

# Aktivacija signalnog puta cGAS-STING u karcinomu grkljana

---

**Viculin, Jelena**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2024**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:440177>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-28**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Jelena Viculin**

**AKTIVACIJA SIGNALNOG PUTA  
cGAS-STING U KARCINOMU GRKLJANA**

**Doktorska disertacija**

**U Splitu, siječanj 2024.**

Doktorska disertacija je izrađena u Klinici za onkologiju i radioterapiju, Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju Kliničkog bolničkog centra Split te u Laboratoriju za istraživanje raka Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

**Mentorica:** izv. prof. dr. sc. Jelena Korać Prlić

## ZAHVALA

Neizmjerne hvala mojoj dragoj mentorici izv. prof. dr. sc. Jeleni Korać Prlić na blagosti i toplini pri nesebičnom dijeljenju svoga znanja te čvrstoj podršci i rijetkoj, ali uvijek konstruktivnoj kritici pri izradi ove doktorske disertacije. Hvala za mirno usmjeravanje i strpljivo ispravljanje pogrešnih koraka na ovom mom putu u znanost.

Najiskrenije hvala dragoj prof. dr. sc. Katarini Vilović na profesionalnoj i osobnoj podršci te suradnji, kao i usmjerenju koje je došlo u pravom trenutku, a bez kojeg ovog rada ne bi bilo. Vaše znanje, predanost i entuzijizam jesu inspiracija.

Hvala prof. dr. sc. Eduardu Vrdoljaku koji me potaknuo na znanstveno napredovanje, kao i svim djelatnicima Klinike za onkologiju i radioterapiju na stručnoj podršci i savjetima u svakodnevnom radu.

Veliko hvala mojoj dragoj kolegici doc. dr. sc. Mariji Ban na pomoći pri svakom koraku u tijeku nastanka ovog rada, a iznad svega hvala na prijateljskoj podršci. Hvala što postojiš.

Hvala mom bratu Ivanu, ti me učiš novim i vedrijim pogledima u svijet.

Hvala mojoj teti Mariji, ne samo zato što vjeruješ u mene, nego i za svaki skuhani ručak i napravljeni kolač.

Hvala mojim dragim prijateljima Aniti i Špiru, Matei i Špiru, Tini i Kvinu, Mari, Ivanu, Tihani, Sandi, Andriji, Matei, Josipi, Ivani, Tanji, Ines, Dijani i Vini, Aldi i Strikiću, Kati, Antoniji, Niki, te susjedima teti Cviti i barba Milanu. Hvala za svaku kavu, telefonsko druženje, ručak, večeru, desert, šetnju, razgovor, strpljenje, ali i kritiku, pozitivne misli i motivaciju. Hvala mojim najdražima, Ivani, Karli, Chiari, Cviti, Paoli, Toniju, Bepu, Roku, Luki, Ivanu, Davidu, Luci, Klari, Tonću, Luci, Josipu i Anti, vi ste moji veliki mali prijatelji.

Hvala mojoj babi Dodi i didu Jozi, znam da ste ponosni tamo gore.

*Ovaj rad s dubokom zahvalnošću posvećujem svojim roditeljima Sanji i Marinu. Hvala vam za bezuvjetnu ljubav, razumijevanje i podršku, ali i kritiku i guranje naprijed kad god sam bila uvjerena da dalje ne mogu.*

# SADRŽAJ

1	UVOD.....	7
1.1	Epidemiologija i etiologija karcinoma glave i vrata te grkljana .....	7
1.2	Anatomija područja grkljana .....	14
1.3	Klinička slika karcinoma grkljana .....	17
1.4	Dijagnostika karcinoma grkljana .....	18
1.5	Patologija karcinoma grkljana .....	20
1.5.1	Prekursorske lezije.....	20
1.5.2	Histološki tipovi karcinoma grkljana.....	21
1.6	Određivanje stupnja diferencijacije za karcinom pločastih stanica grkljana .....	24
1.7	Određivanje stadija bolesti za karcinom pločastih stanica grkljana.....	25
1.8	Prognostički čimbenici karcinoma grkljana pločastih stanica .....	30
1.9	Patogeneza i molekularni biljezi karcinoma grkljana .....	33
1.10	Liječenje karcinoma grkljana .....	35
1.10.1	Liječenje karcinoma <i>in situ</i> (stadij 0) grkljana .....	36
1.10.2	Liječenje karcinoma grkljana stadija I i II.....	36
1.10.3	Liječenje karcinoma grkljana stadija III i IV.....	40
1.10.4	Liječenje metastatskog i rekurentnog karcinoma grkljana .....	48
1.10.5	Praćenje pacijenata s karcinomima grkljana .....	50
1.11	Tumorski mikrookoliš karcinoma grkljana.....	52
1.11.1	Imunološke stanice u mikrookolišu karcinoma grkljana .....	52
1.11.2	Inhibitori kontrolnih točaka.....	55
1.11.3	cGAS-STING signalni put.....	56
1.12	Problematika istraživanja .....	60
2	CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA.....	62
2.1	Hipoteza.....	62
2.2	Ciljevi istraživanja .....	62
3	ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA .....	63
3.1	Ispitanici .....	63
3.1.1	Kriteriji uključenja.....	63
3.1.2	Kriteriji isključenja .....	63
3.2	Određivanje veličine uzorka .....	64
3.3	Prikupljanje podataka.....	64
3.4	Imunohistokemija.....	64
3.5	Analiza imunohistokemijskog bojenja.....	65

3.6	Statistički postupci.....	68
4	REZULTATI RADA .....	69
4.1	Epidemiološka analiza .....	69
4.2	Imunohistokemijska analiza ekspresije proteina STING i cGAS te infiltracije imunološkim stanicama .....	81
5	RASPRAVA.....	92
6	ZAKLJUČCI .....	101
7	SAŽETAK.....	104
8	SUMMARY .....	105
9	ŽIVOTOPIS.....	107
10	LITERATURA .....	111

## POPIS OZNAKA I KRATICA

AJCC, engl. *The American Joint Committee on Cancer*

B7, protein B7

BAHNO, engl. *The British Association of Head and Neck Oncologists*

BRCA, engl. *BReast CAncer gene*

CAP, engl. *College of American Pathologists*

Cas9, engl. *CRISPR associated protein 9*

CDKN1A, engl. *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*

CDKN2A, engl. *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*

CD8, engl. *cluster of differentiation 8*

CD68, engl. *cluster of differentiation 68*

CD163, engl. *cluster of differentiation 163*

cGAMP, engl. *cyclic GMP-AMP*

cGAS, engl. *cyclic GMP-AMP synthase*

CI, engl. *confidence interval*

CIS, karcinom *in situ*

CHD1, engl. *chromodomain-helicase DNA-binding 1 protein*

CO<sub>2</sub>, ugljikov dioksid

CPS, engl. *combined positive score*

CRISPR, engl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*

CSG-3, engl. *cGAS-STING groups-3*

ctDNA, engl. *circulating tumor DNA*

CTLA-4, engl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*

DC, engl. *dendritic cell*, dendritička stanica

DFS, engl. *disease-free survival*, preživljenje bez znakova bolesti

DNA, engl. *deoxyribonucleic acid*

DSS, engl. *disease-specific survival*, za bolest specifično preživljenje

EBV, Epstein-Barr virus

ECOG, engl. *Eastern Cooperative Oncology Group*

EDTA, engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*

EGFR, engl. *epidermal growth factor receptor*, receptore epidermalnog čimbenika rasta

ENE, engl. *extra-nodal extension*, ekстранodalna ekstenzija

FGF3, engl. *fibroblast growth factor 3*, faktor rasta fibroblasta 3

FNA, engl. *fine needle aspiration*, aspiracija tankom iglom  
BCL-2, engl. *B-cell lymphoma 2*  
GLOBOCAN, engl. *The Global Cancer Observatory*  
Gy, Gray  
IFN- $\gamma$ , engl. *interferon gamma*  
IGF1R, engl. *insulin like growth factor 1 receptor*  
IMRT, engl. *intensity-modulated radiation therapy*  
IQR, engl. *interquartile range*  
IRF 3, engl. *interferon regulatory factor 3*  
KBC, klinički bolnički centar  
KRAS, engl. *Kirsten rat sarcoma virus*  
HCV, virus hepatitisa C  
HIV, virus humane imunodeficijencije  
HLA, engl. *human leucocyte antigen*  
HPV, humani papiloma virus  
LFS, engl. *laryngectomy-free survival*, preživljenje bez laringektomije  
MAPK, engl. *mitogen-activated protein kinase*  
MDSCs engl. *myeloid-derived suppressor cells*, supresijske stanice mijeloidnog porijekla  
miRNA, engl. *microRNA*  
MR, magnetska rezonancija  
MSCT, engl. *multislice computed tomography*  
NCI, engl. *National Cancer Institute*  
NF $\kappa$ B, engl. *nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells*  
NKC, engl. *natural killer cells*, prirodne stanice ubojice  
NOTCH, engl. *neurogenic locus notch homolog protein*  
NTRK2, engl. *neurotrophic tyrosine receptor kinase*  
OPP, engl. *organ preservation protocol*, protokol očuvanja organa  
OS, engl. *overall survival*, ukupno preživljenje  
PARP, engl. *poly-ADP ribose polymerase*  
PD-1, engl. *programmed cell death-protein 1*  
PD-L1, engl. *programmed death-ligand 1*  
PD-L2, engl. *programmed death-ligand 2*  
PET/CT, pozitronska emisijska tomografija s CT-om  
PFS, engl. *progression-free survival*, preživljenje bez progresije bolesti

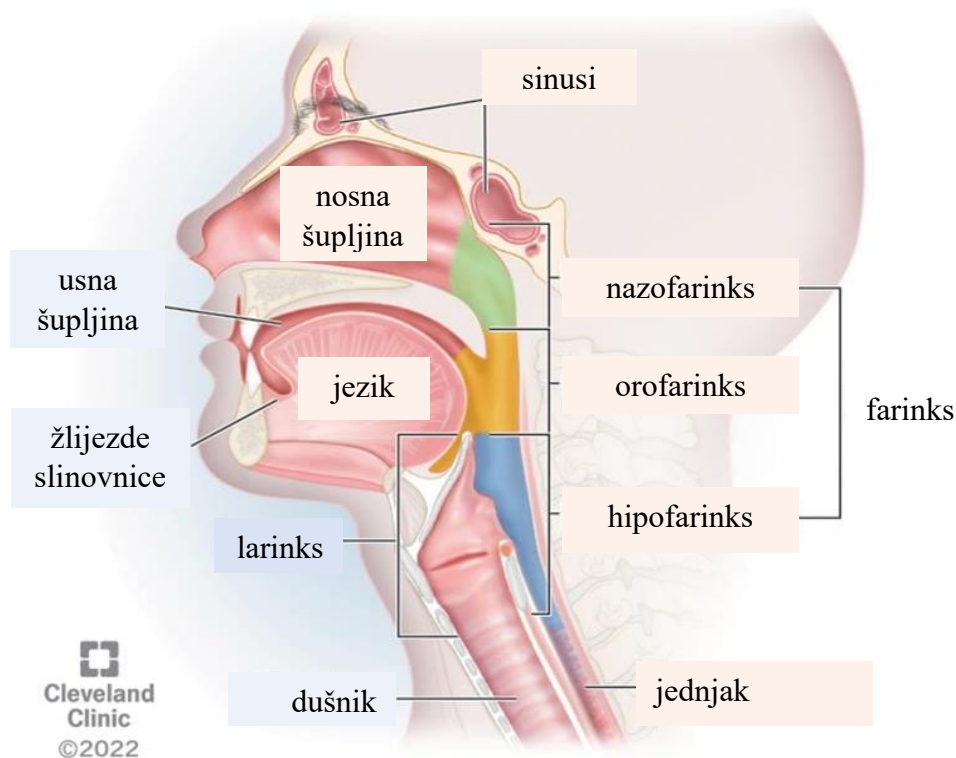
PIK3CA, engl. *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*  
PTEN, engl. *phosphatase and tensin homolog*  
RB1, engl. *retinoblastoma protein 1*  
RNA, engl. *ribonucleic acid*  
ROS, engl. *reactive oxygen species*  
SAD, Sjedinjene Američke Države  
SASP, engl. *senescence-associated secretory phenotype*  
SBRT, engl. *stereotactic body radiation therapy*  
SCC, engl. *squamous cell carcinoma*  
SEER, engl. *The Surveillance, Epidemiology, and End Results*  
SIL, engl. *squamous intraepithelial lesion*  
STING, engl. *stimulator of interferon genes*  
TAMs, engl. *tumor-associated macrophages*, tumoru pridruženi makrofagi  
TBK1, engl. *TANK-binding kinase 1*  
TBS, engl. *tris buffered saline*  
TCGA, engl. *The Cancer Genome Atlas*  
Tex, engl. *exhausted T cells*, iscrpljene T stanice  
TIL, engl. *tumor-infiltrating lymphocytes*, tumor infiltrirajući limfociti  
TLM, engl. *transoral laser microsurgery*  
TMB, engl. *tumor mutational burden*, mutacijsko opterećenje tumora  
TNM, engl. *Tumor - Node – Metastasis*, TNM klasifikacijski sustav  
TP53, engl. *tumor protein p53*  
TP63, engl. *tumor protein p63*  
TPF, docetaksel, cisplatina, 5FU protokol  
Tregs, engl. *regulatory T cells*, regulatorne T stanice  
UICC, engl. *Union for International Cancer Control*  
UZV, ultrazvuk  
VMAT, engl. *volumetric modulated arc therapy*  
WHO, engl. *World Health Organisation*  
3DCRT, engl. *three-dimensional conformal radiation therapy*  
5FU, 5-fluorouracil



# 1 UVOD

## 1.1 Epidemiologija i etiologija karcinoma glave i vrata te grkljana

Zloćudni tumori glave i vrata zauzimaju sedmo mjesto po učestalosti među malignim bolestima u svijetu, s više od 900.000 oboljelih te više od 400.000 umrlih u 2020. godini [1,2]. U Europi je u 2012. godini dijagnosticirano oko 140.000 novih slučajeva, a umrlo je više od 63.000 oboljelih [3]. Procjenjuje se da će u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) tijekom 2023. godine biti dijagnosticirano gotovo 67.000 novih slučajeva, a da će umrijeti više od 15.000 oboljelih [4]. U Europi su, naspram SAD-a, više stope incidencije i mortaliteta. Više od 90 % tumora glave i vrata čine karcinomi pločastih stanica koji nastaju iz sluznice usne šupljine, orofarinksa, hipofarinksa i larinksa [5]. Tumori glave i vrata obuhvaćaju i karcinome nazofarinksa, štitnjače te rijetke druge podtipove kao što su tumori žlijezda slinovnica, sinusa, melanome sluznice i tumore mezenhimalnog podrijetla, koji zbog svojih drugačijih bioloških, etioloških i histoloških obilježja, simptomatologije, načina liječenja i prognoze, najčešće nisu uključeni u epidemiološke studije zloćudnih tumora glave i vrata (slika 1) [6].



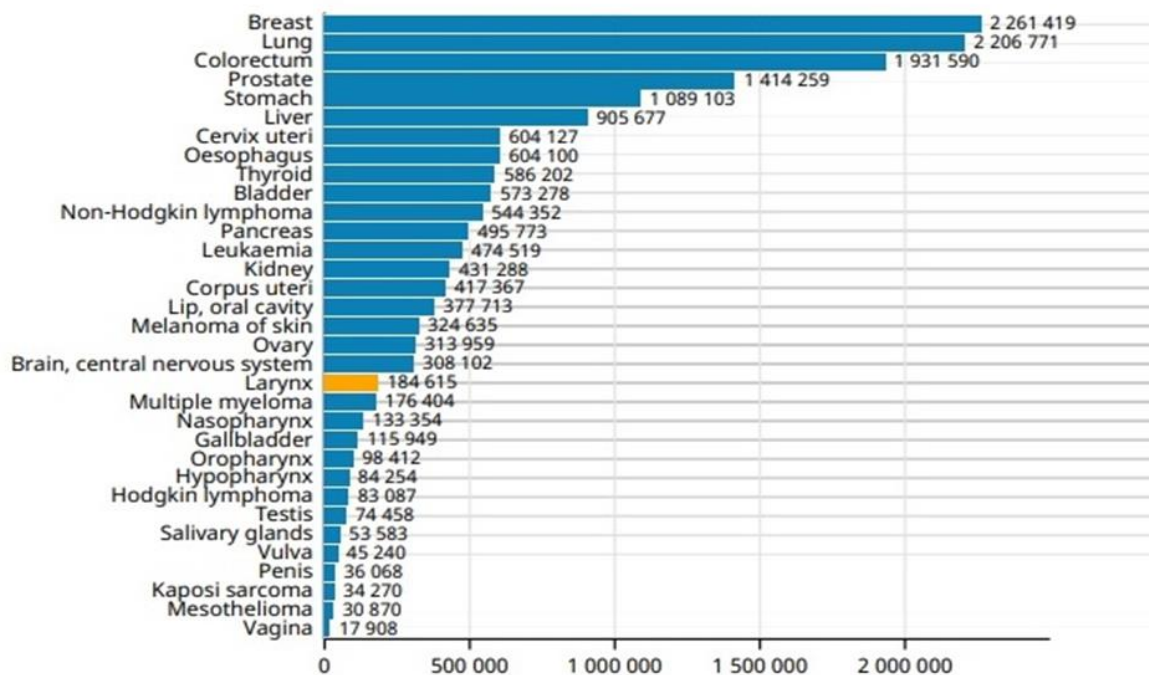
**Slika 1.** Anatomija karcinoma glave i vrata (preuzeto i prilagođeno prema Cleveland Clinic).

