom uzorku.

LOKALIZACIJA	MSKCC				PODACI IZ ISTRAŽIVANJA			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
USNA ŠUPLJINA	37%	36%	18%	9%	18.5%	25.9%	22.2%	33.3%
OROFARINKS	34%	31%	25%	10%	2.2%	8.7%	19.6%	69.6%
HIPOFARINKS	11%	11%	36%	42%	0.0%	2.3%	34.1%	63.6%
LARINKS	SUPRAGLOTIS	9%	21%	34%	14.8%	14.8%	39.5%	30.9%
	GLOTIS	53%	22%	23%				

U liječenju planocelularnog karcinoma glave i vrata u Klinici za tumore dostupni su svi prihvaćeni modaliteti liječenja. U istraživanoj skupini bolesnika primjenjeno je nekoliko različitih načina liječenja. Većina bolesnika (63%) liječena je kirurški, uz postoperativnu primjenu radioterapije. To je skupina bolesnika s tumorom u uznapredovalom stadiju, koji je kirurški resektabilan, ali uz postojanje visokog rizika lokoregionalnog recidiva. Manji dio bolesnika (23%) liječen je primarnom radioterapijom; to je skupina u koju su uključeni bolesnici kod kojih je provedena primarna radioterapija s intencijom izliječenja (T1 i T2 tumori), bolesnici koji nisu pristali na kirurško liječenje neovisno o stadiju bolesti, te bolesnici s uznapredovalim inoperabilnim tumorima kod kojih je intencija radioterapije bila palijativna. Kod treće skupine bolesnika (9%) provedeno je kirurško liječenje kao jedini modalitet liječenja; to su bolesnici s tumorima otkrivenim u ranoj fazi bolesti, s nižim rizikom recidiva. Kod 3% bolesnika učinjena je operacija metastatske bolesti na vratu, uz radioterapiju primarnog tumora, a samo 2% bolesnika liječeno je kemoradioterapijom.

Tumori sluznice gornjeg dijela respiratornog i probavnog sustava imaju nekoliko zajedničkih obilježja: 1. istu histološku sliku planocelularnog karcinoma; 2. zajedničke etiološke čimbenike (pušenje i konzumacija alkohola); 3. često pojavljivanje više tumora kod jednog bolesnika (što najčešće uključuje i karcinom pluća i jednjaka). Podaci iz literature, kao i kliničko iskustvo ukazuju na razlike u ponašanju planocelularnog karcinoma glave i vrata u ovisnosti o lokalizaciji primarnog tumora. Lokalizacija primarnog tumora utječe na tijek bolesti na nekoliko načina: 1. vrijeme izazivanja simptoma, što utječe na stadij bolesti u trenutku postavljanja dijagnoze; 2. vjerojatnost pojavljivanja metastaza u limfnim čvorovima na vratu; 3. vjerojatnost pojavljivanja udaljenih metastaza; 4. različit udio dobro i slabo diferenciranih tumora u ukupnom broju. T1 i T2 tumori rano se otkrivaju ako su lokalizirani u usnoj šupljini (jer su lako dostupni vizualizaciji) i larinksu (mali tumori koji rano izazvaju promuklost). U području orofarinksa i hipofarinksa udio T1 tumora manji je od 5% jer se radi o „tihim“ regijama gdje i veći tumori izazivaju minimalne smetnje. Vjerojatnost metastaziranja ne može se isključivo povezati sa stupnjem diferenciranosti tumora. U trenutku postavljanja dijagnoze približno trećina bolesnika s tumorima usne šupljine i larinksa ima pozitivne limfne čvorove na vratu, dok su metastaze na vratu prisutne kod $\frac{3}{4}$ bolesnika s tumorima orofarinksa i hipofarinksa. Stadij bolesti ujedinjuje čimbenike veličine primarnog tumora i prisutnosti metastaza na vratu, te razlike između lokalizacija postaju naglašenije. U početnim stadijima (stadiji I i II) otkriva se oko 1/3 karcinoma usne šupljine i larinksa i manje od 10% karcinoma orofarinksa i hipofarinksa. Karcinomi hipofarinksa najčešće daju udaljene metastaze. Analiza međudnosa lokalizacije, veličine primarnog tumora, prisutnosti metastaza

na vratu i stadija bolesti pokazuje grupiranje karcinoma usne šupljine i larinksa u jednu, te karcinoma orofarinksa i hipofarinksa u drugu skupinu. Patohistološki gradus tumora također ne pokazuje jednoliku raspodjelu prema lokalizacijama. Kod karcinoma usne šupljine i larinksa veći je udio (39-48%) dobro diferenciranih karcinoma, dok je u orofarinksu i hipofarinksu manji (15-22%). Srednje dobro diferencirani tumori prisutni su u gotovo pola (43-50%) karcinoma orofarinksa, hipofarinksa i larinksa. Karcinomi larinksa karakterizirani su i iznimno malim udjelom slabo diferenciranih karcinoma (11.1%). Iako se vrijednost patohistološkog gradusa tumora često umanjuje, u istraživanoj skupini bolesnika dobro diferencirani tumori otkrivaju se ranije, slabije diferencirani rano metastaziraju, te se otkrivaju u uznapredovalim stadijima bolesti.

Tablica 31. Usporedba 5-godišnjeg preživljenja u ovisnosti o lokalizaciji i stadiju bolesti u trenutku postavljanja dijagnoze u MSKCC i u ispitivanom uzorku.