Naglašene razlike u učestalosti i smrtnosti, ali i porastu i padu istih tijekom vremena, u različitim krajevima svijeta, koreliraju s faktorima rizika kao i stupnjem socio-ekonomskog razvoja pojedinih regija. Općenito muškarci oboljevaju 2 do 4 puta češće od žena [5,6]. Stopa incidencije kod muškaraca prelazi 20/100.000 u pojedinim regijama svijeta kao što su Francuska, Hong Kong, Indija, srednja i istočna Europa, Španjolska, Italija, Brazil te među Afroamerikancima u SAD-u [1]. Incidencija ovih tumora i dalje je u porastu te se predviđa porast od 30 % do 2030. godine, u razvijenim, ali i u zemljama u razvoju [1,7]. Visoka prevalencija zloćudnih tumora glave i vrata u Južnoistočnoj Aziji i Australiji povezana je s određenim životnim navikama i izloženosti rizičnim faktorima, najčešće konzumacijom alkohola i pušenjem cigareta, dok je porast prevalencije u Zapadnoj Europi i SAD-u povezan s porastom učestalosti infekcija humanim papiloma virusom (HPV) orofaringealnog područja [5]. Karcinomi usne šupljine se nalaze na prvom mjestu po učestalosti među karcinomima glave i vrata u nerazvijenim zemljama, dok su u zapadnim zemljama sve zastupljeniji karcinomi orofarinksa [1,2]. Rizik razvoja karcinoma glave i vrata raste s dobi, a većina slučajeva dijagnosticira se iza pedesete godine [8]. Medijan dobi pri dijagnozi iznosi 66 godina, a u pacijenata s tumorima povezanim s HPV infekcijom oko 53 godine [9]. Prognoza pacijenata sa zloćudnim tumorima glave i vrata ovisi o stadiju bolesti, sijelu primarnog tumora, općem stanju i komorbiditetima pacijenta, geografskoj regiji i stupnju razvijenosti iste te drugim prognostičkim čimbenicima kao što je HPV status. Zbog specifičnosti populacije koja oboljeva od karcinoma glave i vrata, važno je istaknuti utjecaj malnutricije i kaheksije. One su često prisutne kod ovih pacijenata pri postavljanju dijagnoze te utječu na pogoršanje prognoze, ali i dulji oporavak i češće komplikacije nakon kirurških zahvata [10,11]. EUROCARE studija pokazala je da su stope petogodišnjeg preživljenja najniže za karcinome hipofarinksa (25 %), a najviše za karcinome grkljana (59 %) [3]. Najviše stope preživljenja imaju pacijenti s lokaliziranim stadijem bolesti. Nešto više od 30 % pacijenata s karcinomima glave i vrata se dijagnosticira u lokaliziranom stadiju bolesti. Pri dijagnozi karcinoma hipofarinksa taj postotak obuhvaća 15 % pacijenata, a kod karcinoma grkljana 50 % pacijenata. Unatoč tome, stope trogodišnjeg preživljenja karcinoma glave i vrata iznose oko 40 % kod dijela pacijenata s lokaliziranim stadijem bolesti [3]. U tijeku je nekoliko velikih prospektivnih kohortnih studija koje istražuju čimbenike udružene s relativno lošim preživljenjem među pacijentima sa zloćudnim tumorima glave i vrata. Uvažavajući do sada prikupljene podatke, uz podatke iz kliničke prakse, navedene studije su pokazale da postoje značajne socio-ekonomske nejednakosti u preživljenju pacijenata s ovim tumorima u Ujedinjenom Kraljevstvu, a koje se ne mogu objasniti samo razlikama u bihevioralnim faktorima rizika [12]. Stopa preživljenja za

zloćudne tumore glave i vrata skromno se povisila tijekom posljednjih trideset godina. Tako se stopa petogodišnjeg preživljenja povećala s 55 %, tijekom razdoblja od 1992. do 1996. godine, na 66 % za razdoblje od 2002. do 2006. godine, prema registru Nacionalnog instituta za rak SAD-a (engl. *National Cancer Institute*, NCI, i *The Surveillance, Epidemiology, and End Results* (SEER)) [13]. Analizom podskupina zabilježeno je poboljšanje stope petogodišnjeg preživljenja u svim dobnim skupinama osim u pacijenata starijih od 75 godina te kod karcinoma grkljana. Navedeno se više pripisivalo povećanoj učestalosti razvoja tumora povezanih s HPV infekcijom, za koje je poznato da imaju bolju prognozu, nego samim napretkom u liječenju ove bolesti [5,14]. Osim smrtnosti uzrokovane direktnom posljedicom zloćudne bolesti, pacijenti s tumorima glave i vrata imaju drugu po učestalosti stopu samoubojstava, nakon pacijenata s karcinomima gušterače. Ona za ove pacijente iznosi 63.4/100.000, dok je za ostale zloćudne tumore, osim raka gušterače, 23.6/100.000. Posljedica je ovo psihološkog opterećenja bolešću kao i narušene kvalitete života morbiditetom terapijskih zahvata, što ukazuje na funkcionalnu važnost organa područja glave i vrata [15].

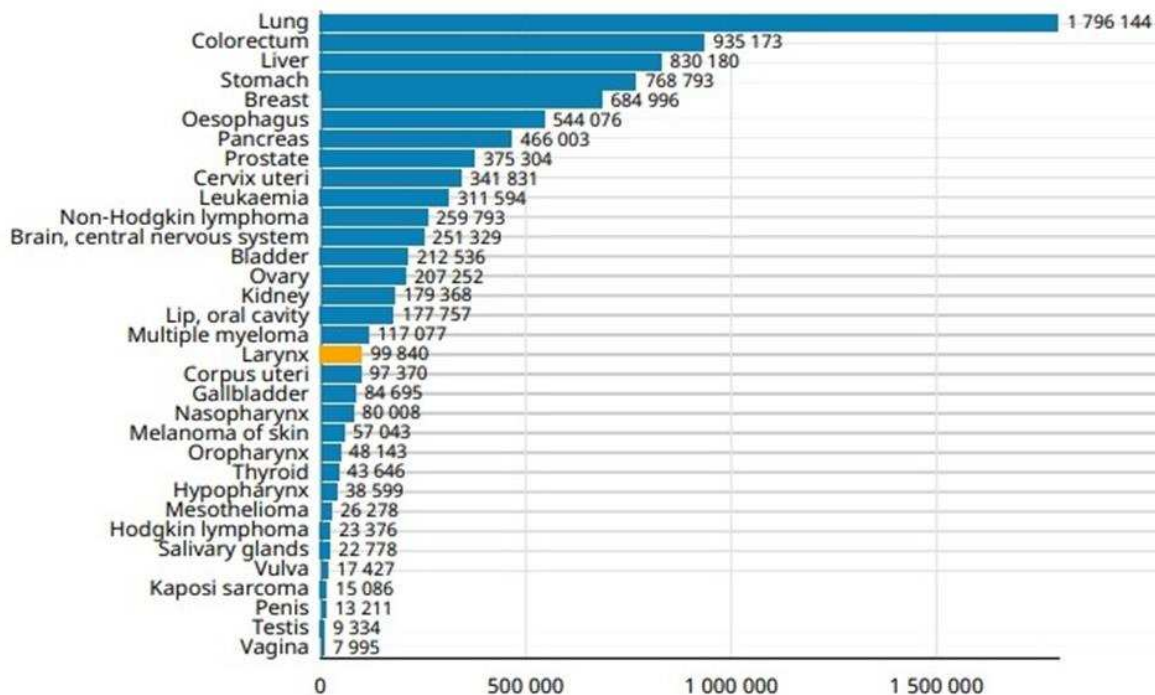
Zloćudni tumori glave i vrata čine, ovisno o regiji svijeta, oko 3 do 5 % svih malignih bolesti, a među njima je drugi po učestalosti rak grkljana s oko 30 % svih novo dijagnosticiranih slučajeva [1,16]. I za karcinome grkljana, kao i za zloćudne tumore glave i vrata općenito, postoje razlike u učestalosti i smrtnosti u različitim regijama svijeta, ovisno o čimbenicima rizika i dostupnim modalitetima dijagnostike i liječenja. Iako je učestalost raka grkljana u padu u razvijenim zemljama, što se može povezati s promjenama navika u korištenju alkohola i pušenja cigareta, prema Međunarodnoj agenciji za istraživanje raka, procjenjuje se da je više od 184.000 ljudi oboljelo od karcinoma grkljana u 2020. godini, a gotovo 100.000 ljudi umrlo od ove bolesti, diljem svijeta (slika 2 i 3) [1,2].

## Number of new cases in 2020, both sexes, all ages



Slika 2. Incidencija karcinoma grkljana u svijetu (preuzeto s GLOBOCAN).

## Number of deaths in 2020, both sexes, all ages



Slika 3. Mortalitet karcinoma grkljana u svijetu (preuzeto s GLOBOCAN).

U Europi je tijekom 2020. godine oboljelo gotovo 40.000 ljudi, a umrlo gotovo 20.000 oboljelih. Prema procjeni GLOBOCAN-a (engl. *The Global Cancer Observatory*), dobno-standardizirana stopa incidencije za svjetsko stanovništvo iznosi 2/100.000, a stopa mortaliteta 1/100.000, sa značajnim varijacijama u različitim regijama svijeta. Incidencija i mortalitet najviši su u području Istočne i Centralne Europe te Karibima, sa stopom učestalosti 3,6 - 4/100.000 i stopom mortaliteta 1,9 - 2,1/100.000 [1]. Kao i u drugim sijelima, pločasti karcinomi čine više od 95 % slučajeva karcinoma grkljana, a dobro i umjereno diferencirani zastupljeni su u nešto višem postotku od slabo diferenciranih karcinoma (43,5 % naspram 41,5 %). Oko dvije trećine ovih tumora potiče iz područja glotisa, a gotovo trećina iz područja supraglotisa. Tumori primarnog sijela subglotisa su rijetki. Transglotički tumori obuhvaćaju sva tri anatomska područja larinksa i rjeđe su zastupljeni (u manje od 5 % slučajeva) [17].

U Republici Hrvatskoj je prema posljednjim podacima Registra za rak za 2020. godinu zabilježeno nešto manje od 300 novo dijagnosticiranih pacijenata s karcinomima grkljana te više od 160 umrlih, od čega više od 90 % čine muškarci [1]. Prema procjeni GLOBOCAN-a, dobno-standardizirana stopa incidencije karcinoma grkljana u 2012. godini za Republiku Hrvatsku iznosila je 8,3/100.000 za muškarce, a stopa mortaliteta 4,2/100.000. U 2020. godini dobno-standardizirana stopa incidencije karcinoma grkljana za oba spola za Republiku Hrvatsku iznosila je 3,5/100.000, a stopa mortaliteta 1,8/100.000, što je i dalje više od prosjeka u zapadnim zemljama [1].

Poznato je da su pušenje cigareta i uzimanje alkohola glavni čimbenici rizika za razvoj zloćudnih tumora glave i vrata, posebno karcinoma usne šupljine, hipofarinksa i larinksa. Čimbenici rizika općenito imaju slične učinke na rizik razvoja karcinoma u različitim primarnim sijelima područja glave i vrata, iako taj učinak može varirati, pa je pušenje cigareta najrizičnije za razvoj karcinoma grkljana, a uzimanje alkohola za razvoj karcinoma usne šupljine i orofaringealnog područja [18]. Pojavnost nekih čimbenika rizika, tako i razvoja karcinoma glave i vrata različitih primarnih sijela, povezana je i s različitim geografskim područjima i kulturološkim običajima (npr. povezanost razvoja karcinoma usne šupljine u azijsko-pacifičkoj populaciji sa žvakanjem proizvoda „areca“ ploda) [5].

Pušenje cigareta snažniji je čimbenik rizika za razvoj zloćudnih tumora glave i vrata od konzumacije alkohola. Rizik nastanka karcinoma usne šupljine, orofarinksa i hipofarinksa njegovim korištenjem raste za 4 do 5 puta, a karcinoma grkljana za 10 puta [19]. Kod teških pušača postoji 5 do 25 puta viši rizik za razvoj karcinoma glave i vrata naspram nepušača [20,21]. Različite serije istraživanja pokazale su da postoji uzajamna povezanost između

pojavnosti raka i količine korištenih cigareta kao i duljine izloženosti [22]. Prestanak pušenja bio je povezan sa značajnim smanjenjem relativnog rizika za razvoj karcinoma glave i vrata [23].

I drugo izlaganje duhanu, osim cigareta, također je povezano s povećanim rizikom od razvoja zloćudnih tumora glave i vrata. Tako je pušenje cigara i lule povezano s povećanom učestalošću razvoja ovih karcinoma, a porast rizika prisutan je i u onih koji nikada nisu pušili cigarete [21]. Žvakanje duhana i drugi načini korištenja, osim pušenja, povezani su s povećanim rizikom od razvoja karcinoma usne šupljine i farinksa [24]. Izloženost pasivnom pušenju može također biti faktor koji pridonosi razvoju karcinoma glave i vrata [25]. Kod nepušača je i upotreba bezdimnih duhanskih proizvoda povezana s povećanim rizikom od karcinoma glave i vrata, osobito usne šupljine [24].

Upotreba samog alkohola, također je neovisni čimbenik rizika razvoja ovih tumora. Unatoč tome što je često teško razdijeliti učinke pušenja cigareta i primjene alkohola, samo uzimanje više od 4 alkoholna pića dnevno povisuje rizik razvoja karcinoma glave i vrata za 5 do 6 puta [22,26]. Postoji mogućnost interakcije genetske preosjetljivosti i unosa alkohola na rizik razvoja karcinoma glave i vrata, u osoba s genetskim polimorfizmima alkohol-dehidrogenaze i aldehid-dehidrogenaze [27].

Konsumacija alkohola i duhana sinergistički djeluje na razvoj karcinoma glave i vrata [22,23,26,28]. Tako u teških pušača (koji puše više od 2 kutije cigareta dnevno) i alkoholičara (koji uzimaju više od 4 alkoholna pića dnevno) postoji 35 puta viši rizik razvoja zloćudnih tumora glave i vrata [19]. Kod ovih pacijenata zbog pojave kancerizacije polja gornjeg dišnog i probavnog sustava postoji rizik razvoja novih primarnih tumora ovih regija [29].

Više vrsta virusnih infekcija povezuju se s povećanim rizikom razvoja karcinoma glave i vrata, uključujući Epstein-Barr (EBV), HPV, virus hepatitisa C (HCV), ali i virus humane imunodeficijencije (HIV), koji doprinosi razvoju karcinoma općenito. Trajna infekcija HPV-om i EBV-om poznati su etiološki čimbenici rizika za karcinome orofarinksa, odnosno nazofarinksa [30,31]. Incidencija HPV pozitivnih karcinoma glave i vrata (najčešće podtipovi 16 i 18), posebno orofarinksa, nastavlja rasti, osobito u populaciji koja nije cijepljena protiv HPV-a prije izlaganja virusu [32,33].

Pacijenti s Fanconijevom anemijom imaju visok rizik od razvoja zloćudnih bolesti, uključujući i karcinome pločastih stanica glave i vrata, koji u njih češće nastaju u ranijoj dobi i u nedostatku drugih čimbenika rizika (duhan, alkohol) [34,35]. Čimbenici vezani uz prehranu i stil života

smatraju se faktorima rizika malog značaja za razvoj karcinoma glave i vrata [36]. Kontradiktorni su rezultati istraživanja čimbenika povezanih s profesionalnom ili okolišnom izloženošću na povišenje rizika razvoja karcinoma glave i vrata [37–39].

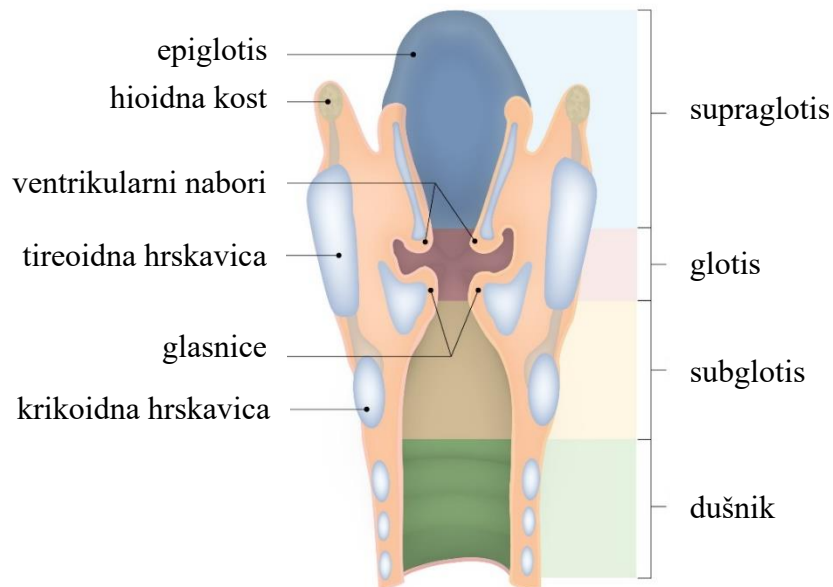
Čimbenici rizika manjeg značaja za razvoj karcinoma grkljana uključuju gastroezofagealni refluks, Plummer-Vinsonov sindrom, anatomske malformacije, izloženost fizikalnim, kemijskim i čestičnim iritansima (toplina, kemikalijama, azbestu, niklu) ili ionizirajućem zračenju [17]. HPV infekcija (najčešće podtip 16) kao čimbenik rizika za razvoj raka grkljana još nije jasno definirana, iako je njegova prevalencija značajno niža nego kod karcinoma orofarinksa [40].

Konзумiranje duhana i alkohola etablirani su čimbenici rizika za razvoj karcinoma glave i vrata. Ipak, detaljno razumijevanje njihovog mehanizma djelovanja u smislu preciznih procjena rizika, zajedničkog multipliciranja učinka, učinka ovisnog o dozi, učestalosti i duljini korištenja, kao i dobiti prestanka korištenja, ostaju i dalje nedovoljno jasni. Uloga drugih potencijalnih čimbenika rizika, kao što su bezdimni duhan, prehrana, oralna higijena, genetski, profesionalni i socio-ekonomski status, u razvoju ovih tumora nije dovoljno razjašnjena. Izazovi boljeg uvida u etiološke čimbenike posljedica su heterogenosti u dizajnu ovih uglavnom opservacijskih studija, ali i u populaciji koja je s njima obuhvaćena [2].

## 1.2 Anatomija područja grkljana

Grkljan je šuplji, cjevasti, pokretni organ sačinjen od hrskavica, mišića, ligamenata, odnosno membrana i sluznice. Smješten je u prednjoj regiji vrata, a spoj je gornjeg i donjeg dijela dišnog puta. Grkljan se nastavlja nakon jezika i ždrijela s jedne te dušnika s druge strane, a svojim specifičnim položajem sudjeluje u funkciji disanja, gutanja i govora. Primarna, najstarija funkcija grkljana je zaštita donjeg dijela dišnog puta od aspiracije hrane tijekom gutanja, a evolucijski najznačajnija, je produkcija glasa. Grkljan se uobičajeno pruža od visine trećeg do sedmog vratnog kralješka, a njegova duljina i širina ovise o dobi, spolu i građi osobe. Razumijevanje anatomije i funkcije grkljana važno je za prepoznavanje, dijagnosticiranje i planiranje liječenja karcinoma ovog područja, posebno kirurških zahvata. Putevi širenja tumora ovog područja ovise o sijelu primarnog tumora. Mišići i ligamenti, odnosno membrane stabiliziraju hrskavičnu strukturu te omogućuju njeno kretanje. Oni također svojom građom, kao i hrskavice, čine laringealne odjeljke koji su važni jer utječu na putove širenja tumora, a istovremeno otežavaju, tj. onemogućavaju prikaz tumora kliničkim pregledom. Hrskavični kostur grkljana čine epiglotis, tireoidna i krikoidna hrskavica te parne hrskavice, ariepiglotske, kornikulatne i kuneiformne. Epiglotis je elastična hrskavica koja pokriva otvor grkljana, a povezana je s unutarnjom površinom tireoidne hrskavice. Pri gutanju, hioidna kost vuče grkljan prema gore, dolazi do preklapanja epiglotisa preko otvora grkljana, čime se onemogućava ulazak hrane ili pića u dušnik, a omogućava njihov ulazak u jednjak. Tireoidna hrskavica djeluje kao štit (štitasta hrskavica) koji okružuje prednji dio grkljana. Aritenoidne hrskavice su fleksibilne i naslanjaju se preko stražnjeg dijela krikoidne hrskavice, dok se kornikulatne naslanjaju na vrhove aritenoidnih. Krikoidna hrskavica potpuno okružuje dušnik i nalazi se u donjem dijelu grkljana. Kuneiformne hrskavice su smještene u ariepiglotskim naborima, nisu vezane uz druge hrskavice grkljana i služe kao potpora glasnicama i lateralnim dijelovima epiglotisa. Unutarnji ligamenti povezuju hrskavice grkljana međusobno, a vanjski ligamenti grkljan s drugim strukturama poput hioidne kosti i dušnika. Hrskavice grkljana pomične su zahvaljujući međusobnim zglobnim ploham. Anatomski područje grkljana čine tri regije, supraglotis, glotis i subglotis (slika 4).

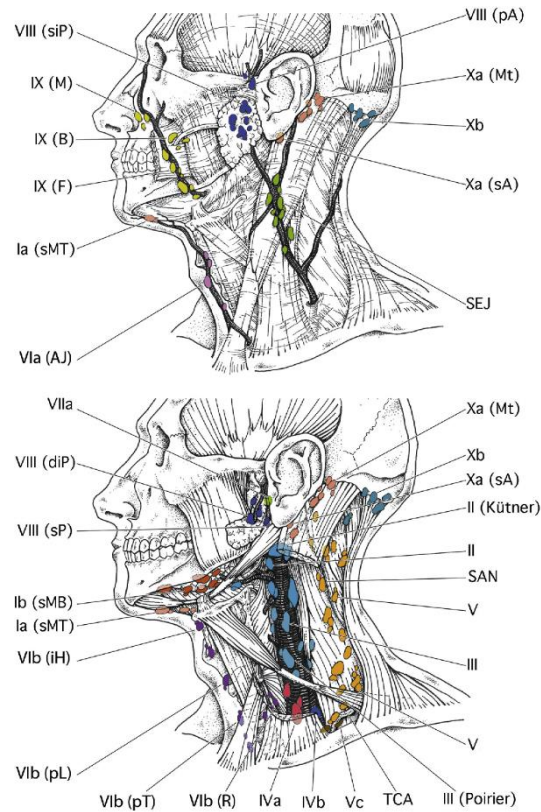




**Slika 4.** Anatomske regije grkljana (preuzeto i prilagođeno prema [www.lecturio.com](http://www.lecturio.com)).

Gornji dio grkljana, supraglotis, uključuje epiglotis, ariepiglotske nabore, aritenoide i lažne glasnice. Glotis obuhvaća prostor od donjeg ruba lažnih glasnica do prostora ispod pravih glasnica te prednju i stražnju komisuru. Donji dio grkljana, subglotično područje, počinje otprilike 0,5 do 1 cm ispod pravih glasnica i proteže se do donje granice tireoidne hrskavice ili gornjeg ruba prvog trahealnog prstena. Krvna opskrba grkljana dolazi iz gornje i donje laringealne arterije koje su grane gornje tireoidne arterije. Vene prate arterije i dreniraju vensku krv u gornje i donje tireoidne vene, tj. dalje, unutaranju jugularnu venu i subklaviju. Limfna drenaža grkljana obuhvaća supraglotične i infraglotične limfne puteve. Uz anatomiju grkljana, za pravilnu dijagnozu stadija bolesti i planiranje liječenja potrebno je poznavati i puteve širenja karcinoma ovoga područja u limfne čvorove, kao i njihovu lokalizaciju, tzv. regije. Limfni čvorovi na vratu povijesno su bili podijeljeni u šest anatomskih regija s ciljem određivanja stadija bolesti i planiranja terapije. Definicija pojedinih regija varira, ovisno o specijalnostima. U onkologiji i radioterapiji se koriste smjernice iz 2013. godine, nastale dogovorom više relevantnih onkoloških društava, koje limfne čvorove vrata dijele u ukupno deset regija [41]. Supraglotično područje obiluje limfnom mrežom te se drenira u duboke limfne čvorove vrata nakon prolaska kroz preepiglottični prostor i tireoidnu membranu. Od 25 do 50 % pacijenata s karcinomom supraglotisa ima pri postavljanju dijagnoze metastaze u limfne čvorove, a nije rijetka ni bilateralna zahvaćenost. Subglotično područje ima manje gustu limfnu mrežu, koja se drenira u donje duboke vratne te rjeđe mediastinalne čvorove, putem pretrahealnih, paratrahealnih i prelaringealnih limfnih čvorova, nakon prolaska kroz krikotireoidnu i

krikotrahealnu membranu. Područje samog glotisa, tj. prave glasnice imaju skromno razvijenu limfnu drenažu zbog čega su metastaze u limfne čvorove prisutne kod uznapredovalih stadija bolesti u 10 % do 35 % slučajeva, a područja najvišeg rizika su regije II, III, IV i VI [42] (slika 5).



**Slika 5.** Regije limfnih čvorova vrata (preuzeto iz Gregoire et al. 2013).

Grkljan je inerviran putem donjeg (povratnog) i gornjeg laringealnog živca koji su grane desetog kranijalnog živca. Gornji laringealni živac prima i grane iz gornjeg cervikalnog ganglija simpatičkog živčanog sustava te se dijeli u dvije grane. One inerviraju gornji dio grkljana. Donji laringealni živac inervira sve intrinzične mišiće grkljana osim krikotireoidnog. Vanjski mišići grkljana su upareni i omogućuju pokretanje grkljana kraniokaudalno, uz pomaganje pokreta gutanja, dok intrinzični mišići sudjeluju u produkciji glasa. I drugi mišići, koji se ne smatraju mišićima grkljana u užem smislu, jer se ne pripajaju na grkljan ili njegove dijelove, također mogu doprinijeti pokretima grkljana [43,44].

### 1.3 Klinička slika karcinoma grkljana

Promuklost je prvi i najčešći simptom karcinoma glasnice, odnosno glotisa, koji čini dvije trećine svih dijagnosticiranih karcinoma grkljana. Karcinomi najčešće nastaju na prednjem gornjem slobodnom rubu glasnice, a mogu izazvati njenu fiksaciju bilo veličinom tumora ili infiltracijom intrinzičnih mišića. Kod uznapredovalih stadija karcinoma glotisa te karcinoma supraglotisa, javlja se promjena kvalitete glasa, nelagoda i osjećaj stranog tijela u grlu, odnosno vratu, bol u grlu koja se može širiti prema uhu, bolovi pri gutanju, stridor ili masa na vratu u smislu uvećanih, metastatskih limfnih čvorova. Karcinomi supraglotisa obično se dijagnosticiraju u lokoregionalno uzapredovalim stadijima bolesti, što je povezano s kasnom pojavom simptoma. Postojanje metastaza u regionalnim limfnim čvorovima obilježje je karcinoma supraglotisa te se nalazi kod 55 % pacijenata pri dijagnozi, a kod 16 % pacijenata metastaze u limfne čvorove su bilateralne [45]. Karcinomi subglotisa su rijetki, i obično se simptomi pojave pri širenju na ostala područja grkljana i vrata, npr. promuklost pri zahvaćanju glasnice, uvećani, zahvaćeni limfni čvorovi. Unatoč činjenici da se simptomi karcinoma glotisa javljaju rano, prema SEER registru Nacionalnog instituta za rak SAD-a, procjenjuje se da će u 2023. godini svega 50 % novo dijagnosticiranih slučajeva karcinoma larinksa biti otkriveno u lokaliziranom stadiju bolesti [16]. Navedeno je djelomično posljedica nedostatka ranih simptoma kod karcinoma supraglotisa koji često rastu egzofitično i invazivniji su od tumora glotisa, uz mogućnost ranog metastaziranja u regionalne limfne čvorove, a također i specifičnosti populacije koja obolijeva od karcinoma grkljana, a što je uzrok dijagnosticiranja bolesti u uznapredovalim stadijima [45,46]. Udaljenim metastazama u karcinomu pločastih stanica obično prethode metastaze u limfnim čvorovima. Hematogena diseminacija bolesti može se javiti u uznapredovalim stadijima karcinoma grkljana, a najčešća je u medijastinalnim limfnim čvorovima, plućima, jetri, pleuri i kostima, a može zahvatiti i druge organe.

## 1.4 Dijagnostika karcinoma grkljana

Cilj je dijagnostičke obrade što ranija potvrda maligne bolesti kod sumnje na istu. Preporuka je Britanske udruge onkologa glave i vrata (*The British Association of Head and Neck Oncologists* (BAHNO)) dijagnostičku obradu i planiranje liječenja zloćudnih tumora glave i vrata, pa tako i karcinoma grkljana, dovršiti unutar četrnaest dana [47]. Odgode u početku liječenja utječu negativno na ishode, neovisno o spolu, dobi, veličini i proširenosti primarnog tumora. Potrebno je zbog planiranja liječenja što brže utvrditi prirodu suspektne lezije, s ciljem što točnijeg i najmanje mogućeg invazivnog utvrđivanja lokalne, regionalne i udaljene proširenosti, tj. stadija bolesti. Potrebno je ispitati kliničke simptome, vrijeme njihove pojave i brzinu progresije ukoliko je prisutna, ranije utvrđene i liječene zloćudne bolesti i komorbiditete, obiteljsku anamnezu, socijalnu situaciju te profesionalnu i bihevioralnu izloženost rizičnim čimbenicima. Preporuka je prekid korištenja duhana i alkohola, ne samo zbog negativnog utjecaja na kliničke ishode, već i smanjenja rizika za razvoj drugih primarnih tumora. Poznato je da se povrat bolesti u pacijenata s karcinomom grkljana javlja najčešće u vremenu praćenja tijekom druge ili treće godine od postavljanja dijagnoze, dok se iza pete godine taj rizik značajno smanjuje te se češće dijagnosticiraju drugi primarni zloćudni tumori gornjeg dijela dišnog, odnosno probavnog sustava. Promuklost je najčešći rani simptom karcinoma glotisa. Bol pri gutanju ili bol grla koja se širi prema uhu mogu ukazivati na uznapredovali stadij karcinoma glotisa ili biti rani simptom karcinoma supraglotisa. Metastaze u limfne čvorove palpiraju se pri kliničkom pregledu kao fiksirane, čvrste, bezbolne mase na vratu. Simptomi lokoregionalno uznapredovale bolesti ili diseminiranog karcinoma grkljana, bilo koje od anatomskih regija, uključuju gubitak tjelesne mase, otežano gutanje, aspiraciju i druge. Osim inspekcije i palpacije struktura područja glave i vrata, najvažniji je dio fizikalnog pregleda indirektna laringoskopija. Uz nju je, od invazivnih pretraga, potrebna i video-fiberendoskopija s ciljem prikaza cijele dostupne sluznice područja glave i vrata, procjene lokalne proširenosti, veličine tumora i zahvaćenosti okolnih struktura, kao i procjene pokretljivosti glasnica i grkljana. Zbog mogućnosti pojave sinkronih tumora pregledava se dostupna sluznica svih anatomskih regija područja glave i vrata, najčešće panendoskopski u općoj endotrahealnoj anesteziji s ciljem uzimanja uzorka tkiva za patohistološku analizu. Kod sumnje na metastaze u limfne čvorove vrata savjetuje se potvrda ultrazvučnim pregledom (UZV) uz citološku punkciju suspektnih čvorova (engl. *fine needle aspiration*, FNA). Za utvrđivanje što preciznijeg stadija bolesti, posebno odnosa prema vaskularnim i mišićnim strukturama, kao i hrskavicama, kod svih karcinoma grkljana, i početnih i uznapredovalih, savjetuje se učiniti višeslojnu kompjuteriziranu tomografiju vrata s

kontrastom (engl. *multislice computed tomography*, MSCT). U nekim slučajevima, kada je potrebno definirati invaziju hrskavice ili mekih tkiva (retrofaringealni, paravertebralni prostor) može se učiniti i magnetska rezonancija (MR) područja glave i vrata. Kod uznapredovalih stadija bolesti savjetuje se i MSCT torakalnih organa zbog isključenja udaljene diseminacije bolesti, a i drugih primarnih tumora (najčešće raka pluća). U obzir dolazi i primjena pozitronske emisijske tomografije s CT-om (PET/CT) u pacijenata sa sumnjom na udaljenu diseminaciju bolesti koja se ne može razjasniti MSCT-om [45,46]. Kod sumnje na širenje karcinoma grkljana u područje hipofarinksa ili dušnika potrebne su dodatne endoskopske pretrage, kao što su video-bronhoskopija odnosno ezofagogastroduodenoskopija [45]. Preporuka je u dijagnostičkom postupku malignih bolesti, pa tako i karcinoma grkljana, učiniti laboratorijske pretrage krvi i to kompletnu i diferencijalnu krvnu sliku te biokemijske analize, uključujući analizu funkcije jetre, bubrega i štitnjače. Zbog specifičnosti populacije koja obolijeva od karcinoma grkljana, potrebno je što ranije u tijeku dijagnostičke obrade uključiti tim stručnjaka, specijalista otorinolaringologije, tj. kirurga područja glave i vrata, patologa, radiologa, kliničkog onkologa, logopeda, nutricionista, fizijatra, psihologa i psihijatra, a prema potrebi i socijalnog radnika. Svakako se savjetuje sanacija zubala, posebno prije početka radioterapije. Prije početka liječenja, a nakon potvrde zloćudnosti, svakog je pacijenta potrebno prikazati na multidisciplinarnom timu.

## 1.5 Patologija karcinoma grkljana

Tumori glave i vrata, pa tako i područja grkljana najčešće nastaju iz pokrovnog, odnosno pločastog epitela. U ovom se području rijetko mogu pojaviti i drugi tumori, podrijetla žlijezda slinovnica, vezivnog tkiva, tj. mezenhimalnog podrijetla, melanomi, neuroendokrini i tumori hematopoetskog sustava. Najčešći dobroćudni tumori ovog područja su skvamozni papilomi. Displazije epitela tj. skvamozne intraepitelne lezije (engl. *squamous intraepithelial lesion*, (SIL)) obuhvaćaju spektar histomorfoloških promjena koje se smatraju prekursorskim lezijama, a imaju potencijal za razvoj u zloćudne promjene epitela. Među zloćudnim lezijama najčešći je klasični karcinom pločastih stanica (engl. *squamous cell carcinoma*, SCC). Osim klasičnog, postoji više podtipova karcinoma pločastih stanica. Važno je prepoznati ih u odnosu na klasični karcinom pločastih stanica jer se razlikuju po specifičnim morfološkim, genetskim i prognostičkim karakteristikama [48].