LOKALIZACIJA		MSKCC				PODACI IZ ISTRAŽIVANJA			
		I	II	III	IV	I	II	III	IV
USNA ŠUPLJINA		75-95%	65-85%	45-65%	10-35%	100%	85.7%	50.0%	22.2%
OROFARINKS		55-85%	50-80%	10-60%	10-55%	100%	100%	22.2%	21.9%
HIPOFARINKS		68%	52%	50%	20%	-	100%	46.7%	32.1%
LARINKS	SUPRAGLOTIS	84%	83%	73%	44%	100%	91.7%	59.4%	32.0%
	GLOTIS	90%	85%	75%	45%				

Nakon analize obilježja tumora istraživane skupine bolesnika učinjena je analiza 5-godišnjeg preživljenja. Ukupno 5-godišnje preživljenje u istraživanoj skupini bolesnika bilo je 49%. Analiza preživljenja u ovisnosti o prihvaćenim prognostičkim čimbenicima (lokalizacija, T stadij, N stadij, stadij bolesti i patohistološki gradus) pokazuje statistički značajnu razliku u 5-godišnjem preživljenju. Dobiveni podaci o preživljenju ovisno o lokalizaciji i stadiju bolesti u trenutku postavljanja dijagnoze uspoređeni su u tablici 31. sa podacima Memorial Sloan-Kettering Cancer Center. Iz tablice je vidljivo da su rezultati liječenja u Klinici za tumore komparabilni s rezultatima jednog od vodećih svjetskih centara. U ukupnom broju analiziranih bolesnika bio je nešto manji broj karcinoma usne šupljine, ali rezultati liječenja su zadovoljavajući. Broj bolesnika u stadiju I i II kod karcinoma orofarinksa i hipofarinksa je vrlo mali (6 bolesnika) tako da je kvalitetna analiza nemoguća. U liječenju karcinoma larinksa u stadijima III i IV rezultati liječenja u Klinici za tumore nešto su lošiji.

Deskriptivna analiza podataka, analiza preživljenja i usporedba sa podacima iz literature pokazuje da je odabrana skupina bolesnika reprezentativan uzorak bolesnika s planocelularnim karcinomima glave i vrata, koji se može kvalitetno usporediti sa postojećom literaturom, uz očekivanu raspodjelu obilježja tumora i komparabilnim rezultatima liječenja. Veličina analiziranog uzorka veća je nego u do sada objavljenim istraživanjima izraženosti proteina.

U dostupnoj literaturi izraženost nm23 opisana je u nekoliko istraživanja na svim planocelularnim karcinomima glave i vrata, te u nekoliko istraživanja ograničenih na lokalizaciju tumora u usnoj šupljini i larinksu. Izraženost nm23 kod tumora orofarinksa i hipofarinksa nije opisana.

U ovom istraživanju proteinski produkt gena nm23 izražen je u ukupno 56.6% tumora. Usporedba s literaturom (tablica 32) potvrđuje slične rezultate i u drugim istraživanjima (51, 52).

Tablica 32. Usporedba rezultata istraživanja s literaturom.

LITERATURA	VELIČINA UZORKA	IZRAŽENOST nm23	POVEZANOST S
Pavelić i sur. (49)	120		<ul style="list-style-type: none"> • povećana izraženost kod tumora u stadijima III i IV
McDonald i sur. (50)	47		<ul style="list-style-type: none"> • povećana izraženost kod većih tumora • povećana izraženost - lošije preživljenje
Song i sur. (51)	70	N0 56% povećana izraženost N+ 88% niska izraženost	<ul style="list-style-type: none"> • bez razlike u preživljenju
Mhaweč-Faucegli i sur. (52)	120	50% povećana izraž. 44% smanjena izraž.	<ul style="list-style-type: none"> • bez povezanosti
PODACI IZ ISTRAŽIVANJA	198	56.6%	<ul style="list-style-type: none"> • bez povezanosti

Analiza izraženosti nm23 proteina po lokalizacijama pokazuje nejednoliku raspodjelu. Udio nm23 pozitivnih tumora u skupini bolesnika s karcinomom usne šupljine i larinksa bio je manji (46.3%) nego u skupini bolesnika s karcinomom orofarinksa i hipofarinksa (68.9%), dok u istraživanju Takesa i suradnika izraženost nm23 u karcinomima larinksa, farinksa i usne šupljine ne pokazuje razliku između pojedinih lokalizacija planocelularnog karcinoma glave i vrata (48).

Izraženost nm23 na svim uključenim planocelularnim karcinomima glave i vrata ne povezuje se s veličinom tumora, TNM stadijem, stadijem bolesti, patohistološkim gradusom, kao ni 5-godišnjim preživljenjem, što je u skladu s nekim literaturnim podacima (51, 52).

Analiza skupine karcinoma usne šupljine i larinksa pokazuje veći udio (63.5%) nm23 negativnih tumora u skupini lokalno uznapredovalih tumora (T3 i T4), kod tumora s prisutnim metastazama na vratu (67.5%), te kod tumora u uznapredovalim stadijima bolesti (III i IV), (62.5%). Podaci iz literature su različiti (tablica 33), neki autori ne nalaze povezanost s kliničkim obilježjima (38, 59), dok drugi nalaze povezanost sa svim obilježjima analiziranim u ovom istraživanju (29, 53, 55, 57, 58, 60).

Tablica 33. Usporedba rezultata istraživanja s literaturom.

LITERATURA	LOKALIZACIJA	VELIČINA UZORKA	POVEZANOST S
Pestereli i sur. (59)	larinks	28	• bez povezanosti s N statusom
Sheikh i sur. (38)	larinks	25	• bez povezanosti
Otsuki i sur. (53)	usna šupljina	56	• povećana izraženost - manja učestalost N+ • bez povezanosti s drugim obilježjima
Lo Muzio i sur. (55)	usna šupljina		• povećana izraženost - manja učestalost N+
Wang i sur. (29)	usna šupljina	86	• T • smanjena izraženost kod manjih tumora veća učestalost N+ i lošije preživljenje
Leea i sur. (57)	larinks	22	• smanjena izraženost - lošije preživljenje
Gunduz i sur. (58)	larinks		• smanjena izraženost - histološki niski stupanj diferenciranosti, udaljene metastaze, recidivni tumori
Sikorska i sur. (60)	larinks		• smanjena izraženost – veća učestalost N+, lošije preživljenje
PODACI IZ ISTRAŽIVANJA	larinks i usna šupljina	108	• smanjena izraženost – lokalno uznapredovali tumori, veća učestalost N+

Analiza skupine karcinoma orofarinksa i hipofarinksa pokazuje veći udio nm23 pozitivnih tumora (68.9%). Postoji tendencija većeg udjela nm23 pozitivnih tumora kod početnih tumora i tumora bez metastaza na vratu. Navedena tendencija je vidljiva u razlici frekvencija kod početnih i uznapredovalih stadija bolesti, s udjelom nm23 pozitivnih u skupini početnih od 83.3%. Kod tumora različitog patohistološkog gradusa veći je udio nm23 pozitivnih tumora u skupini dobro diferenciranih karcinoma.

Unatoč dokazanoj ulozi proteina nm23 u procesu metastaziranja analiza izraženosti nije dala očekivane rezultate u skupini planocelularnih karcinoma glave i vrata. S obzirom na složenost metastatskog procesa koji uključuje aktivaciju ili supresiju više gena, moguće je da analiza jednog gena koji je dio procesa metastaziranja ne pokaže jasnu razliku u ovakvom istraživanju. Iz rezultata analize u skupini karcinoma usne šupljine i larinksa vidljivo je da je izraženost nm23 važan čimbenik u procesu metastaziranja tumora. Iako postoji razlika u izraženosti nm23 između početnih i lokalno uznapredovalih tumora, kao i tumora bez i s metastazama na vratu ona nije dovoljna da bi mogli upotrijebiti nm23 kao obilježje pomoću kojeg ćemo modificirati plan liječenja za bolesnika s planocelularnim karcinomom usne šupljine ili larinksa. Bolesnici s karcinomima orofarinksa i hipofarinksa imaju neočekivano visok udio tumora s izraženim nm23 s obzirom na veliku učestalost metastaziranja tumora ovih lokalizacija. Proizlazi da je uloga izraženosti proteina nm23 drugačija u planocelularnim karcinomima glave i vrata različitih lokalizacija.

Prema podacima iz literature izraženost MAGE-3 antigena javlja se u 43.4-72% planocelularnih karcinoma glave i vrata (87, 89, 90, 92). Prema rezultatima ovog istraživanja MAGE-3 bio je izražen u 66.7% analiziranih uzoraka. U većini objavljenih studija autori ne nalaze povezanost izraženosti MAGE-3 antigena s kliničkim obilježjima bolesti, patohistološkim osobinama tumora, kao ni preživljenjem (87, 90, 92). Iz ovog istraživanja proizlaze isti zaključci (tablica 34). Samo u radu Eura i suradnika (89) opisana je različita distribucija ovisno o lokalizaciji tumora i histološkom stupnju diferenciranosti. U ovom istraživanju analizirana je izraženost MAGE-3 antigena na najvećem uzorku u usporedbi s dosada objavljenim radovima, a nisu potvrđeni navedeni rezultati.

Prema podacima iz literature MAGE-3 pozitivitet tumora negativno korelira s histološkim stupnjem diferenciranosti kod melanoma i karcinoma dojke (75, 81, 82, 83), također izraženost raste s progresijom tumora, te se povezuje s lošijom prognozom bolesti. Na analiziranom uzorku nije pokazana povezanost s histološkim stupnjem diferenciranosti planocelularnog karcinoma glave i vrata, kao ni razlika u preživljenju ovisno o izraženosti MAGE-3 antigena. Analiza učinjena nakon podjele bolesnika na skupinu s karcinomom usne

šupljine i larinksa, te skupinu s karcinomom orofarinksa i hipofarinksa dala je neočekivane rezultate. U skupini bolesnika s karcinomom usne šupljine i larinksa, koja sama ima bolju prognozu, izraženost MAGE-3 antigena pokazatelj je bolje prognoze. Kod bolesnika s karcinomom orofarinksa i hipofarinksa izraženost MAGE-3 antigena očekivano je pokazatelj loše prognoze, iako razlika između skupina nije statistički značajna.

Tablica 34. Usporedba rezultata istraživanja s literaturom.

LITERATURA	VELIČINA UZORKA	MAGE-3 IZRAŽENOST	POVEZANOST S
Eura i sur. (89)	83	43.4%	• različita distribucija ovisno o: lokalizaciji i histološkom stupnju diferenciranosti
Lee i sur. (90)	40	45%	• bez povezanosti
Atanackovic i sur. (92)	51	72%	
Kienstra (87) i sur.	45	44.4%	• bez povezanosti
PODACI IZ ISTRAŽIVANJA	198	66.7%	• bez povezanosti

Izraženost MAGE-3 nije se pokazala kao jasan prognostički čimbenik, te ne može poslužiti u modifikaciji plana liječenja kod bolesnika s planocelularnim karcinomom glave i vrata. Produkt gena MAGE-3 pripada tumorskim antigenima, a u tijeku su istraživanja imunoterapije kod MAGE-3 pozitivnih melanoma. U ovom istraživanju MAGE-3 pokazuje ukupno visoki pozitivitet, i ukazuje na potrebu istraživanja učinkovitosti imunoterapije u planocelularnim karcinomima glave i vrata.

Izraženost antigena NY-ESO-1 u ovom istraživanju postojala je u 34.3% analiziranih tumora, pojavljivala se rjeđe kod histološki slabije diferenciranih karcinoma, te je bila prediktor bolje prognoze. U usporedbi s literaturom slični rezultati dobiveni su za planocelularni karcinom jednjaka (97). Prema literaturi udio NY-ESO-1 pozitivnih tumora u planocelularnim karcinomima glave i vrata je niži 5.9% i 6.6% (87, 92). Produkt gena NY-ESO-1 tumorski je antigen, a smatra se jednim od najimunogenijih izoliranih antigena jer inducira spontani imunološki odgovor domaćina u 50% bolesnika s tumorima koji pokazuju NY-ESO-1 izraženost. Povezanost izraženosti s boljom prognozom vjerojatno je posljedica imunološkog odgovora bolesnika. Ovaj rezultat otvara mnoga pitanja i mogućnost novih istraživanja.