### 1.5.1 Prekursorske lezije

#### 1.5.1.1 Skvamozni papilomi i papilomatoza

Skvamozni papilomi su multiple egzofitične dobroćudne promjene pločastog epitela koje nastaju na spoju sluznice cilindričnog i pločastog epitela najčešće na glasnicama i ventrikulima, sa širenjem prema supraglotisu ili subglotisu [48]. U 90 % slučajeva nastaju kao posljedica infekcije HPV-om 6 ili 11. Potrebno je patohistološko praćenje ovih promjena zbog ranog otkrivanja potencijalno rizičnih promjena epitela. Klinički tijek bolesti je nepredvidljiv i varira od spontanog nestanka promjena, preko stabilne bolesti, do agresivnog tijeka koji zahtjeva kirurško liječenje [48]. U 1 do 4 % slučajeva dolazi do maligne transformacije, obično pod utjecajem drugih karcinogena, najčešće pušenja [49–51].

#### 1.5.1.2 Displazija epitela grkljana

Displazije su poremećaji u arhitekturi i citološkom izgledu stanica pločastog epitela grkljana. Posljedica su multiplih genetskih oštećenja, povezanih s povećanim rizikom od progresije do nastanka invazivnog karcinoma [48]. Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (engl. *World Health Organisation*, WHO) ove se lezije klasificiraju kao displazije niskog i visokog stupnja i karcinom *in situ* (CIS), ovisno o debljini zahvaćenog epitela [52,53]. Nemaju karakterističan makroskopski izgled, a mogu se prezentirati kao lokalizirana ili difuzna promjena po tipu leukoplakije, eritroplakije, njihove kombinacije ili kroničnog laringitisa [54]. Novije metode endoskopije mogu pomoći u diferencijalnoj dijagnostici premalignih i malignih lezija. Rizik zloćudne transformacije raste sa stupnjem displazije, od 1,6 % za niski do 12,5 % za visoki

stupanj displazije [55]. CIS je povezan s višim rizikom nastanka zloćudnih promjena epitela (40 %) te može zahtijevati opsežnije terapijske zahvate ovisno o mjestu promjene i izloženosti čimbenicima rizika [56].

## **1.5.2 Histološki tipovi karcinoma grkljana**

Karcinomi grkljana najčešće potječu od stanica pokrovnog epitela, pa tako karcinomi pločastih stanica čine više od 90 % ovih tumora [48,57]. Među njima je najčešći klasični karcinom pločastih stanica. Tumori hrskavice grkljana čine 0,2 - 0,5 % svih tumora grkljana, pri čemu su hondrosarkomi znatno češći od hondroma.

### **1.5.2.1 Karcinom pločastih stanica grkljana**

Među karcinomima pločastih stanica grkljana najčešći je klasični karcinom, ostale, rjeđe podtipove čine verukozni, adenoskvamozni, limfoepitelijalni karcinom te bazaloidni, papilarni i pločasti karcinom vretenastih stanica.

#### **1.5.2.1.1 Klasični karcinom pločastih stanica**

Klasični karcinom pločastih stanica najčešća je zloćudna promjena koja nastaje iz površinskog epitela sluznice grkljana [48]. Gradus tumora određuje se na temelju značajki kao što su omjer jezgre i citoplazme, morfologija jezgre, broj mitoza, stupanj atipije, stromalna reakcija i keratinizacija [58]. Gradus tumora značajan je prognostički čimbenik unatoč razlikama u sustavima klasifikacije i subjektivnosti u očitavanju istog [48,59,60]. Perineuralna invazija je negativan prognostički čimbenik, tj. utječe na preživljavanje nakon operacije [61]. Limfovaskularna invazija, kao i zahvaćen resekcijski rub nakon kirurškog zahvata, povezani su s lošijim ishodima liječenja u pacijenata koji su podvrgnuti totalnoj laringektomiji, a nakon provedenog primarnog onkološkog liječenja [62]. Prisutnost tumor-infiltrirajućih limfocita je pozitivan prognostički čimbenik [63]. U 20 % pacijenata s klinički negativnim limfnim čvorovima, nakon disekcije vrata pronađu se okultne metastaze. One su češće kod supraglotičnih nego tumora glotisa te u uznapredovalim T (T3 - T4) stadijima [64]. Dobro diferencirani keratinizirajući i ne-keratinizirajući karcinomi pločastih stanica moraju se razlikovati od verukoznog i papilarnog karcinoma. Slabo diferencirani karcinom pločastih stanica ima širok spektar diferencijalno dijagnostičkih mogućnosti. Prekomjerna ekspresija p16 ne bi se trebala smatrati surogatom HPV infekcije kao kod orofaringealnog karcinoma [65,66]. Različiti čimbenici utječu na prognozu karcinoma pločastih stanica grkljana, a obuhvaćaju one povezane s karakteristikama pacijenta i tumora, ali i liječenjem, a detaljnije je opisano u poglavlju Prognostički čimbenici karcinoma grkljana pločastih stanica [67]. Dulje ukupno

preživljenje (OS), kao i bolji odgovor na terapiju inhibitorima kontrolnih točaka kod povrata ili metastatske bolesti, imaju tumori s PD-L1 ekspresijom (engl. *Programmed Death-Ligand 1*) tj. oni koji imaju CPS (engl. *Combined Positive Score*)  $\geq 1$  i CPS  $\geq 20$ . Biopički uzorak nije pogodan za definiciju PD-L1 ekspresije zbog heterogenosti unutar tumora. Primjerenim kirurškim rubom za rane stadije karcinoma grkljana smatra se udaljenost tumora od 1 do 2 mm od ruba označenog bojom, s obzirom na to da u ovim stadijima bolesti neadekvatni kirurški rubovi ne utječu na lokalnu kontrolu ili ukupno preživljenje [48,68,69]. U uznapredovalim stadijima karcinoma grkljana postoje velike razlike u lokalnoj kontroli bolesti između pozitivnih i negativnih (bliskih – manje od 5 mm ili urednih – pet ili više mm) kirurških rubova [48,69]. Prema CAP (engl. *College of American Pathologists*) smjernicama patohistološki izvještaj za klasični karcinom pločastih stanica pacijenta liječenih radikalnim kirurškim zahvatom treba osim histološkog podtipa sadržavati: vrstu kirurškog zahvata, primarno sjelo tumora, prisutnost transglotičnog širenja, lateralnost i fokalnost tumora, veličinu tumora u 3 dimenzije, histološki gradus, širenje tumora prema drugim organima/prostorima, resekcijske rubove, uključujući najmanju udaljenost invazivne i neinvazivne komponentne od najbližeg ruba kao i lokaciju, tj. orijentaciju tog ruba, prisutnost vaskularne i perineuralne invazije, broj pregledanih i zahvaćenih limfnih čvorova, po regijama ukoliko je moguć te njihovu lateralnost, kao i veličinu najvećeg tumorskog depozita, prisutnost i veličinu ekstranodalne ekstenzije (ENE) te stadij bolesti prema TNM klasifikacijskom sustavu, uz naznake nekih specifičnosti za primarni tumor ukoliko one postoje (npr. m za multiple primarne tumore, r za recidiv, a y za opis primarnog tumora nakon provedenog liječenja) [70]. Upravo ovakvi standardiziran način patohistološkog izvješća, koje obuhvaća čimbenike rizika vezane uz tumor, doprinosi boljem multidisciplinarnom pristupu u liječenju pacijenata s karcinomima pločastih stanica.

#### **1.5.2.1.2 Verukozni karcinom**

Verukozni karcinom čini manje od 1 % svih zloćudnih tumora glave i vrata. Radi se o dobro diferenciranom karcinomu pločastih stanica koji je lokalno destruktivan, ali nema metastatski potencijal. U larinksu najčešće nastaje na glasnicama. Savjetuje se primarno, kirurško liječenje, iako i primarna radioterapija može biti učinkovita [71,72].

#### **1.5.2.1.3 Bazaloidni karcinom pločastih stanica**

Bazaloidni karcinom karakteriziran je bazaloidnom morfologijom, pločastom diferencijacijom i agresivnim ponašanjem. Najčešće se javlja u supraglotisu. Često se dijagnosticira u uznapredovalim stadijima bolesti. Etiologija je povezana s pušenjem i konzumacijom alkohola [48].



#### **1.5.2.1.4 Papilarni karcinom pločastih stanica**

Papilarni karcinom pločastih stanica raste egzofitično i javlja se najčešće u područjima glotisa, supraglotisa i transglotisa. Češći je kod muškaraca starije dobi [48]. Etiološki se povezuju s korištenjem duhana i konzumacijom alkohola te visokorizičnom HPV infekcijom, ovisno o primarnom sijelu [73,74]. Prognostički je sličan klasičnom karcinomu pločastih stanica, a zbog egzofitičnog rasta se dijagnosticira u ranijim stadijima bolesti [75].

#### **1.5.2.1.5 Pločasti karcinom vretenastih stanica**

Pločasti karcinom vretenastih stanica predstavlja vrlo rijedak zloćudni tumor područja glave i vrata, a najčešći je u području glotisa, gdje čini tek 1 % svih slučajeva. Etiološki je utvrđena povezanost s korištenjem duhana i alkohola, a u dijelu pacijenata potvrđena je izloženost zračenju. Diferencijalno dijagnostički važno ga je razlikovati od postiradijacijskih promjena i malignih mezenhimalnih tumora [48].

#### **1.5.2.1.6 Adenoskvamozni karcinom**

Ovi zloćudni tumori nastaju iz površinskog epitela, a pokazuje pločastu i žljezdanu diferencijaciju [48]. Adenoskvamozni karcinom je rijedak, najčešće se razvija u području grkljana i dva do četiri puta je češći u muškaraca, uz vrh incidencije u sedmom i osmom desetljeću života [76–79]. Pušenje cigareta i konzumacija alkohola mogući su predisponirajući čimbenici [48]. Biološko ponašanje adenoskvamoznog karcinoma agresivnije je od klasičnog karcinoma pločastih stanica te se češće dijagnosticira u uznapredovalim stadijima bolesti [79]. Unatoč multimodalnom adjuvantnom liječenju nakon kirurškog zahvata, česti su recidivi i pojava udaljene diseminacije bolesti [48].

#### **1.5.2.1.7 Limfoepitelijalni karcinom**

Limfoepitelijalni karcinom je slabo diferencirani pločasti karcinom morfološki sličan nekeratinizirajućim, nediferenciranim nazofaringealnom karcinomu. Izrazito je rijetki podtip karcinoma pločastih stanica grkljana, a uglavnom se javlja kod starijih muškaraca. Etiološki se razvoj limfoepitelijalnog karcinoma povezuje s pušenjem i konzumacijom alkohola, a u nekim je slučajevima prisutan HPV visokog rizika. Ovi tumori često sadrže p53 mutacije. Metastaze u regionalnim limfnim čvorovima javljaju se u 50 do 75 % pacijenata, a udaljena diseminacija bolesti u 20 do 25 % [48].

### **1.5.2.2 Mezenhimalni tumori grkljana**

Maligni mezenhimalni tumori grkljana su izuzetno rijetki i čine 0,2 - 0,5 % svih slučajeva. Među njima su najčešći hondrosarkomi niskog gradusa. Za dijagnozu je potrebna kliničko-patološka i radiološka korelacija, a primarni način liječenja je poštedni kirurški zahvat s ciljem očuvanja funkcije organa [48].

## **1.6 Određivanje stupnja diferencijacije za karcinom pločastih stanica grkljana**

Stupanj pločaste diferencijacije temelji se na stupnju keratinizacije s prisustvom keratinskih perli i/ili međustaničnih mostova. Kategorizira se u tri podskupine, kao dobro, umjereno i slabo diferencirani karcinom pločastih stanica [48]. Gradus pločastih karcinoma određuje se temeljem šire primijenjenih Broderovih kriterija prema sličnosti s normalnim pločastim epitelom u tri (dobro, umjereno i slabo) ili rjeđe četiri (dobro, umjereno, slabo i nediferencirani) kategorije [4,48]. Temelj ovog sustava jesu morfološke značajke stanica kao što su omjer jezgre i citoplazme, morfologija jezgre, broj mitozna, stupanj atipije, stromalna reakcija i keratinizacija [58]. U novijim sustavima gradiranja su uključeni i način rasta tumora (ekspanzivni, infiltrativni), upalni odgovor, nekroza i limfovaskularna invazija [67]. Zbog razlike u sustavima klasifikacije i subjektivnosti u očitavanju, kod klasičnih karcinoma pločastih stanica, histološki gradus nije idealan prognostički faktor [59,60]. Ipak, standard je kao stupanj zloćudnosti navesti gradus koji je ili najzastupljeniji ili najvišeg stupnja. Neki podtipovi karcinoma pločastih stanica kao što su npr. verukozni ili bazaloidni, ne zahtijevaju navođenje gradusa, a zbog njihovog biološkog ponašanja [70].

## 1.7 Određivanje stadija bolesti za karcinom pločastih stanica grkljana

Svim pacijentima s histološki dokazanim karcinomom grkljana potrebno je odrediti stadij bolesti prije početka planiranja liječenja. U određivanju stadija malignih bolesti, tako i karcinoma grkljana, AJCC (engl. *The American Joint Committee on Cancer*) i UICC (engl. *Union for International Cancer Control*) savjetuju upotrebu TNM (engl. *Tumor - Node - Metastasis*) klasifikacijskog sustava [46,80]. Trenutno je u upotrebi posljednje osmo AJCC izdanje priručnika za određivanje stadija bolesti karcinoma grkljana iz 2017. godine kao što je prikazano u tablici 1 i 2. U rane stadije karcinoma grkljana spadaju stadij I i II, a u uznapredovale stadij III i IV, nemetastatske bolesti.

**Tablica 1.** TNM klasifikacija karcinoma grkljana.

<b>Primarni tumor (T)</b>	
<b>TX</b>	Primarni tumor se ne može procijeniti
<b>T0</b>	Nema dokaza za postojanje primarnog tumora
<b>Tis</b>	Karcinom <i>in situ</i>
<b>Supraglotis</b>	
<b>T1</b>	Tumor ograničen na jednu regiju supraglotisa s uredno pokretnim glasnicama
<b>T2</b>	Tumor zahvaća sluznicu više od jedne susjedne regije supraglotisa ili glotisa ili regiju van supraglotisa (npr. sluznice baze jezika, valeukule, medijalnog zida piriformnog sinusa) bez fiksacija grkljana
<b>T3</b>	Tumor ograničen na grkljan s fiksacijom glasnica i/ili invazijom bilo čega od sljedećeg: postkrikoidnog područja, preepiglotskog prostora, paraglotičnog prostora i/ili unutarnjeg korteksa tireoidne hrskavice
<b>T4</b>	Umjereno ili vrlo uznapredovali tumor
<b>T4a</b>	Umjereno uznapredovala lokalna bolest Tumor prodire kroz vanjski korteks tireoidne hrskavice i/ili zahvaća tkiva izvan grkljana (npr. dušnik, meka tkiva vrata uključujući duboke vanjske mišiće jezika, infrahioidine mišiće, štitnjaču ili jednjak)
<b>T4b</b>	Vrlo uznapredovala lokalna bolest Tumor zahvaća prevertebralni prostor, obuhvaća karotidnu arteriju, ili zahvaća medijastinalne strukture

## Glottis

---

- T1** Tumor ograničen na glasnicu ili glasnice (može zahvatiti prednju ili stražnju komisuru) s normalnom pokretljivošću glasnica
- T1a** Tumor ograničen na jednu glasnicu
- T1b** Tumor zahvaća obje glasnice
- T2** Tumor se proteže do supraglotisa i/ili subglotisa i/ili je oštećena pokretljivost glasnica
- T3** Tumor ograničen na grkljan s fiksacijom glasnica i/ili invazijom paraglotičnog prostora i/ili unutarnjeg korteksa tireoidne hrskavice
- T4** Umjereno ili vrlo uznapredovali tumor
- T4a** Umjereno uznapredovala lokalna bolest  
Tumor prodire kroz vanjski korteks tireoidne hrskavice i/ili zahvaća tkiva izvan grkljana (npr. dušnik, krikoidnu hrskavicu, meka tkiva vrata uključujući duboke vanjske mišiće jezika, infrahioidine mišiće, štitnjaču ili jednjak)
- T4b** Vrlo uznapredovala lokalna bolest  
Tumor zahvaća prevertebralni prostor, obuhvaća karotidnu arteriju ili zahvaća medijastinalne strukture
- 

## Subglottis

---

- T1** Tumor ograničen na područje subglotisa
- T2** Tumor se širi na glasnicu ili glasnice koje su uredno ili smanjeno pokretne
- T3** Tumor ograničen na grkljan s fiksacijom glasnica i/ili invazijom paraglotičnog prostora i/ili unutarnjeg korteksa tireoidne hrskavice
- T4** Umjereno ili vrlo uznapredovali tumor
- T4a** Umjereno uznapredovala lokalna bolest  
Tumor zahvaća krikoidnu ili tireoidnu hrskavicu i/ili zahvaća tkiva izvan grkljana (npr. dušnik, meka tkiva vrata uključujući duboke vanjske mišiće jezika, infrahioidne mišiće, štitnjaču ili jednjak)
- T4b** Vrlo uznapredovala lokalna bolest  
Tumor zahvaća prevertebralni prostor, obuhvaća karotidnu arteriju ili zahvaća medijastinalne strukture
-