Postavljeni ciljevi istraživanja su ostvareni. Utvrđeno je da je izraženost proteina nm23 56.6%, MAGE-3 66.7% i NY-ESO-1 34.3% u planocelularnim karcinomima glave i vrata. Nije utvrđena povezanost izraženosti proteina nm23, MAGE-3 i NY-ESO-1 s proširenosti tumora (TNM) u trenutku postavljanja dijagnoze. Nije utvrđena povezanost izraženosti proteina nm23 i MAGE-3 sa stupnjem diferenciranosti tumora, dok je izraženost NY-ESO-1 manja kod slabo diferenciranih tumora. Nije utvrđena povezanost izraženosti proteina nm23, MAGE-3 i NY-ESO-1 s metastatskim potencijalom i biološkim ponašanjem tumora. Nije utvrđena povezanost izraženosti proteina nm23 i MAGE-3 s 5-godišnjim preživljenjem bolesnika, dok je izraženost NY-ESO-1 povezana s boljim 5-godišnjim preživljenjem.

Od 3 postavljene hipoteze na početku istraživanja dokazana je samo treća. Prva hipoteza bila je da je smanjena izraženost nm23 povezana s povećanim rizikom metastaziranja planocelularnog karcinoma glave i vrata, što ne vrijedi za sve planocelularne karcinome glave i vrata, ali je točno za skupinu karcinoma usne šupljine i larinksa. Druga hipoteza bila je da je povećana izraženost MAGE-3 povezana je s lošijom prognozom planocelularnog karcinoma glave i vrata. Također hipotezu nismo mogli dokazati za sve planocelularne karcinome glave i vrata, ali je točna u skupini karcinoma orofarinksa i hipofarinksa. Treća hipoteza bila je da je povećana izraženost NY-ESO-1 povezana s boljom prognozom planocelularnog karcinoma glave i vrata. Ova hipoteza je dokazana.

U ovom istraživanju provedena je analiza izraženosti proteina nm23, MAGE-3 i NY-ESO-1 kod planocelularnih karcinoma glave i vrata. U istraživanje su uključeni tumori svih lokalizacija zbog zajedničkih karakteristika (histološka slika, etiologija). Rezultati istraživanja pokazali su da je ipak potrebno odvojiti skupine bolesnika s karcinomom usne šupljine i larinksa od skupine bolesnika s karcinomom orofarinksa i hipofarinksa, radi različitog biološkog ponašanja. Nakon analize rezultata po ovim podskupinama vidljivo je da je i izraženost proteina i utjecaj na prognozu bolesti različit u te dvije skupine.

Bolje poznavanje bioloških osobina tumora omogućiti će individualizirani pristup tumorskom bolesniku i planiranje manje ili više agresivne terapije u odnosu na dosadašnju u ovisnosti o karakteristikama samog tumora. Ovakav pristup pomogao bi kod odluke o adjuvantnom liječenju kod bolesnika u ranom stadiju bolesti, a kod bolesnika u uznapređovalom stadiju mogli bi odabrati između složenog multidisciplinarnog pristupa koji uključuje opsežan kirurški zahvat i konzervativnog liječenja (3). Kod manje agresivnih tumora smanjenjem opsega tretmana izbjegavaju se mnoge nuspojave adjuvantnog liječenja, te se smanjuje cijena liječenja. Kod agresivnijih tumora povećanjem opsega inicijalnog

liječenja, cijena liječenja raste, ali smanjenje broja recidiva smanjuje troškove liječenja bolesnika sa recidivnim i inkurabilnim tumorima. Rezultati istraživanja pokazuju da izraženost proteina nm23 nažalost nije dovoljna kako bi donijeli odluku o opsegu operacije ili potrebi adjuvantnog liječenja. Produkti gena MAGE-3 i NY-ESO-1 pripadaju tumorskim antigenima. Visok postotak izraženosti MAGE-3 antigena u planocelularnim karcinomima glave i vrata otvara mogućnost primjene imunoterapije. Izraženost NY-ESO-1 povezana je s boljom prognozom, ali zbog ukupno niske izraženosti u planocelularnim karcinomima glave i vrata eventualna primjena imunoterapije je ograničena.

7. Zaključci

Temeljem dobivenih rezultata može se zaključiti slijedeće:

1. Protein nm23 izražen je u nešto više od pola planocelularnih karcinoma glave i vrata.
2. Antigen MAGE-3 izražen je u velikom broju planocelularnih karcinoma glave i vrata.
3. Antigen NY-ESO-1 izražen je u manjem broju planocelularnih karcinoma glave i vrata.
4. Izraženost proteina nm23, MAGE-3 i NY-ESO-1 nije povezana s proširenosti tumora (TNM) u trenutku postavljanja dijagnoze.
5. Izraženost proteina nm23 i MAGE-3 nije povezana sa stupnjem diferenciranosti tumora.
6. Izraženost NY-ESO-1 povezana je sa stupnjem diferenciranosti tumora, manji broj slabo diferenciranih tumora pokazuje NY-ESO-1 pozitivitet.
7. Izraženost proteina nm23, MAGE-3 i NY-ESO-1 nije povezana s metastatskim potencijalom i biološkim ponašanjem tumora.
8. Izraženost proteina nm23 i MAGE-3 nije povezana s 5-godišnjim preživljenjem bolesnika.
9. Izraženost proteina NY-ESO-1 povezana s boljim 5-godišnjim preživljenjem.