## **Regionalni limfni čvorovi (N)**

---

### **Klinički limfni čvorovi (cN)**

---

- NX** Regionalni limfni čvorovi se ne mogu procijeniti
- N0** Nema metastaza u regionalnim limfnim čvorovima
- N1** Metastaza u jednom istostranom limfnom čvoru, 3 cm ili manja u najvećoj dimenziji, bez ektranodalne ekstenzije (ENE(-))
- N2** Metastaza u jednom istostranom limfnom čvoru, veća od 3 cm, ali ne veća od 6 cm u najvećoj dimenziji i ENE(-); ili metastaze u više istostranih limfnih čvorova, nijedna veća od 6 cm u najvećoj dimenziji i ENE(-); ili metastaze u bilateralnim ili kontralateralnim limfnim čvorovima, ne veće od 6 cm u najvećoj dimenziji i ENE(-)
- N2a** Metastaza u jednom istostranom limfnom čvoru, veća od 3 cm, ali ne veća od 6 cm u najvećoj dimenziji i ENE(-)
- N2b** Metastaze u više istostranih limfnih čvorova, ni jedna veća od 6 cm u najvećoj dimenziji i ENE(-)
- N2c** Metastaze u obostranim ili kontralateralnim limfnim čvorovima, ni jedna veća od 6 cm u najvećoj dimenziji i ENE(-)
- N3** Metastaza u limfnom čvoru, veća od 6 cm u najvećoj dimenziji i ENE(-); ili metastaze u bilo kojem limfnom čvoru (čvorovima) s klinički izraženom ENE(+)
- N3a** Metastaza u limfnom čvoru, veća od 6 cm u najvećoj dimenziji i ENE(-)
- N3b** Metastaze u bilo kojem limfnom čvoru (čvorovima) s klinički izraženim ENE(+)
- 

### **Patološki limfni čvorovi (pN)**

---

- NX** Regionalni limfni čvorovi se ne mogu procijeniti
- N0** Nema metastaza u regionalnim limfnim čvorovima
- N1** Metastaza u jednom istostranom limfnom čvoru, 3 cm ili manja u najvećoj dimenziji i ENE(-)
- N2** Metastaza u jednom istostranom limfnom čvoru, 3 cm ili manja u najvećoj dimenziji i ENE(+); ili veća od 3 cm, ali ne veća od 6 cm u najvećoj dimenziji i ENE(-); ili metastaze u više istostranih limfnih čvorova, ni jedna veća od 6 cm u najvećoj dimenziji i ENE(-); ili u bilateralnim ili kontralateralnim limfnim čvorovima, ni jedna veća od 6 cm u najvećoj dimenziji i ENE(-)

- N2a** Metastaza u jednom istostranom čvoru, 3 cm ili manja u najvećoj dimenziji i ENE(+); ili metastaza u jednom istostranom čvoru, veća od 3 cm, ali ne veća od 6 cm u najvećoj dimenziji i ENE(-)
- N2b** Metastaze u više istostranih čvorova, nijedna veća od 6 cm u najvećoj dimenziji i ENE(-)
- N2c** Metastaze u bilateralnim ili kontralateralnim limfnim čvorovima, nijedna veća od 6 cm u najvećoj dimenziji i ENE(-)
- N3** Metastaza u limfnom čvoru, veća od 6 cm u najvećoj dimenziji i ENE(-); ili metastaza u jednom istostranom čvoru, većem od 3 cm u najvećoj dimenziji i ENE(+); ili više istostranih, kontralateralnih ili bilateralnih limfnih čvorova i bilo kojih s ENE(+); ili jedan kontralateralni čvor bilo koje veličine i ENE(+)
- N3a** Metastaza u limfnom čvoru, veća od 6 cm u najvećoj dimenziji i ENE(-)
- N3b** Metastaza u jednom istostranom čvoru, većem od 3 cm u najvećoj dimenziji i ENE(+); ili više istostranih, kontralateralnih ili bilateralnih limfnih čvorova s ENE(+); ili jedan kontralateralni čvor bilo koje veličine i ENE(+)

---

#### **Udaljene metastaze (M)**

---

- M0** Nema udaljenih metastaza
- M1** Postoje udaljene metastaza

**Tablica 2.** Sustav određivanja stadija karcinoma grkljana prema AJCC-u (prognostičke skupine po stadiju bolesti).

<b>Stadij</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
<b>0</b>	Tis	N0	M0
<b>I</b>	T1	N0	M0
<b>II</b>	T2	N0	M0
<b>III</b>	T3	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
<b>IVA</b>	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N2	M0
	T4a	N0, N1, N2	M0
<b>IVB</b>	Bilo koji T	N3	M0
	T4b	Bilo koji N	M0
<b>IVC</b>	Bilo koji T	Bilo koji N	M1

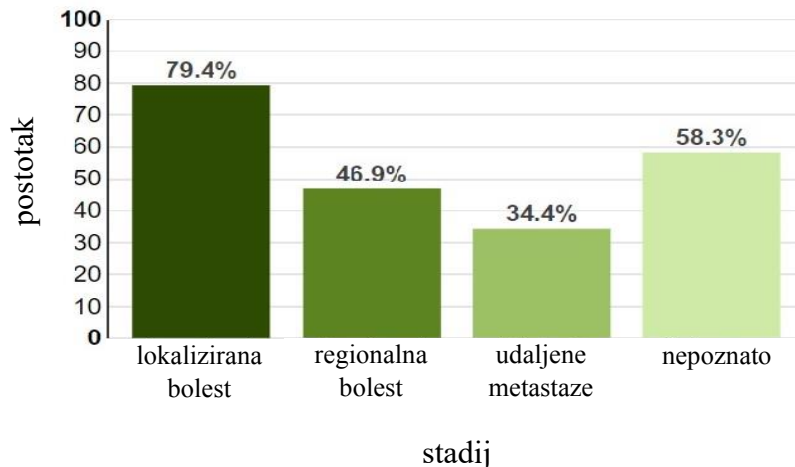
## 1.8 Prognostički čimbenici karcinoma grkljana pločastih stanica

Različiti čimbenici utječu na prognozu karcinoma pločastih stanica grkljana, a obuhvaćaju one povezane s karakteristikama pacijenta i tumora, ali i liječenjem.

Prognostički čimbenici vezani uz pacijenta uključuju dob, spol, nutritivni status, opće stanje i komorbiditete, kao i imunološki odgovor pacijenta [48,67]. Prevalencija karcinoma grkljana iznosi 25 % svih karcinoma glave i vrata, i u muškaraca i u žena, dok je smrtnost 28 % u muškaraca i 12 % u žena [81]. Muški spol prediktor je lokoregionalnog povrata bolesti i smrti od raka kao i smrti od bilo kojeg drugog uzroka [67]. Što se tiče utjecaja dobi na smrtnost, rezultati su kontradiktorni. Prema nekim istraživanjima smrtnost je niža za mlađe pacijente, a oni imaju i nižu stopu povrata bolesti, kao i razvoja novih primarnih tumora [67]. Loše opće stanje pacijenta povezano je s višim rizikom recidiva. Osim pušenja cigareta i uzimanja alkohola koji negativno utječu na opći tjelesni status pacijenta i prognozu, i komorbiditeti imaju negativan prognostički utjecaj [82–84]. Komorbiditeti, kao i opće stanje, utječu na odluku o načinu i ciljevima liječenja, pa tako i na ishode liječenja, a njihova prisutnost povezana je s višim stopama komplikacija nakon kirurškog liječenja. Anemija, kao i snižene vrijednosti hemoglobina, negativni su prognostički čimbenici za lokoregionalnu kontrolu bolesti nakon primarne radioterapije za početne stadije karcinoma grkljana [67]. Malnutricija je prisutna kod značajnog broja pacijenata s tumorima glave i vrata, pa tako i karcinomima grkljana, a poznato je da negativno utječe i na imunološki sustav, tj. odgovor. Gubitak tjelesne mase utječe negativno na razvoj komplikacija nakon kirurškog zahvata, a snižen indeks tjelesne mase neovisni je negativni prognostički faktor lošijeg preživljenja pacijenata s karcinomima grkljana [67].

Prognostički čimbenici vezani uz tumor trebaju biti detaljno obuhvaćeni patohistološkim izvještajem nakon kirurškog liječenja, prema CAP smjernicama. Petogodišnje preživljenje raka grkljana u SAD-u iznosi 61,6 % [16]. Mjesto primarnog sijela prognostički je čimbenik, pa tako petogodišnje preživljenje za karcinome glotisa iznosi iznad 77 %, supraglotisa 46 %, a subglotisa 53 %, a vezano je uz stadij bolesti. Petogodišnje preživljenje karcinom grkljana za rani stadij bolesti (I i II) iznosi 79,4 %, dok kod prisutnosti metastaza u limfne čvorove pada na 46,9 %, a u metastaskoj bolesti na 34,4 % (slika 6).





**Slika 6.** Karcinom grkljana - petogodišnje preživljenje po stadijima (preuzeto i prilagođeno prema [www.seer.cancer.gov](http://www.seer.cancer.gov)).

Primarno sijelo pločastog karcinoma grkljana varira ovisno o spolu, pa su kod žena značajno češći karcinomi supraglotisa. Većina tumora glotisa u trenutku dijagnoze ima lokalizirani stadij bolesti (83 %), dok supraglotični tumori pokazuju češću regionalnu diseminaciju i pojavu lokalnog recidiva. Kako bi se postigla uniformnost u opisu tumora grkljana, predložen je TNM klasifikacijski sustav kao standardizirani način opisa mjesta, veličine i širenja primarnog tumora te prisutnosti regionalnih i udaljenih metastaza. TNM klasifikacijski sustav je osnova za utvrđivanje prognostičkih skupina, po stadiju bolesti. Unatoč dostignućima u radiološkim tehnikama prikaza tumora, postoji i dalje značajan nesrazmjer u kliničkoj i patološkoj procjeni stadija bolesti. Više studija pokazalo je da s porastom T razreda, kao i stadija bolesti, raste rizik povrata bolesti za karcinome grkljana [67]. Zahvaćenost prednje komisure kod početnih tumora glotisa (T1) negativni je prognostički čimbenik za rizik lokalnog povrata bolesti [85]. Status zahvaćenosti limfnih čvorova tumorom najvažniji je pojedinačni prognostički pokazatelj [67]. Iako su broj, veličina i regija zahvaćenih čvorova važni, oni su sekundarni u odnosu na prevladavajući prognostički značaj ektranodalnog (ENE) širenja. Metastaze u limfne čvorove s ektranodalnim širenjem povezane su s lošijim ishodima u usporedbi s negativnim ili pozitivnim limfnim čvorovima bez ektranodalnog širenja [86]. Meta analiza koja je obuhvatila podatke više od 4000 pacijenata pokazala je da se omjer broja pozitivnih limfnih čvorova naspram ukupnog broja disekcijom vrata odstranjenih limfnih čvorova može koristiti kao značajan prognostički čimbenik za karcinome larinksa, ali i hipofarinksa, uz potrebu potvrde ovih rezultata kvalitetnijim kliničkim istraživanjima [87]. Prisutnost udaljenih metastaza povezana je s lošijom prognozom [67]. Subjektivna komponentna, kao i nepostojanje standarda u određivanju gradusa tumora, glavni je čimbenik nesrazmjera u definiranju povezanosti s

prognozom bolesti. Prognoza bolesti u ranim stadijima karcinoma grkljana ovisi o neglotičnoj lokaciji i stadiju (T2 naspram T1), ali ne i histološkom gradusu [88]. Nekoliko studija je pokazalo da se pupanje tumora može povezati s lošijom prognozom [89,90]. Perineuralna invazija povezana je s višim rizikom lokalnog povrata bolesti i pojavom metastaza u regionalne limfne čvorove, što negativno utječe na prognozu bolesti [67]. Važan prognostički čimbenik koji direktno utječe na preživljenje pacijenata s karcinomima grkljana je i pojava drugih primarnih tumora, sinkrono ili metakrono. Poznato je da su pacijenti s tumorima glave i vrata zbog izloženosti čimbenicima rizika skloni pojavi drugih primarnih tumora, bilo gornjeg dišnog ili probavnog sustava. Za karcinome grkljana drugi primarni tumori najčešći su u plućima, a za karcinome usne šupljine karcinomi jednjaka [67].

Razvojem patologije i molekularne biologije, istražuje se i prognostička uloga različitih biomarkera. Za sada, u pacijenata s karcinomima glave i vrata, pa tako i grkljana, nije moguće definirati podskupine pacijenata različitog biološkog ponašanja bolesti. Molekularni markeri imaju važnu ulogu u otkrivanju okultnih zloćudnih stanica na resekcijskim rubovima nakon kirurških zahvata tumora područja glave i vrata [91]. Genomske, transkriptomске i proteinske promjene u progresiji karcinoma grkljana ključna su područja istraživanja mogućih meta koje će pomoći u molekularnoj klasifikaciji prognostičkih skupina ovih pacijenata [92]. Istražuje se prognostička vrijednosti prekomjerne ekspresije EGFR-a, prisutnost različitih hormonskih receptora, P53 gena i proteina, kao i BCL-2 gena [67]. Pregledom dosada dostupnih istraživanja biomarkera karcinoma grkljana, Grénman i suradnici su zaključili da je vjerojatnije da će primjenjivi prognostički alati proizaći iz analize više prognostičkih čimbenika nego jednog pojedinačnog, a zbog složenosti procesa nastanka karcinoma grkljana na molekularnoj razini [93].

## 1.9 Patogeneza i molekularni biljezi karcinoma grkljana

Karcinom pločastih stanica grkljana razvija se kao rezultat višestrukih genetskih promjena koje dovode do kromosomske nestabilnosti i aneuploidije [48]. Tranzicijske promjene epitela posljedica su progresije karcinogeneze u tijeku vremena, ali i u prostoru, što se veže i uz pojam kancerizacije polja [94,95]. Proces transformacije normalne sluznice u invazivni karcinom pločastih stanica zbog kronične izloženosti karcinogenima, u nekim slučajevima obuhvaća postupne fenotipske patohistološke promjene koje prate genetske alteracije tijekom progresije karcinogeneze, što je poznato i za druge solidne tumore [95]. Johnson i suradnici su pokazali da proces prijelaza iz hiperplazije epitelnih stanica preko displazije, do karcinoma *in situ*, dovodi u konačnici do nastanka invazivnog karcinoma, pod utjecajem različitih okolišnih i unutar tkivnih čimbenika rizika [94]. Više je takvih istraživanja utvrdilo stupnjeve patohistoloških promjena, dok su promjene na genetskoj, a posebno molekularnoj razini, a koje dovode do zloćudne transformacije pločastog epitela, kao i njihov slijed, još uvijek predmet ekstenzivnog istraživanja. Njihov je cilj utvrditi moguće dijagnostičke, prediktivne i prognostičke biomarkere premalignih epitelnih lezija grkljana, posebno u razlikovanju visoko i nisko rizičnih promjena, s ciljem ranije dijagnoze i bolje definicije terapijskih postupka kako bi se spriječila njihova progresija [96]. Razumijevanje molekularnih mehanizama, koji prethode genetskim alteracijama, može pomoći u razjašnjavanju mehanizama progresije dobroćudnih promjena do zloćudnih, kao i identifikaciji specifičnih bioloških meti u razvoju novih strategija liječenja ranih stadija raka, a sve s ciljem poboljšanja ishoda liječenja i kvalitete života ovih pacijenata u smislu očuvanja funkcije grkljana. S obzirom na to da gotovo 50 % pacijenata s karcinomom grkljana koji imaju uznapredovalu bolest pri dijagnozi (stadij III i IV) razvije povrat bolesti (bilo lokalno, bilo udaljene metastaze), potrebni su nam novi molekularni biomarkeri s ciljem ranijeg postavljanja dijagnoze, kao i pronalaženjem učinkovitijih terapijskih mogućnosti s ciljem poboljšanja ishoda liječenja [96]. Glavni patološki putevi uključeni u proces karcinogeneze povezuju se s disregulacijom nekih od ključnih staničnih procesa, kao što su preživljenje i proliferacija (TP53, BCL-2 i EGFR), kontrola staničnog ciklusa (CDKN2A, CDKN1A) i stanična diferencijacija (NOTCH1). U više od 50 % zloćudnih tumora grkljana potvrđena je mutacija p53, a često je inaktiviran i o ciklinu ovisni kinazni inhibitor 2A (CDKN2A). Iako je ekspresija receptora epidermalnog čimbenika rasta (EGFR) pravilo u pločastim karcinomima glave i vrata, rezultati nekih istraživanja pokazuju da u gotovo do 40 % slučajeva, postoji ekspresija varijante koja se ne može inhibirati dostupnim monoklonskim protutijelima [97]. Utvrđene su i druge genetske aberacije i proteinske alteracije

uključene u proces karcinogeneze ovih tumora, kao što su TP63, RB1, IGF1R, FGF3, CHD1, PIK3CA, NTRK2, PTEN i KRAS. Ispituju se njihov biomarkerski potencijal te posebno uloga promjena mikroskopske ribonukleinske kiseline (miRNA) i cirkulirajuće tumorske DNA (engl. *circulating tumor deoxyribonucleic acid*, ctDNA), kao i epigenetskih i mikrookolišnih čimbenika na procese karcinogeneze. Unatoč brojnim novim saznanjima, zbog složenosti tumačenja i količine informacija koje nam omogućuju brojne „*omic*“ baze podataka, postoje ograničenja u njihovoj evaluaciji naspram poznatih kliničkih i patoloških kriterija te je u njihovoj primjeni potreban multidisciplinarni i standardizirani pristup [96].