8. Sažetak na hrvatskom jeziku

Planocelularni karcinomi glave i vrata su skupina tumora koju karakterizira jedinstvena patohistološka slika, isti etiološki čimbenici i često pojavljivanje nekoliko tumora kod istog bolesnika. Metastaziranje tumora najvažniji je prihvaćeni prognostički čimbenik. Gen nm23 jedan je od gena koji suprimiraju metastatski potencijal tumora. Niska izraženost proteina nm23 povezana je s lošom prognozom i učestalijim metastazama u nekoliko vrsta karcinoma. Geni MAGE-3 i NY-ESO-1 kodiraju antigene izražene u velikom broju tumora različite histologije. Antigene prepoznaju CD8 (+) T limfociti. Antigenski produkt gena NY-ESO-1 smatra se jednim od najimunogenijih izoliranih antigena.

Provedeno je retrospektivno istraživanje u koje je uključeno 198 bolesnika s planocelularnim karcinomom glave i vrata. Učinjena je imunohistokemijska obrada izraženosti nm23, MAGE-3 i NY-ESO-1. Analizirana je povezanost izraženosti proteina nm23, MAGE-3 i NY-ESO-1 s lokalizacijom, proširenosti tumora (TNM) u trenutku postavljanja dijagnoze, s histološkim stupnjem diferenciranosti tumora, te s preživljenjem bolesnika.

Nm23 izražen je u ukupno 56.6% tumora. Udio nm23 pozitivnih tumora u skupini bolesnika s karcinomom usne šupljine i larinksa bio je manji (46.3%) nego u skupini bolesnika s karcinomom orofarinksa i hipofarinksa (68.9%). Izraženost proteina nm23 u svim uključenim planocelularnim karcinomima glave i vrata nije pokazala povezanost s TNM stadijem, histološkim stupnjem diferenciranosti tumora, kao ni 5-godišnjim preživljenjem. Analiza izraženosti samo jednog od proteina koji je dio složenog metastatskog procesa nedovoljna je za razlikovanje tumora s niskim i visokim metastatskim potencijalom.

MAGE-3 izražen je u 66.7% analiziranih uzoraka. Na analiziranom uzorku nije pokazana povezanost izraženosti s lokalizacijom, TNM stadijem, histološkim stupnjem diferenciranosti, kao ni preživljenjem. Iako nije dobar prognostički čimbenik, mogao bi biti dobar cilj imunoterapije. Veliki udio MAGE-3 pozitivnih tumora ukazuje na potrebu istraživanja učinkovitosti imunoterapije u planocelularnim karcinomima glave i vrata.

Izraženost NY-ESO-1 postojala je u 34.3% analiziranih tumora, a pojavljivala se rjeđe kod histološki slabije diferenciranih karcinoma, te je bila prediktor bolje prognoze. Zbog malog udjela tumora koji pokazuju izraženost NY-ESO-1 vjerojatnost kliničke primjene je mala.

9. Sažetak na engleskom jeziku - Abstract

Head and neck squamous cell cancer is a group of tumors characterised by unique histological findings, the same etiological factors and frequent appearance of several cancers in the same patient. Metastasing is the most important accepted prognostic factor. Nm23 gene is one of the genes that suppress metastatic potential. Low expression of nm23 is associated with poor prognosis and more frequent metastasis in several types of cancers. MAGE-3 and NY-ESO-1 genes encoding antigens expressed in a number of tumours with different histology. Antigens are recognized by CD8 (+) T lymphocytes. Antigen NY-ESO-1 is considered one of the most immunogenic antigens.

Retrospective research included 198 patients treated for head and neck squamous cell cancer. Immunohistochemical analysis of nm23, MAGE-3 and NY-ESO-1 expression was performed. We investigated the correlation between nm23, MAGE-A and NY-ESO-1 expression and tumor localization, TNM stage, histological grade and disease specific survival.

Gene nm23 was expressed in 56.6% of tumors. The proportion of nm23 positive tumors in the group of patients with oral cavity and laryngeal cancer was lower (46.3%) than in the group of patients with the oropharyngeal and hypopharyngeal cancer (68.8%). The expression of nm23 gene in all patients showed no correlation with TNM stage, histological grade, nor the 5-year survival rate. The analysis of expression of only one gene, which is a part of a complex metastatic process, is not sufficient to differentiate tumors with high and low metastatic potential.

MAGE-3 gene was expressed in 66.7% of analyzed sample showed no correlation of expression with localization, TNM stage, histological grade, nor survival. Although it is not a good prognostic factor, it could be a good target for immunotherapy. A large proportion of MAGE-3 positive tumors implicates the need to examine the effectiveness of immunotherapy in squamous cell head and neck cancer.

The expression of NY-ESO-1 gene was present in 34.4% of analyzed tumors, and it was less frequently present in poorly differentiated carcinomas. It was a predictor of better prognosis. Due to a small proportion of tumors that show the expression of NY-ESO-1, the potential of clinical implementation is small.

10. Literatura

1. Fan CY. Genetic alterations in head and neck cancer: interactions among environmental carcinogens, cell cycle control and host DNA repair. *Curr Oncol Rep.* 2001;3:66-71.
2. Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol.* 2000;36:256-63.
3. Chin D, Boyle GM, Theile DR, Parsons PG, Coman WB. Molecular introduction to head and neck cancer (HNSCC) carcinogenesis. *Br J Plast Surg.* 2004;57:595-602.
4. Chin D, Boyle GM, Williams RM i sur. Novel markers for poor prognosis in head and neck cancer. *Int J Cancer.* 2005; 113:789-97.
5. Hardisson D. Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2003;260:502-8.
6. Papadimitrakopoulou VA. Carcinogenesis of head and neck cancer and the role of chemoprevention in its reversal. *Curr Opin Oncol.* 2000;12:240-5.
7. Quon H, Liu FF, Cummings BJ. Potential molecular prognostic markers in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck.* 2001;23:147-59.
8. Jefferiers S. Foulkes WD. Genetic mechanisms in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol.* 2001;37:115-26.
9. Gasco M, Crook T. The p53 network in head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2003;39:222-31.
10. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Registar za rak. Incidencija raka u Hrvatskoj 2006. Bilten br. 31 Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2008, str. 18-25.
11. Fletcher CDM, ur. Diagnostic Histopathology of tumors. London: Churchill Livingstone; 2000, str.150-238.
12. Barnes L, Eveson J.W, Reichart P, Sidransky D, ur. World Health Organization Classification of tumors. Pathology and genetics of Head and Neck Tumors. Lyon: IARC Press; 2005, str.107-208.
13. Das RD, Nagpal JK. Understanding the biology of oral cancer. *Med Sci Monit.* 2002;8:258-67.
14. Rhys Evans PH, Montgomery PQ, Gullane PJ, ur. Principles and Practice of Head and Neck Oncology. London: Martin Dunitz; 2003, str.163-334.

15. <http://atlasgeneticsoncology.org/Tumors/SquamousCellID5130.html>, pristupljeno: srpanj 2008.
16. Turić M, Kolarić K, Eljuga D, ur. Klinička onkologija, Zagreb: Nakladni zavod Globus; 1996, str.419-23.
17. Wittekind C. Greene FL, Hutter RVP i sur, ur. TNM Atlas. Berlin: Springer; 2004, str. 5-50.
18. Green FL, Page DL, Fleming ID i sur, ur. AJCC. Cancer Staging Manual. New York: Springer-Verlag; 2003.
19. Shah JP, Patel SG, urednici. Head and Neck Surgery and Oncology. Edinburgh: Mosby; 2003, str.173-394.
20. Takes RP, Baatenburg de Jong RJ, Schuurin E i sur. Markers for assessment of nodal metastasis in laryngeal carcinoma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1997;123:412-9.
21. Takes RP, Baatenburg de Jong RJ, Wijffels K i sur. Expression of genetic markers in lymph node metastases compared with their primary tumors in head and neck cancer. J Pathol. 2001;194:298-302.
22. Shah JP, Strong E, Spiro RH, Vifram B. Surgical grand rounds: neck dissection: current status and future possibilities. Clin Bull. 1981;11:25-33.
23. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Raymond and Young J, ur. Cancer Incidence in 5 Continents Vol. VII. Lyon: IARC Scientific publications (No. 143); 1997.
24. Rosai J, ur. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. St. Louis: Mosby; 2004, str. 223-338.
25. Califano J, van der Riet P, Westra W i sur. Genetic progression model for head and neck cancer: implication for field cancerization. Cancer Res 1996;56:2488-92.
26. Califano J, Westra W, Meininger G i sur. Genetic progression and clonal relationship of recurrent premalignant head and neck lesions. Clin Cancer Res 2000;6:347-52.
27. Grandis JR, Tweardy DJ. Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. Cancer Res 1993;53:3579-84.
28. Gleich LL, Salamone FN. Molecular genetics of head and neck cancer. Cancer Control. 2002;9:369-378.
29. Wang YF, Chow KC, Chang SY i sur. Prognostic significance of nm23-H1 expression in oral squamous cell carcinoma. Br J Cancer. 2004;90:2186-93.

30. Warner GC, Reis PP, Makitie AA i sur. Current applications of microarrays in head and neck cancer research. *Laryngoscope*. 2004;114:241-8.
31. Choi P, Chen C. Genetic expression profiles and biologic pathway alterations in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2005;104:1113-28.
32. Harrington KJ, Nutting CM, Pandha HS. Gene therapy for head and neck cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2005;24:147-164.
33. Ayllón-Barbellido S, Campo-Trapero J, Cano-Sánchez J, Perea-Garcia MA, Escudero-Castaño N, Bascones-Martínez A. Gene therapy in the management of oral cancer: Review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2008;13:15-21.
34. Hartsough MT, Steeg PS. Nm 23/nucleoside diphosphate kinase in human cancers. *J Bioenerg Biomembr*. 2000;32:301-8.
35. Roymans D, Willems R, Van Blockstaele DR, Slegers H. Nucleoside diphosphate kinase (NDPK/nm23) and the waltz with multiple partners: Possible consequences in tumor metastasis. *Clin Experim Metastasis*. 2002;19:465-476.
36. Cortesina G, Martone T. Molecular metastases markers in head and neck squamous cell carcinoma: review of the literature. *Acta Othorinolaryngol Ital*. 2006;26:317-25.
37. Fournier HN, Albiges-Rizo C, Block MR. New insights into Nm23 control of cell adhesion and migration. *J Bioenerg Biomembr*. 2003;35:81-7.
38. Sheikh H, Murphy J, Hunt JL. NM-23 gene loss of heterozygosity and protein expression in high-stage laryngeal squamous cell carcinomas. *Diagn Mol Pathol*. 2006;15:1-6.
39. Lacombe ML, Milon L, Munier A, Mehus JG, Lambeth DO. The human nm23/nucleoside diphosphate kinesiases. *J Bioenerg Biomembr*. 2000;32:247-258.
40. Postel EH, Berberich SJ, Rooney JW, Kaetzel DM. Human nm23/nucleoside diphosphate kinase regulates gene expression through DNA binding to nuclease-hypersensitive transcriptional elements. *J Bioenerg Biomembr*. 2000;32:277-284.
41. Postel EH. Multiple biochemical activities of NM23/NDP kinase in gene regulation. *J Bioenerg Biomembr*. 2003;35:31-40.
42. Lombardi D, Mileo AM. Protein interactions provide new insight into nm23/nucleoside diphosphate kinase functions. *J Bioenerg Biomembr*. 2003;35:67-71.
43. Fan Z, Beresford PJ, Oh DY, Zhang D, Lieberman J. Tumor suppressor NM-23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell*. 2003;115:241-