Unatoč napretku molekularne onkologije, dosadašnjim istraživanjima nisu detektirane mutacije u onkogenima koji su ključni za staničnu proliferaciju i preživljenje (engl. *driver mutation*), već mutacije u različitim tumor supresorskim genima uključujući TP53, CDKN2A i NOTCH, zbog čega je razvoj ciljane molekularne terapije u liječenju pacijenata s tumorima glave i vrata zahtjevan.

## 1.10 Liječenje karcinoma grkljana

Liječenje karcinoma grkljana uključuje lokalne i lokoregionalne (kirurški zahvat, radioterapija) te sustavne (kemoterapija, biološka terapija, imunoterapija) terapijske modalitete uz pravodobnu i intenzivnu simptomatsko-suportivnu, potpurnu i palijativnu terapiju. Poznato je da, ukoliko se ne liječe, 90 % pacijenata s invazivnim karcinomom pločastih stanica grkljana umre unutar tri godine od dijagnoze [98]. Terapijske mogućnosti uključuju primjenu jednog ili više modaliteta liječenja, vodeći računa o potrebi za očuvanjem cjelovitosti grkljana kao organa, uvijek kada je to moguće. Odabir modaliteta liječenja, slijedeći važeće smjernice, uz personalizirani i multidisciplinarni pristup, temelji se na obilježjima tumora i pacijenta te dostupnosti terapijskih opcija i njihovog opterećenja na zdravstveni sustav, a uvažavajući želje samog pacijenta. Ciljevi liječenja ovise o istim čimbenicima kao i odabir modaliteta liječenja te uključuju izlječenje, lokalnu, lokoregionalnu i udaljenu kontrolu bolesti, očuvanje funkcije larinksa, uz što manju toksičnost i morbiditete primijenjenih terapijskih mogućnosti, a u metastatskoj bolesti produljenje preživljenja, palijaciju simptoma uz očuvanje kvalitete života. Svakako se savjetuje uključivanje pacijenata u kliničke studije, ukoliko su iste dostupne, neovisno o stadiju bolesti. Strategija, ciljevi, modaliteti i plan liječenja se definiraju nakon potvrde dijagnoze na multidisciplinarnom timu. Opće stanje pacijenta jedan je od odlučujućih čimbenika prilikom donošenja odluke o liječenju, a opisuje se standardnom klasifikacijom po WHO, tj. ECOG statusom (engl. *Eastern Cooperative Oncology Group*) te je jedan od značajnijih prognostičkih čimbenika. Zbog specifičnosti funkcije grkljana i mutilirajućeg efekta terapijskih opcija, kao i znatnog tereta za zdravstveni sustav, cilj liječenja ove skupine pacijenata je i očuvanje cjelovitosti organa uz maksimalnu dobit u kliničkim ishodima, zbog čega se sve se više pribjegava lokalnim metodama liječenja (kirurgija, radioterapija). Ipak, nedavno su rezultati SEER registra, ali i drugih epidemioloških analiza, pokazali smanjenje petogodišnjeg preživljenja sa 66 % na 61 % u posljednjih 40 godina [99–101]. Ova apsolutna razlika u preživljenju od 5 % u literaturi se objašnjava upravo učestalijom primjenom za organ poštednih protokola liječenja, što je dokaz potrebe za boljim promišljanjem o selekciji pacijenata pri odluci o izboru terapije te definiranjem prognostičkih i prediktivnih biomarkera. Zbog specifičnosti populacije koja obolijeva od karcinoma grkljana kao i važnost organa samog po sebi, ovim pacijentima savjetuje se intenzivna suportivna terapija, posebno nutritivna, tijekom procesa dijagnostičke obrade, ali i u svim fazama u tijeku i nakon završetka aktivnog liječenja. Često pacijenti s karcinomom grkljana imaju imunološke deficite ili abnormalne imunološke reakcije, o čemu treba voditi računa prilikom izbora terapije, ali oni mogu biti posljedica, ne

samog tumora, već višestrukih mehanizmima kao što su utjecaj zlouporabe alkohola, pothranjenosti, starenja, itd. [67].

### **1.10.1 Liječenje karcinoma *in situ* (stadij 0) grkljana**

U liječenju karcinoma *in situ* savjetuje se primjena pošteđenih modaliteta liječenja te se preferira primjena endoskopske resekcije nad primarnom radioterapijom [4].

Zbog tendencije razvoja u invazivni karcinom savjetuje se aktivni pristup u liječenju ovih promjena, a zlatni standard uključuje mikrolaringoskopiju i mukoznu eksciziju, najčešće CO<sub>2</sub> laserom. Multifokalne i difuzne lezije imaju tendenciju recidiva i često su potrebne ponavljane ekscizije tijekom godina praćenja. Primjena radioterapije savjetuje se u slučaju čestih povrata bolesti koji se javljaju u kratkim vremenskim intervalima nakon ekscizije, ili u slučaju kada nije moguće redovito praćenje, ili promjena nije dostupna pošteđenim ekscizijskim metodama [102].

### **1.10.2 Liječenje karcinoma grkljana stadija I i II**

Rani stadiji karcinoma grkljana podrazumijevaju mali volumen primarnog tumora i vrlo nisku stopu metastaza u limfne čvorove vrata, kao i visoku stopu izlječenja, neovisno o primijenjenoj metodi liječenja. Uzimajući u obzir navedeno, a s ciljem poštede larinksa, kao dvije jednako učinkovite opcije liječenja, u obzir dolaze primarna radioterapija ili pošteđeni kirurški zahvat [4].

Ne postoje randomizirane kliničke studije koje su usporedile učinkovitost primarne radioterapije naspram pošteđenih kirurških zahvata u smislu lokalne kontrole bolesti i preživljenja. Slično je i s podacima o funkcionalnim ishodima liječenja, kao što su kvaliteta glasa i mogućnost gutanja nakon operacije ili radioterapije. Smjernice za liječenje pacijenata s ranim stadijima karcinoma grkljana temelje se na rezultatima prospektivnih ili retrospektivnih kohortnih studija, a za T2 bolest djelomično i na podacima randomiziranih kliničkih studija koje su ispitivale učinkovitost primjene kemoradioterapije (indukcijske ili konkomitantne kemoterapije naspram same radioterapije ili kirurškog liječenja praćenog adjuvantnom terapijom). Isto tako, i rezultati sustavnih pregleda literature nisu potvrdili značajnu razliku u ishodima liječenja ranih stadija karcinoma grkljana, bilo da se radi o primarnoj radioterapiji ili različitim vrstama kirurških zahvata [103,104]. Za jedinu randomiziranu studiju, iz 1990. godine, koja je uspoređivala rezultate kirurškog zahvata (otvoreni pristup) naspram radioterapije u pacijenata s ranim karcinomom glotisa, u literaturi se navodi da je analiza rezultata kompromitirana metodološkim i analitičkim nedostacima [104,105].

Što se tiče kirurškog pristupa ranim stadijima karcinoma larinksa, preferiraju se poštedne operacije, s ciljem postizanja negativnih resekcijskih rubova, bilo otvorenim ili endoskopskim pristupom, a uključuju kordektomiju, parcijalnu vertikalnu ili suprakrikoidnu laringektomiju, hemilaringektomiju, transoralnu robotsku i lasersku mikrokirurgiju (TLM) [4]. Najopsežnija meta analiza nije pokazala statistički značajnu razliku u rezultatima liječenja između radioterapije i transoralne laserske CO<sub>2</sub> ekscizije po pitanju lokalne kontrole, kao i poštede organa [106]. I druga meta analiza, kao i sustavni pregledni članak pokazao je slične rezultate, bez statistički značajne razlike između ovih metoda liječenja ranih stadija raka glotisa [107]. Kod ranih karcinoma glotisa petogodišnja stopa lokalne kontrole bolesti iznosi 90 % do 93 % za T1a te 85 % do 89 % za T1b tumore, za primarnu radioterapiju i TLM. Stope lokalne kontrole i ukupnog preživljenja za T2a karcinome glotisa slične su kod primjene TLM, parcijalne resekcije grkljana ili radioterapije [108]. Za T1 karcinome supraglotisa petogodišnje stope lokalne kontrole nakon liječenja zračenjem, TLM-om, transoralnom robotskom operacijom ili otvorenom supraglotičnom laringektomijom iznose od 77 % do 100 %, a za T2 tumore od 80 % do 97 % za TLM ili otvorenu supraglotičnu laringektomiju, a 62 % do 83 % za primarno zračenje [109].

Zračenje karcinoma grkljana, ranih i uznapredovalih stadija, podrazumijeva primjenu trodimenzionalne konformalne (3DCRT), intenzitetno modulirajuće (zračenje snopovima promjenjivog intenziteta) (engl. *intensity-modulated radiation therapy*, IMRT) ili volumetrijski modulirajuće lučne (engl. *volumetric arc therapy*, VMAT) radioterapije. Primjena radioterapije temelji se na poznavanju biologije bolesti, anatomije i slikovne dijagnostike, a uzimajući u obzir i kliničke okolnosti. Doza zračenja ovisi o indikaciji (primarno, adjuvantno, konkomitantno s kemoterapijom bilo adjuvantno bilo primarno), lokaciji tumora, načinu frakcioniranja i tehnici zračenja. Primjenom primarne radioterapije u ranim stadijima raka glotisa postižu se petogodišnje stope očuvanja larinksa od 85 % do 95 % za stadij I i 70 % do 80 % za stadij II bolesti. Petogodišnje preživljenje za ovu populaciju pacijenata liječenih primarnom radioterapijom iznosi 75 % do 90 %, a za bolest specifično preživljenje (DSS) 90 % do 100 %. Primjenom primarne radioterapije u ranim stadijima raka supraglotisa postižu se petogodišnje stope očuvanja larinksa od 100 % za stadij I i 85 % za stadij II bolesti. Petogodišnje preživljenje za ovu populaciju pacijenata liječenih primarnom radioterapijom iznosi 60 % do 65 %, a specifično preživljenje 90 % do 100 % [110–112]. U ranim stadijima raka glotisa, za razliku od supraglotisa, ne savjetuje se elektivno zračenje limfnih čvorova, ni elektivna disekcija vrata, a zbog male vjerojatnosti metastaza u limfne čvorove. Kod karcinoma supraglotisa ranog stadija

savjetuje se elektivno zračenje regija II do IV obostrano, a u slučaju kirurškog liječenja, selektivna disekcija vrata [108].

U slučaju provođenja primarne 3DCRT tumora grkljana primjenjuju se maksimalne doze od 66 do 70 Gy (konvencionalno frakcioniranje) na mjesto primarnog tumora te limfnih čvorova zauzetih tumorom (mjesto visokog rizika), tijekom 6 do 7 tjedana. Na mjesta niskog i srednjeg rizika primjenjuju se doze od 44 Gy do 50 Gy (2 Gy po frakciji dnevno) za elektivnu 3DCRT radioterapiju uz sekvencijski IMRT, tj. 50 do 54 Gy bez sekvencijskog IMRT. Kod primjene IMRT-a savjetuju se doze od 54 do 63 Gy (1,6 - 1,8 Gy po frakciji). U slučaju hiperfrakcioniranja na mjesto primarnog tumora i limfne čvorove zauzete tumorom primjenjuju se doze do 81,6 Gy (1,2 Gy po frakciji, dva puta dnevno). Dokazana je učinkovitost različitih shema frakcioniranja (hiperfrakcioniranje, akcelerirano frakcioniranje) u liječenju tumora grkljana u smislu lokalne kontrole te preživljenja bez znakova bolesti i ukupnog preživljenja. Ni jedna shema frakcioniranja nije dokazano učinkovitija od ostalih za sve lokalizacije područja glave i vrata, ali se savjetuje provođenje zračenja u dozi od barem 1000 cGy tjedno, posebno prilikom primjene zračenja kao jedinog modaliteta liječenja [4]. Analiza objavljenih rezultata kliničkih istraživanja primarnog zračenja karcinoma glave i vrata, pokazala je značajan gubitak lokalne i lokoregionalne kontrole bolesti odgodama i pauzama u tijeku zračenja iz bilo kojeg razloga. Tako se odgodom od tjedan dana smanjuje lokalna kontrola bolesti za 14 %, a odgodom od dva i tri tjedna za 26 % i 35 % [113]. Akcelerirana repopulacija tumorskih stanica tijekom radioterapije smatra se važnim uzrokom neuspjeha radioterapije u lokalnoj kontroli bolesti u pacijenata s pločastim karcinomima glave i vrata. Ipak, zbog heterogenosti ovih tumora, drugom analizom objavljenih rezultata kliničkih publikacija pokazano je da produljenje vremena, tj. odgode u liječenju, dovode do smanjene lokalne i lokoregionalne kontrole bolesti kod dobro i umjereno diferenciranih karcinoma pločastih stanica. Navedeno je moguće posljedica gubitka sposobnosti za akceleriranu repopulaciju dediferencijacijom tumorski stanica, zbog čega je važno poznavati stupanj diferencijacije tumora prilikom planiranja ukupne doze i vremena provođenja radioterapije [114]. Tijekom zračenja potrebno je pažljivo praćenje anatomskih promjena u području glave i vrata, koje nastaju najčešće kao posljedice gubitka na tjelesnoj masi ili smanjenju tumorske mase, što može zahtijevati ponovnu simulaciju i planiranje zračenja.

Za pacijente s ranim stadijem karcinoma glotisa (T1) preferira se akcelerirana shema frakcioniranja (totalna doza od 63 Gy, 2,25 Gy po frakciji) naspram konvencionalnog frakcioniranja (66 Gy, 2,0 Gy po frakciji). Ova se preporuka temelji na rezultatima prospektivne



randomizirane studije na 180 pacijenata sa stadijem I karcinoma glotisa, a koja je pokazala statistički značajno bolju petogodišnju lokalnu kontrolu (92 % naspram 77 %) u usporedbi s konvencionalnim frakcioniranjem, a bez razlike u ukupnom (OS) i za bolest specifičnom (DSS) preživljenju te akutnoj i kroničnoj toksičnosti [115]. Rezultati multicentrične, randomizirane, kontrolirane studije danskih autora, kojom je ispitivana učinkovitost primjene akceleriranog frakcioniranja (6 tjednih frakcija) naspram standardnog, za rane i uznapredovale stadije karcinoma glave i vrata (više od 60 % pacijenata s karcinomom larinksa, više od 50 % slučajeva stadija I i II), pokazali su statistički značajno bolju lokalnu kontrolu bolesti za rane stadije karcinoma glave i vrata (N0), bolje za bolest specifično preživljenje, ali ne i ukupno preživljenje. Uz radioterapiju primjenjivan je i radiosenzitizer nimorazol, za sve pacijente osim onih s T1 stadijem karcinoma glotisa. Temeljem ovih rezultata šestotjedno frakcioniranje je prihvaćeno kao standard u zračenju karcinoma glave i vrata u Danskoj, unatoč većoj, ali prolaznoj akutnoj toksičnosti [116]. Retrospektivna analiza pacijenata s ranim stadijem karcinoma larinksa pokazala je da ukupna doza, ukupno vrijeme isporuke kao i doza pojedine frakcije zračenja značajno utječe na lokalnu kontrolu bolesti za T2, ali ne i T1 tumore. Tako je za T2 tumore najbolja lokalna kontrola bolesti bila postignuta kod onih pacijenta koji su primali više dnevne doze po frakciji, kao i više ukupne doze zračenja [117]. Kod određene skupine pacijenata (npr. stariji pacijenti, s komorbiditetima, velika udaljenost od centra provođenja radioterapije, itd.) može se primijeniti hipofrakcionirana shema radioterapije (totalna doza od 50 do 52,5 Gy, 3,12 do 3,28 Gy po frakcija, 16 frakcija), na temelju rezultata retrospektivne analize dva centra koja je pokazala petogodišnju stopu lokalne kontrole bolesti od 93 %, petogodišnje ukupno i za bolest specifično preživljenje od 80 % i 97 % [118]. Randomizirana, prospektivna klinička studija koja je ispitivala primjenu standardnog frakcioniranja naspram hipofrakcioniranja (totalna doza od 63 Gy i 67,5 Gy za T1 i T2 tumore, 2,25 Gy po frakciji) u pacijenata s ranim stadijima karcinoma glotisa (T1 i T2) prekinuta je ranije zbog sporog uključivanja pacijenata. U studiji nije bila dokazana statistički značajna razlika po pitanju lokalne kontrole bolesti, uz napomenu nedovoljne statističke snage studije. Petogodišnje vrijeme bez lokalne progresije bolesti iznosilo je 77,8 % naspram 88,5 % između grana, u korist hipofrakcioniranja, a nije bilo ni statistički značajne razlike u toksičnom profilu [119]. Prospektivna, randomizirana studija u koju je uključeno 250 pacijenata s T2 karcinomima glotisa, ispitivala je učinkovitost hiperfrakcioniranog protokola zračenja naspram standardnog frakcioniranja. Lokoregionalna kontrola bolesti iznosila je 78 % naspram 70 % za hiperfrakcioniranu shemu radioterapije, ali razlika nije bila statistički značajna. Nije bilo značajne razlike u petogodišnjem preživljenju bez znakova bolesti, kao ni u ukupnom

preživljenju, ni kasnoj toksičnosti gradusa tri i četiri, dok je statistički značajno viša akutna toksičnost zabilježena kod hiperfrakcioniranja [120]. Retrospektivna analiza Gardena i suradnika pokazala je značajno bolju lokalnu kontrolu bolesti za pacijente s T2 tumorima grkljana kod hiperfrakcioniranog protokola radioterapije naspram standardnog frakcioniranja [117]. Dolazi u obzir primjena hiperfrakcioniranih protokola u liječenju ranih stadija karcinoma glotisa, uz problem izvedivosti isporuke više dnevnih frakcija radioterapije, a s obzirom na to, i suradljivosti i isplativosti provođenja iste.

Preporuka je svakako monomodalitetno liječenje ranih stadija karcinoma grkljana, bilo kirurški ili radioterapijom, s obzirom na to da su rezultati lokoregionalne kontrole bolesti i preživljenja slični. U slučaju neuspjeha radioterapije, preostaje opcija kirurškog zahvata s ciljem izlječenja, i obrnuto. Inače se ne savjetuje primjena kombiniranih modaliteta liječenja u ranim stadijima karcinoma larinksa, budući da se time ugrožava funkcija organa [108,121]. Rezultati nekih istraživanja pokazali su smanjeno ukupno preživljenje u dijela pacijenata s T2 tumorima glotisa kod kojih primarnom radioterapijom nije postignuta lokalna kontrola bolesti. Tako u pacijenata koji su spremni žrtvovati kvalitetu glasa s ciljem postizanja što bolje lokalne kontrole bolesti kao alternativa primarnoj radioterapiji dolazi u obzir parcijalna suprakrikoidna laringektomija [122]. Za sada nema dokaza učinkovitosti, temeljem kliničkih studija, za primjenu indukcijske kemoterapije u pacijenata s ranim stadijima karcinoma larinksa, tj. glotisa [121].

### **1.10.3 Liječenje karcinoma grkljana stadija III i IV**

Liječenje uznapredovalih stadija, nemetastatskog karcinoma grkljana koji bi zahtijevali totalnu laringektomiju, temelji se na principima pokušaja očuvanja cjelovitost organa, bez utjecaja na kliničke ishode. Kod ovih stadija bolesti savjetuje se primjena kombinacijskih protokola liječenja. Tako se osim kirurškog liječenja (radikalno, rijetko pošteno), nakon kojeg može slijediti adjuvantno liječenje ovisno o patohistološkim karakteristikama tumora, primjenjuje primarna konkomitantna kemoradioterapija i indukcijska kemoterapija. Nakon indukcijske kemoterapije se planira u slučaju odgovora na terapiju radioterapija, uz eventualnu sustavnu terapiju. U slučaju nepostojanja odgovora na kemoterapiju planira se kirurški zahvat. Kirurški zahvat metoda je izbora i u pacijenata s ostatnom bolesti nakon provedene konkomitantne kemoradioterapije. U pacijenata koji nisu kandidati za konkomitantnu kemoradioterapiju, odnosno kirurški zahvat, ili iste odbijaju, može se primijeniti primarna radioterapija s modificiranim shemama frakcioniranja [4].

Potrebno je prije odluke o liječenju procijeniti prikladnosti primjene neke od metoda poštede organa te pacijenta informirati o dostupnim mogućnostima, rizicima i koristima istih. Konačna

funkcija ovisi o funkciji grkljana prije početka liječenja, pa je očekivano lošija u pacijenata s fiksacijom larinksa, iako nije kontraindikacija za primjenu protokola očuvanja organa, bilo onkoloških bilo kirurških.

Za lokalno uznapredovale karcinome supraglotisa primjenjuju se jednake metode poštete organa kao i za glotis, a klinička ispitivanja su pokazala manju stopu neuspjeha nego kod glotisa (manja je stopa kirurških radikalnih zahvata nakon poštenih metoda liječenja). Posebnu pažnju treba posvetiti rehabilitaciji gutanja i govora nakon poštenih zahvata supraglotičnih karcinoma, jer dio pacijenata zbog poteškoća s aspiracijom može zahtijevati mutilirajuće reoperacije u smislu totalne laringektomije [121]. Zbog uznapredovalosti bolesti, vrlo mali dio ovih pacijenata će biti prikladni kandidati za pošten kirurški zahvat, a primjena indukcijske kemoterapije prije ovakvih kirurških zahvata se ne savjetuje, osim u sklopu kliničkih studija.

Ni jedna od navedenih metoda poštete organa nema bolje ishode u odnosu na totalnu laringektomiju, s ili bez adjuvantnog liječenja. Konkomitantna kemoradioterapija, temeljena na visokodoznoj cisplatinu, ima značajno veće stope očuvanja grkljana, ali i akutne toksičnosti, naspram same radioterapije ili indukcijske kemoterapije, nakon koje je provedeno zračenje. Za sada ne postoji dovoljno dokaza koji bi ukazivali na poboljšanje ishoda u smislu duljeg preživljenja i više stope očuvanja grkljana, primjenom indukcijske kemoterapije prije konkomitantne kemoradioterapije, ili primjenom kemoterapije konkomitantno s modificiranim shemama radioterapije [4,108,121].

U samim počecima primjene zračenja u liječenju karcinoma grkljana, prve indikacije za radioterapiju, a prije kirurškog zahvata, obuhvaćale su fiksirane limfne čvorove i zahvaćanje kože vrata te postavljenu traheostomu kroz tumor. U određenog dijela pacijenata s umjereno uznapredovalim karcinomom grkljana (T3N0), primjenom pošten resekcije s ciljem očuvanja funkcije grkljana, ili primarne radioterapije, postignute su stope preživljenja usporedive s rezultatima totalne laringektomije. Ovaj pristup omogućava poštetu organa kod 40 % do 70 % pacijenata [123–128]. Međutim, za pacijente s uznapredovalijom bolesti, primjena primarne radioterapije, uz opciju kirurškog zahvata u slučaju neučinkovitosti iste, rezultira nižim stopama preživljavanja [123–125,127]. Ispitivana je primjena različitih shema frakcioniranja zračenja u primarnom liječenju. Randomizirana studija, faze III, pokazala je statistički značajno višu stopu lokoregionalne kontrole bolesti primjenom hiperfrakcioniranja ili akcelerirane sheme frakcioniranja naspram standardnog te trend u produljenju preživljenja bez znakova bolesti, a bez značajne razlike u ukupnom preživljenju [110]. Rezultati multicentrične, randomizirane, kontrolirane studije danskih autora, kojom je ispitivana učinkovitost primjene akceleriranog

frakcioniranja (6 tjednih frakcija) naspram standardnog u primarnom liječenju, za rane i uznapredovale stadije karcinoma glave i vrata (više od 60 % pacijenata s karcinomom larinksa, nešto manje od 50 % slučajeva stadija III i IV), pokazali su statistički značajno bolju lokalnu kontrolu bolesti za primarne tumore, ali ne kod velikog opterećenja bolesti u limfnim čvorovima (N0), bolje za bolest specifično, ali ne i ukupno preživljenje. Uz radioterapiju primjenjivan je i radiosenzitizer nimorazol. Temeljem ovih rezultata šestotjedno frakcioniranje je prihvaćeno kao standard u zračenju karcinoma glave i vrata u Danskoj, unatoč većoj, ali prolaznoj akutnoj toksičnosti [116]. Rezultati MARCH meta analize, na više od 6000 pacijenata iz randomiziranih kliničkih ispitivanja s uznapredovalim karcinomima larinksa i orofarinksa, pokazali su je da je primjena nestandardnih shema frakcioniranja povezana s produljenjem ukupnog preživljenja te preživljenja bez progresije bolesti (PFS), a najveća je dobit postignuta primjenom hiperfrakcioniranja. Tako je apsolutna dobit u petogodišnjem preživljenju za hiperfrakcioniranje iznosila 8 %, a za sve nestandardne sheme frakcioniranja ukupno 3,4 %. Apsolutna dobit u stopi petogodišnje lokoregionalne kontrole bolesti iznosila je 6,4 % primjenom ovih shema frakcioniranja naspram standardnog te je bila više izražena za lokalnu nego regionalnu kontrolu bolesti, kao i u pacijenata mlađih od 60 godina [129].

Rezultati randomizirane studije, faze III, koja je uključila pacijente s uznapredovalim karcinomima glave i vrata, pokazali su da se postoperativnom radioterapijom postiže statistički značajno bolja lokoregionalna kontrola bolesti od one prije operacije, uz tendenciju i boljeg ukupnog preživljenja [130]. Rezultati praćenja nakon medijana od deset godina potvrdili su statistički značajno bolju lokoregionalnu kontrolu bolesti primjenom adjuvantne radioterapije, posebno kod karcinoma supraglotisa, ali bez utjecaja na ukupno preživljenje. Gotovo 80 % lokoregionalnih povrata bolesti razvilo se unutar prve 2 godine praćenja, a nakon toga udaljene metastaze i drugi primarni tumor bili su najčešći načini gubitka kontrole bolesti, posebno u skupini koja je adjuvantno zračena [131]. Analiza obilježja pacijenata s uznapredovalim stadijem bolesti kod kojih je provedena radioterapija nakon kirurškog zahvata, pokazala je da su četiri faktora značajni prediktori lokoregionalnog povrata bolesti: pozitivan rub resekcije, primarno sijelo tumora (tumori usne šupljine), N stadij bolesti (N2 i N3) i broj indikacija za radioterapiju (četiri ili više) [132].

S obzirom na to da je unatoč adjuvantnom zračenju stopa petogodišnjeg preživljenja bez znakova bolesti uglavnom niža od 50 %, dvije velike randomizirane kliničke studije, faze III, ispitivale su učinkovitost adjuvantne kemoradioterapije u pacijenata s uznapredovalim stadijima karcinoma glave i vrata, naspram same radioterapije. Cooperova studija je pokazala

statistički značajno bolju lokoregionalnu kontrolu i preživljenje bez znakova bolesti, kao i veću akutnu toksičnost gradusa 3 i više, kod primjene adjuvantne kemoradioterapije u pacijenata s čimbenicima visokog rizika u patohistološkom nalazu (metastaze u 2 ili više regionalnih limfnih čvorova, pozitivna ektranodalna ekstenzija, pozitivan reseksijski rub) [133]. Druga studija, sličnog dizajna, pokazala je statistički značajno dulje vrijeme bez progresije bolesti i stopu lokoregionalne kontrole bolesti u skupini liječenoj adjuvantnom kemoradioterapijom, kao i ukupnom preživljenju sa smanjenjem rizika za smrt od 30 %. Nije bilo razlike u pojavnosti drugih primarnih tumora i udaljenih metastaza između skupina, a toksičnost gradus 3 i više bila je značajno učestalija u skupini liječenoj adjuvantom kombinacijskom terapijom. Ova je studija uključila pacijente s različitim čimbenicima rizika od ranije navedene (stadij III i IV, pozitivna ektranodalna ekstenzija, pozitivni reseksijski rubovi, perineuralna ili limfovaskularna invazija, karcinomi usne šupljine ili orofarinksa s metastazama u limfne čvorove regije IV ili V) [134]. Skupna analiza rezultata ovih studija pokazala je da su pozitivan reseksijski rub i ektranodalna ekstenzija najznačajniji negativni prognostički čimbenici te da je primjena adjuvantne kemoradioterapije u pacijenata koji imaju dva ili više ovih faktora rizika pokazala statistički značajno poboljšanje ishoda [135]. Temeljem ovih kliničkih ispitivanja i njihove skupne analize, definirane su apsolutne preporuke za provođenje adjuvantnog kombinacijskog liječenja u pacijenata s pozitivnim reseksijskim rubom i pozitivnom ektranodalnom ekstenzijom te relativne kod kojih u obzir dolazi primjena kemoradioterapije, a svakako se savjetuje adjuvantna radioterapija (bliski reseksijski rubovi, pT4, pN2 ili pN3, perineuralna invazija, limfovaskularna invazija i subglotična ekstenzija za karcinome grkljana) [4].

Više kliničkih, randomiziranih ispitivanja pokazalo je učinak primarne radioterapije u očuvanju funkcije grkljana, tj. poštedi organa. Dodatak kemoterapije prije operacije ili radioterapije u pacijenata s uznapredovalim stadijem karcinoma grkljana, rezultirao je visokim stopama potpune regresije tumora, a koje su povezane s produljenim preživljenjem i predviđaju povoljan odgovor na kasniju terapiju. Randomizirana ispitivanja, međutim, nisu uspjela pokazati značajno produljenje preživljenja primjenom indukcijske kemoterapije [136]. Tako je randomizirana studija, faze III, koja je uključila više od 300 pacijenata s uznapredovalim stadijima karcinoma grkljana pokazala da je primjena indukcijske kemoterapije cisplatinom i 5 fluorouracilom (5FU) i potom primarne radioterapije, učinkovita u smislu očuvanja larinksa, a bez pogoršanja ukupnog preživljenja i preživljenja bez znakova bolesti, naspram kirurškog liječenja i adjuvantne radioterapije. Stopa patološki kompletnih odgovora potvrđena biopsijom, nakon provedena dva ili tri ciklusa kemoterapije iznosila je 64 %. Parcijalni odgovor postignut

je u 54 % pacijenata nakon dva te 49 % nakon tri ciklusa kemoterapije. Kombinirane stope parcijalnog i kompletnog odgovora nakon dva ili tri ciklusa kemoterapije na mjestu primarnog tumora i u zahvaćenim limfnim čvorovima iznosile su 85 % i 98 %. Stopa očuvanja grkljana iznosila je 64 %. Ni mjesto primarnog tumora, ni T stadij, ni stadij bolesti nisu utjecali na odgovor na provedenu terapiju. Nije bilo razlike u stopi povrata bolesti među ispitivanim granama, ali je povrat bolesti na mjestu primarnog tumora bio statistički značajno češći u pacijenata liječenih indukcijskom kemoterapijom, dok je udaljena diseminacija kao i pojava drugog primarnog tumora bila češća u pacijenata liječenih operacijom i adjuvantnom radioterapijom [136].

I randomizirano kliničko ispitivanje provedeno na gotovo 550 pacijenata s uznapredovalim karcinomom grkljana pokazalo je statistički značajno bolju stopu očuvanja organa (vrijeme bez laringektomije, LFS), kao i stopu lokoregionalne kontrole u pacijenata koji su liječeni primarnom konkomitantnom kemoradioterapijom naspram onih liječenih indukcijskom kemoterapijom (nakon čega je slijedila radioterapija ili kirurški zahvat) ili primarnom radioterapijom. Toksičnost je očekivano bila viša u pacijenata liječenih kemoterapijom. Postignuto je i statistički značajno dulje preživljenje bez znakova bolesti te je manji broj pacijenata razvio udaljenu diseminaciju u granama koje su uključivale kemoterapiju. Nije bilo razlike u ukupnom preživljenju između tri ispitivane skupine [137]. Nakon medijana praćenja od deset godina rezultati pacijenata liječenih u granama s kemoterapijom (primarna konkomitantna kemoradioterapija ili indukcijska kemoterapija) pokazuju sličnu stopu vremena bez laringektomije. Lokoregionalna kontrola i stope očuvanja grkljana bili su značajno viši kod primjene konkomitantne kemoradioterapije u usporedbi s indukcijskom skupinom ili samom radioterapijom. Zabilježen je i značajno veći broj smrti koje nisu bile povezane s karcinomom grkljana u skupini na konkomitantnoj kemoradioterapiji, a koje su moguće i uzrok nepostojanja razlike u ukupnom preživljenju između ispitivanih grana [138].

Ispitivana je učinkovitost različitih terapijskih protokola naspram standardne cisplatine i 5FU-a pri korištenju indukcijske kemoterapije. Randomizirano kliničko ispitivanje, faze III, pokazalo je statistički značajno višu stopu očuvanja larinksa i ukupnog odgovora na terapiju dodatkom docetaksela standardnom protokolu (docetaxel, cisplatina, 5FU - TPF protokol), uz veću toksičnost [139]. I rezultati praćenja nakon deset godina potvrdili su značajno višu stopu očuvanja i funkcije larinksa, ali nije bilo značajnih razlika u ukupnom preživljenju i preživljenju bez znakova bolesti, kao ni lokoregionalnoj kontroli bolesti [140]. Retrospektivna analiza dijela pacijenata iz randomizirane kliničke studije faze III, s uznapredovalim karcinomima larinksa i

hipofarinksa, liječenih TPF indukcijskom kemoterapijom, pokazala je statistički značajno dulji medijan ukupnog preživljenja, preživljenja bez progresije bolesti kao i vremena bez laringektomije. U toj studiji ispitivana je primjena indukcijskog TPF protokola naspram cisplatine i 5FU, a prije konkomitantne kemoradioterapije temeljene na tjednoj karboplatini [141,142]. Primjena biološke terapije cetuksimabom, naspram kemoterapije visokodoznom cisplatinom, konkomitantno uz radioterapiju, a nakon indukcijske kemoterapije, nije pokazala razliku u rezultatima. Primjena konkomitantne kemoradioterapije ili biološke terapije uz zračenje nije bila učinkovitija od same primjene indukcijske kemoterapije i radioterapije nakon nje [143]. Ukoliko se primjenjuje indukcijska kemoterapija prema smjernicama se savjetuje primjena TPF protokola, a nakon postignutog odgovora primjena radioterapije, same ili u kombinaciji s tjednom karboplatinom, dolazi u obzir i tjedna cisplatina, ili biološka terapija cetuksimabom u pacijenata koji nisu kandidati za platinu [4,144–146].