44. Miyazaki H, Fukunda M, Ishijima Y i sur. Overexpression of nm23-H2/NDP kinase B in a human oral squamous cell carcinoma cell line results in reduced metastases, differentiated phenotype in the metastatic site, and growth factor-independent proliferative activity in culture. *Clin Cancer Res.* 1999;5:4301-7.
45. Bago R, Pavelić J, Maravić Vlahovicek G, Bosnar MH. Nm23-H1 promotes adhesion of CAL 27 cells in vitro. *Mol Carcinogen.* 2009;48:779-89.
46. Kimura N, Shimbada N, Fukunda M i sur. Regulation of cellular functions by nucleoside diphosphate kinases in mammals. *J Bioenerg Biomembr.* 2000;32:309-15.
47. Salerno M, Ouatas T, Palmieri D, Steeg PS. Inhibition of signal transduction by the nm 23 metastasis suppressor: possible mechanisms. *Clin Exp Metastasis.* 2003;20:3-10.
48. Takes RP, Baatenburg de Jong RJ, Schuurin E, Litvinov SV, Hermans J, Van Krieken JH. Differences in expression of oncogenes and tumor suppressor genes in different sites of head and neck squamous cell. *Anticancer Res.* 1998;18(6B):4793-800.
49. Pavelić K, Kapitanović S, Radosevic S i sur. Increased activity of nm23-H1 gene in squamous cell carcinoma of the head and neck is associated with advanced disease and poor prognosis. *J Mol Med.* 2000;78(2):111-8.
50. McDonald JS, Gartside PS, Pavelic LJ, Gluckman JL, Pavelic ZP. nm23-H1 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Pathol Oncol Res.* 1996;2(1-2):34-6.
51. Song AU, Mais DD, Groo S, Wright JR, Yoshida GY. Expression of nm23 antimetastatic gene product in head and neck squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2000;122:96-9.
52. Mhaweche-Fauceglia P, Dulguerov P, Beck A, Bonet M, Allal S. Value of ezrin, maspin and nm23-H1 protein expressions in predicting outcome of patients with head and neck squamous-cell carcinoma treated with radical radiotherapy. *J Clin Pathol.* 2007;60:185-9.
53. Otsuki K, Alcalde RE, Matsumura T, Kimura N. Immunohistochemical analysis of nucleoside diphosphate kinases in oral squamous cell carcinomas. *Oncology.* 1997;54:63-8.
54. Ohtsuki K, Shintani S, Kimura N, Matsumura T. Immunohistochemical study on the nm23 gene produce (NDP kinase) in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 1997;33:237-9.

55. Lo Muzio L, Mignogna MD, Pannone G i sur. The nm23 gene and its expression in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 1999;6:747-51.
56. Wang YF, Chen JY, Chang SY i sur. Nm23-H1 expression of metastatic tumors in the lymph nodes is prognostic indicator of oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2008;122:377-86.
57. Lee CS, Redshaw A, Boag G. Nm23-H1 protein immunoreactivity in laryngeal carcinoma. *Cancer.* 1996;77:2246-50.
58. Gunduz M, Ayhan A, Gullu I i sur. Nm23 protein expression in larynx cancer and the relationship with metastasis. *Eur J Cancer.* 1997;33:2338-41.
59. Pestereli HE, Ozbilim G, Elpek O, Fisenek F, Balkan E. Nm23 and cathepsin D expression in laryngeal carcinomas. *Adv Clin Path.* 2000;4:121-5.
60. Sikorska B, Danilewicz M, Wagrowska-Danilewicz M. Prognostic significance of CD44v6 and nm23 protein expression in laryngeal squamous cell carcinoma. *Pol J Pathol.* 2002;53:17-24.
61. Knuth A, Jäger D, Jäger E. Cancer immunotherapy in clinical oncology. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2000;46(Suppl):S46-51.
62. Jäger D, Jäger E, Knuth A. Immune responses to tumour antigens: implications for antigen specific immunotherapy of cancer. *J Clin Pathol.* 2001;54:699-674.
63. Caballero OL, Chen YT. Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy. *Cancer Sci.* 2009;100:2014-21.
64. Rosenberg SA. Progress in human tumor immunology and immunotherapy. *Nature* 2001;411:380-383.
65. Schaffer CH, Noppen CH, Nurnberger HR i sur. Immunohistochemical detection of MAGE tumor-associated antigens in oesophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Report* 1997;4:536-41.
66. Parmiani G, Castelli C, Delerba P i sur. Cancer immunotherapy with peptid-based vaccines: What have we achieved? Where are we going? *J Natl Cancer Inst* 2002;94:805-9.
67. Nagorsen D, Scheibenbogen C, Marincola FM, Letsch A, Keilholz U. Natural T cell immunity against cancer. *Clin Cancer Res.* 2003;9:4296-303.
68. Scanlan MJ, Gure AO, Jungbluth AA, Old LJ, Chen YT. Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev.* 2002;188:22-32.

69. Castelli C, Rivoltini L, Andreola G, Carrabba M, Renkvist N, Parmiani G. T-cell recognition of melanoma-associated antigens. *J Cell Physiol.* 2000;182:323-31.
70. Renkvist N, Castelli C, Robbins PF. A listing of human tumor antigens recognized by T cells. *Cancer Immunol Immunother* 2001;50:503-515.
71. Bodey B. Cancer-testis antigens: promising targets for antigen directed antineoplastic immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther.* 2002;2:577-84.
72. Juretic A, Spagnoli GC, Schultz-Thater E, Sarcevic B. Cancer/testis tumour-associated antigens: immunohistochemical detection with monoclonal antibodies. *Lancet Oncol.* 2003;4:104-9.
73. Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U i sur. Testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:1914-8.
74. Jungbluth AA, Busam KJ, Kolb D i sur. Expression of MAGE antigens in normal tissues and cancer. *Int J Cancer* 2000;85:460-5.
75. Hofbauer GFL, Schaefer CH, Noppen CH i sur. MAGE-3 immunoreactivity in formalid – fixed, paraffin – embedded primary and metastatic melanoma. *A J Pathol* 1997;151:1549-53.
76. Chomez P, De Backer O, Bertrand M i sur. An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family. *Cancer Res* 2001;61:5544-51.
77. Rogner UC, Wilke K, Steck E i sur. The melanoma antigen gene (MAGE) family is clustered in the chromosomal band Xq28. *Genomics* 1995;29:725-31.
78. Kocher T, Schultz-Thater E, Steck E i sur. Identification and intracellular location of MAGE-3 gene product. *Cancer Res* 1995;55:2236-9.
79. Schultz-Thater E, Juretić A, Dellabona P i sur. MAGE-1 gene product is a cytoplasmic protein. *Int J Cancer.* 1994;59:435-9.
80. Herman J, van der Bruggen P, Luescher IF i sur. A peptide encoded by the human MAGE3 gene are presented by HLA-B44 induces cytolytic T lymphocytes that recognize tumor cells expressing MAGE3. *Immunogenetics.* 1996;43:377-83.
81. Brasseur F, Rimaldi D, Lienardi D i sur. Expression of MAGE genes in primary and metastatic cutaneous melanoma. *Int J Cancer* 1995;63:375-80.
82. Juretić A, Knežević F, Spagnoli GC i sur. Expression of MAGE -1, -2 and -3 genes in primary and metastatic lesions of human malignant melanomas. *Croatian Med J* 1996;37:119-22.

83. Kavalari R, Sarcevic B, Spagnoli GC i sur. Expression of MAGE tumour-associated antigens is inversely correlated with tumour differentiation in invasive ductal breast cancers: an immunohistochemical study. *Virchows Arch.* 2001;439:127-131.
84. Kocher T, Zheng M, Bolli M i sur. Prognostic relevance of MAGE-A4 tumor antigen in transitional cell carcinoma of urinary bladder: a tissue microarray study. *Int J Cancer* 2002;20:702-6.
85. Coulie PG, Karanikas V, Lurquin C i sur. Cytolytic T-cell responses of cancer patients vaccinated with a MAGE antigen. *Immunol Rev.* 2002;188:33-42.
86. Atanackovic D, Altorki NK, Cao Y i sur. Booster vaccination of cancer patients with MAGE-A3 protein reveals long-term immunological memory or tolerance depending on priming. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:1650-5.
87. Kienstra MA, Neel HB, Strome SE, Roche P. Identification of NY-ESO-1, MAGE-1, and MAGE-3 in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2003;25:457-63.
88. Eura M, Chikamatsu K, Ogi K, Nakano K, Masuyama K, Ishikawa T. Expression of genes MAGE-1, -2, and -3 by human maxillary carcinoma cells. *Anticancer Res.* 1995;15(1):5-9.
89. Eura M, Ogi K, Chikamatsu K i sur. Expression of the MAGE gene family in human head-and-neck squamous-cell carcinomas. *Int J Cancer.* 1995;64(5):304-8.
90. Lee KD, Chang HK, Jo YK i sur. Expression of MAGE 3 gene product in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Anticancer Res.* 1999;19(6B):5037-42.
91. Lee KD, Lee HH, Joo HB i sur. Expression of MAGE A 1-6 mRNA in sputa of head and neck cancer patients – a preliminary report. *Anticancer Res.* 2006;26(2B):1513-8.
92. Atanackovic D, Blum I, Cao Y, Wenzel S, Bartels K, Faltz C. Expression of cancer-testis antigens as possible targets for antigen-specific immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Biol Ther.* 2006;5(9):1218-25.
93. Ries J, Schultze-Mosgau S, Neukam F, Diebel E, Wiltfang J. Investigation of the expression of melanoma antigen-encoding genes (MAGE-A1 to A6) in oral squamous cell carcinomas to determine potential targets for gene-based cancer immunotherapy. *Int J Oncol* 2005;26(3):817-24.
94. Iwamoto O, Nagao Y, Schichijo S, Eura M, Kameyama T, Itoh K. Detection of MAGE-4 protein in sera of patients with head-and-neck squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer.* 1997;70(3):287-90.

95. Jager D, Stockert E, Scanlan MJ i sur. Cancer-testis antigens and ING 1 transcripts and a homologue gene. *Cancer Res* 1999;59:6197-204.
96. Gnjatic S, Nishikawa H, Jungbluth AA i sur. NY-ESO-1: review of an immunogenic tumor antigen. *Adv Cancer Res.* 2006;95:1-30.
97. Fujita S, Wada H, Jungbluth AA i sur. NY-ESO-1 expression and immunogenicity in esophageal cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:6551-8.
98. Schulz-Thater E, Noppen C, Gudat F i sur. NY-ESO-1 tumour associated antigen is a cytoplasmic protein detectable by specific monoclonal antibodies in cell lines and clinical specimens. *Br J Cancer.* 2000;83:204-8.

11. Životopis

Marija Pastorčić Grgić rođena je 27. siječnja 1974. u Zagrebu.

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu završila je 23.06.1998. s prosjekom ocjena 4,82. Nagrađena je Rektorovom nagradom za najbolji studentski rad: "Utjecaj osteogenog proteina – 1 (OP-1) na apoptozu stanica bubrega nakon akutne ishemije" 1997. godine.

Specijalizaciju iz otorinolaringologije započela je 1999 godine. Od 2004. godine radi kao specijalist otorinolaringolog i cervikofacijalni kirurg u Službi za tumore glave i vrata Klinike za tumore.

Poslijediplomski studij „Otorinolaringologija i maksilofacijalna kirurgija“ upisala je 1999. godine, edukaciju je nastavila kroz doktorski studij, te 2005. položila sve ispite.

Pohađala je više od 20 stručnih tečajeva iz područja ORL i kirurgije glave i vrata.

Objavila je desetak stručnih i znanstvenih radova (4 CC). S više od 30 kongresnih izlaganja aktivno je sudjelovala u nizu hrvatskih i međunarodnih kongresa.