Zadnji rezultati meta analize koja je obuhvatila više od sto randomiziranih kliničkih ispitivanja, i gotovo 19.000 pacijenata, pokazali su da je primjena primarne konkomitantne kemoterapije uz radioterapiju statistički značajno produljila ukupno preživljenje pacijenata s uznapredovalim stadijima karcinoma glave i vrata, i da je važno vrijeme korištenja kemoterapije (konkomitantno), s apsolutnom dobiti u petogodišnjem i desetogodišnjem preživljenju od 6,5 % i 3,6 %. Nije bilo učinka na produljenje ukupnog preživljenja dodatkom indukcijske kemoterapije [147]. Poznati su i podaci analiza kasne toksičnosti primjene konkomitantne kemoradioterapije koji imaju ozbiljan utjecaj na kvalitetu života, a uključuju pojavu poremećaja funkcije gutanja i govora u oko 40 % pacijenata [148]. Utjecaj na razvoj toksičnosti osim čimbenika vezanih uz tumor, pacijenta i shemu frakcioniranja, ima i primijenjena tehnika zračenja. Danas se primjenjuju novije tehnike kao što su IMRT i VMAT, s ciljem boljeg očuvanja organa od rizika kao i funkcije samog grkljana. Konkomitantno sa zračenjem ispitivane su i različite doze cisplatine te karboplatine i 5FU-a, kao i primjena biološke terapije. Ipak, konkomitantna kemoradioterapija s visokodoznom cisplatinom i uobičajenim frakcioniranjem zračenja smatra se standardom u liječenju uznapredovalih karcinoma glave i vrata, bilo primarno ili adjuvantno [147,149,150]. Na temelju nekoliko kliničkih ispitivanja faze II, podataka iz meta analize te randomizirane studije faze III, pokazano je da primjena tjedne cisplatine (u dozi od 40mg/m<sup>2</sup>) konkomitantno s radioterapijom nije inferiorna naspram visokodozne cisplatine, u primarnom liječenju, uz manje izraženu toksičnost [147,151]. U obzir dolazi primjena karboplatine ili biološke terapije cetuksimabom konkomitantno s radioterapijom, u pacijenata koji nisu kandidati za cisplatinu [146,152]. Cetuksimab,

monoklonsko protutijelo koje inhibira EGF receptor, pokazao je statistički značajno bolju lokalnu kontrolu i dulje ukupno preživljenje u kombinaciji s radioterapijom, naspram same radioterapije [152].

Ne postoje smjernice za elektivno liječenje limfnih čvorova vrata temeljene na rezultatima randomiziranih kliničkih ispitivanja u ranim stadijima raka grkljana, a ono nije primarni cilj istraživanja ni kod lokalno uznapredovalih tumora. Od kirurških zahvata primjenjuju se sveobuhvatna radikalna ili modificirana radikalna te selektivna, a povremeno i proširena disekcija vrata [42]. Pri odlukama o elektivnom liječenju limfnih čvorova vrata služimo se podacima podanaliza randomiziranih studija koje su ispitivale učinkovitost primjene kemoradioterapije, bilo indukcijske bilo konkomitantne, naspram same radioterapije ili kirurškog zahvata uz adjuvantno liječenje, kao i onih s različitim vrstama disekcija vrata te retrospektivnih i prospektivnih ispitivanja. Elektivno liječenje limfnih čvorova vrata se savjetuje kada je rizik okultnih metastaza viši od 20 % [42]. Što se tiče adjuvantnog liječenja limfnih čvorova vrata, smjernice se temelje na podacima randomiziranih studija koje su uspoređivale primjenu adjuvantnog zračenja naspram konkomitantne kemoradioterapije [4].

Pacijentima s uznapredovalim primarnim karcinomima glotisa, kao i svima s karcinomima supraglotisa, koji nemaju klinički zahvaćene limfne čvorove, savjetuje se elektivno liječenje limfnih čvorova vrata, bilo kirurški bilo radioterapijom. Savjetuje se zbog rizika subkliničke bolesti, i puteva širenja uznapredovalih karcinoma grkljana, selektivnom disekcijom obuhvatiti istostrane ili obostrane limfne čvorove regije II, III i IV, ovisno o mjestu i lokalnoj proširenosti primarnog tumora. Primjenom IMRT-a mogu se istovremeno primijeniti različite doze zračenja na različite regije limfnih čvorova, ovisno o prisutnosti ili odsutnosti makroskopske bolesti, tj. rizika postojana subkliničke bolesti.

Pacijentima s klinički pozitivnim limfnim čvorovima, kod kojih se planira kirurški zahvat primarnog tumora, potrebno je učiniti i sveobuhvatnu disekciju vrata, i to regija II do IV iste strane za glotične tumore. Kod supraglotičnih tumora s pozitivnim limfnim čvorovima potrebna je obostrana disekcija vrata regija II do IV, a kod subglotičnih regija II do IV iste strane te regije VI obostrano [42]. Nakon operacije ovisno o patohistološkim značajkama tumora, provodi se adjuvantno liječenje. Kod pozitivnih čvorova regije II, potrebno je elektivnom radioterapijom obuhvatiti i regiju Ib kod karcinoma glotisa.

Onim pacijentima koji su imali klinički zahvaćene limfne čvorove vrata, a imaju potpuni klinički odgovor na liječenje primarnom radioterapijom ili konkomitantnom kemoradioterapijom, nije potrebna disekcija vrata. Ona se savjetuje svim pacijentima kod kojih



nije postignuta kompletna regresija bolesti. Prospektivno randomizirano istraživanje na više od 500 pacijenata s N2 ili N3 stadijem bolesti (više od 80 % pacijenti s primarnim karcinomom orofarinksa), ispitalo je učinkovitost primjene planirane disekcije vrata nakon provedene primarne konkomitantne kemoradioterapije, naspram PET/CT praćenja. Rezultati su pokazali slične stope dvogodišnjeg preživljenja, uz nižu stopu disekcije vrata te manje troškove liječenja u skupini pacijenata koja je bila praćena [153]. Četiri do osam tjedana nakon primarnog liječenja provodi se klinička procjena odgovora tumora i limfnih čvorova vrata na provedenu terapiju. Ukoliko klinički postoji ostatna bolest potrebna je daljnja radiološka obrada i procjena resektabilnosti. U pacijenata s lokalno ili lokoregionalno uznapredovalim tumorima koji su postigli odgovor na primarnu terapiju, potrebno je učiniti radiološku obradu. Savjetuje se učiniti MSCT ili MR vrata bar 8 do 12 tjedna od završetka liječenja, ili preferabilno PET/CT, bar 12 tjedna od završetka primarnog liječenja. U slučaju ostatne bolesti savjetuje se radikalni kirurški zahvat.

Na temelju podanaliza randomiziranih, kao i retrospektivnih i prospektivnih kliničkih ispitivanja, pacijentima s prodorom tumora kroz hrskavicu i zahvaćanjem mekih tkiva vrata (cT4aN0-3), savjetuje se primarno kirurško liječenje, s obzirom na to da je iščekivani ishod primjene metoda očuvanja grkljana loš [121,136]. Nakon kirurškog liječenja na temelju patohistoloških karakteristika tumora slijedi adjuvantno liječenje. Važna je pažljiva selekcija pacijenata prije odluke o liječenju. Kod pojedinih pacijenata s ovim stadijem bolesti koji nemaju veliko opterećenje tumorom ili odbijaju kirurško liječenje, dolazi u obzir primjena primarne konkomitantne kemoradioterapije ili indukcijske kemoterapije, i u slučaju odgovora radioterapija sama, ili uz sustavno liječenje. U slučaju nepostojanja odgovora na indukcijsku kemoterapiju savjetuje se kirurško liječenje. U pacijenata koji nisu kandidati za kirurško liječenje ili konkomitantnu kemoradioterapiju, dolazi u obzir primarna radioterapija. Savjetuje se primjena nestandardnih shema frakcioniranja, posebno hiperfrakcioniranja, koje su pokazale statistički značajno produljenje preživljenja i bolju lokoregionalnu kontrolu bolesti naspram standardnih [129].

Kod jako uznapredovale lokoregionalne bolesti preferira se kirurško liječenje ukoliko je bolest resektabilna, tj. pacijent kandidat za operaciju. Ukoliko isto nije moguće (cT4bN0-3), primjenjuje se primarno onkološko liječenje konkomitantnom kemoradioterapijom temeljenoj na visokodoznoj cisplatinu [138,154]. Primjenom kombinacijske terapije postižu se značajne četverogodišnje stope kontrole bolesti (71 %) i ukupnog preživljenja (56 %) na temelju rezultata retrospektivnih studija [121]. Osim visokodozne cisplatine, temeljem rezultata randomiziranog

kliničkog istraživanja, faze III, konkomitantno uz radioterapiju može se primijeniti karboplatinu/5FU [155]. Indukcijska kemoterapija može se primijeniti kod velikog opterećenja tumorom i simptomatske bolesti, a prije konkomitantne kemoradioterapije temeljene na tjednoj cisplatinu ili cetuksimabu, ili mono radioterapije [143]. Randomiziranim studijama nije dokazana dobit u ukupnom preživljenju primjenom indukcijske kemoterapije naspram same kemoradioterapije [146,156]. U pacijenata koji nisu kandidati za cisplatinu, može se konkomitantno uz radioterapiju primijeniti cetuksimab [152]. Konkomitantno uz radioterapiju može se primijeniti karboplatina uz paklitaksel ili tjednu cisplatinu [4]. U slučaju N0 bolesti svakako se savjetuje elektivno liječenje regija II do VI limfnih čvorova vrata obostrano. U obzir dolazi i palijativno monomodalitetno liječenje ili simptomatsko suportivna terapija ukoliko pacijent zbog općeg stanja nije kandidat za drugo [4].

#### **1.10.4 Liječenje metastatskog i rekurentnog karcinoma grkljana**

Liječenje metastatskog karcinoma grkljana ne razlikuje se od liječenja drugih metastatskih karcinoma pločastih stanica glave i vrata. Sustavno liječenje je terapija izbora za većinu pacijenata s lokalnim povratom bolesti i nemogućnošću resekcije ili primjene radioterapije, kao i onih s udaljenom diseminacijom bolesti, a koji su dobrog općeg stanja. Osim sustavnog liječenja, primjenjuju se i simptomatske i palijativne mjere. Cilj je liječenja u metastatskoj bolesti produljenje života i olakšavanje simptoma, a u pacijenata s rekurentom bolesti, izlječenje, što je ipak rijetko moguće. Kod oligometastatske bolesti primjenjuju se lokalne metode liječenja, kao što su radioterapija, ablativne metode i kirurško liječenje [4].

Kombinacijska kemoterapija, cisplatinom i 5FU, naspram monoterapije, pokazala je temeljem rezultata randomiziranih kliničkih ispitivanja bolju učinkovitost u smislu više stope odgovora, ali bez produljenja ukupnog preživljenja i uz veću toksičnost [157–160]. Kombinacija cisplatine i paklitaksela nije pokazala značajne razlike u rezultatima naspram cisplatine i 5FU [157]. U analizi dvije randomizirane studije kombinacijske kemoterapije temeljene na cisplatinu, utvrđeno je pet čimbenika koji su neovisni prediktori ukupnog preživljenja. Kraće ukupno preživljenje bilo je povezano s gubitkom tjelesne mase za više od 5 %, ECOG statusom 1 (naspram 0), prethodnom radioterapijom, karcinomima usne šupljine i hipofarinksa te dobrom do umjerenom diferencijacijom tumorskih stanica [161]. Stopa objektivnog odgovora iznosila je 32 %, a medijan ukupnog preživljenja 7,8 mjeseci za cijelu populaciju. Primjenom kombinacijskih protokola temeljenih na platini, udvostručuje se stopa odgovora, ali bez produljenja ukupnog preživljenja. U slučaju da pacijent zbog općeg stanja nije kandidat za kombinacijsko liječenje savjetuje se monokemoterapija. U obzir dolazi primjena: cisplatine,

karboplatine, paklitaksela, docetaksela, 5FU, metotreksata, kapecitabina, cetuksimaba i gemcitabina. Primjenom monoterapije postižu se stope odgovora od 15 % do 35 %, a kombinacijom cisplatine i 5FU-a manje od 40 % [162,163]. Postizanje kompletnog odgovora u metastatskim karcinomima glave i vrata je rijetko, ali se češće postiže kombinacijskim protokolima, a povezano je s duljim ukupnim preživljenjem [158]. Rezultati randomiziranog kliničkog istraživanja faze III, pokazali su da se kombinacijom cisplatine ili karboplatine, 5FU-a i cetuksimaba postižu bolji rezultati naspram kemoterapije cisplatinom i 5FU-om, i to bolja stopa odgovora kao i medijan ukupnog preživljenja [164]. Primjenjuju se i drugi kombinacijski protokoli poput platine i taksana te platine i cetuksimaba [4]. Više od deset godina standard u prvolinijskom liječenju pacijenata s metastatskim karcinomima glave i vrata, bila je kombinacija cisplatine, 5FU-a i cetuksimaba, s medijanom ukupnog preživljenja kraćim od godine dana. Novija studija je pokazala dobit u ukupnom preživljenju kombinacijom pembrolizumaba s cisplatinom i 5FU-om naspram cisplatine, 5FU-a i cetuksimaba, a bez razlike u preživljenju bez progresije bolesti [165]. Stoga je pembrolizumab u kombinaciji s cisplatinom i 5FU-om postao standard u prvolinijskom liječenju pacijenata s neresektabilnim lokalnim povratom ili metastatskom bolesti, a za tumore s PD-L1 ekspresijom izraženom kao CPS jednak ili veći od jedan primjenjuje se i kao monoterapija. U pacijenata s CPS 20 ili višim, postignuto je ukupno preživljenje od gotovo 15 mjeseci primjenom monoterapije pembrolizumabom. Kombinacija kemoimunoterapije preferira se pred mono-imunoterapijom, posebno u pacijenata s većim opterećenjem tumorom [4]. Naknadna analiza rezultata ovog kliničkog ispitivanja pokazala je da je najmanje 20 % pacijenata koji su primali pembrolizumab postiglo dugotrajan odgovor, uz plato u krivulji preživljenja te 30 % onih s PD-L1 CPS 20 ili višim, a koji su primali pembrolizumab i kemoterapiju. Ova analiza je pokazala i visoku stopu odgovora na kemoterapiju, posebno taksanima, nakon progresije na pembrolizumab i kemoterapiju [166,167].

Nakon progresije na prvolinijsku terapiju primjenjuje se najčešće mono-terapija. U obzir dolazi kemoterapija, imunoterapija ili biološka terapija ovisno o terapiji korištenoj u prvoj liniji liječenja. Kod progresije na platinu najčešće su se prije koristili docetaksel, metotreksat, cetuksimab (ukoliko nije korišten u prvoj liniji liječenja), a temeljem novih kliničkih ispitivanja sada se savjetuju nivolumab ili pembrolizumab [4,168,169].

U slučaju lokalnog povrata ili lokoregionalne ostatne bolesti u obzir dolazi kirurški zahvat ukoliko je moguć, a primjena adjuvantnog liječenja ovisi o rizičnim čimbenicima i ranije provedenoj terapiji. U pacijenata koji nisu kandidati za kirurški zahvat, savjetuje se

multidisciplinarni pristup te odlukom tima, primjena konkomitante kemoradioterapije ukoliko pacijent ranije nije zračen ili ukoliko postoji mogućnost reiradijacije, primjena kemoterapije konkomitantno s reiradijacijom. Prilikom odluke o reiradijaciji u obzir treba uzeti komorbiditete, toksičnost i vrijeme proteklo od ranije provedene terapije (minimalno 6 mjeseci). Koriste se različite tehnike, 3DCRT, IMRT, VMAT, stereotaksijska radioterapija (SBRT) te protonsko zračenje, a u polje zračenja se stavlja samo aktivna bolest. Randomizirano multicentrično ispitivanje, faze III, je pokazalo da reiradijacija konkomitantno s kemoterapijom nakon kirurškog zahvata naspram samog kirurškog zahvata, statistički značajno poboljšava preživljenje bez znakova bolesti. Akutna toksičnost gradusa 3 i 4 bila je značajna u 28 % pacijenata, međutim, korištene su starije tehnike zračenja (3DCRT) [170]. Retrospektivna analiza više od 200 pacijenata pokazala je da primjena IMRT-a kao tehnike pri reiradijaciji može biti povezana s boljom stopom lokalne kontrole i preživljenja uz kronične nuspojave kod 16 % pacijenata nakon dvije godine [171,172]. Konkomitantna primjena sustavne terapije povezana je se višim rizikom toksičnosti. Stope petogodišnje lokoregionalne kontrole, preživljenja bez progresije bolesti i ukupnog preživljenja iznosile su 53 %, 22 % i 32 %, a nuspojave gradusa 3 ili više bile su rijetke. Najbolji rezultati reiradijacije postižu se primjenom SBRT-e u pacijenata s malim tumorima i bez zahvaćanja kože [4]. Za većinu pacijenata s lokalnim povratom i nemogućnošću resekcije, a koji su dobrog općeg stanja, terapija izbora je sustavno liječenje [4].

#### **1.10.5 Praćenje pacijenata s karcinomima grkljana**

Svim pacijentima koji su imali dijagnosticiran karcinom grkljana, neovisno o stadiju bolesti, potrebno je pažljivo praćenje. Učestalost kontrolnih pregleda ovisi o riziku povrata bolesti i razvoja drugih primarnih tumora te morbiditetu samog tumora, ali i provedenih modaliteta liječenja (prisutnost stome, praćenje funkcije govora, gutanja), kao i komorbiditetima. Posebno je važno savjetovanje prekida pušenja cigareta i uzimanja alkohola te osvještavanje pacijenata o drugim rizičnim čimbenicima, uz socijalnu i psihološku podršku. Fizikalni pregled glave i vrata kao i fiberendoskopija i indirektna laringoskopija savjetuju se svakih jedan do tri mjeseca tijekom prve godine od završetka liječenja te svakih dva do četiri mjeseca tijekom druge godine praćenja. U trećoj godini praćenja savjetuju se ovakve kontrole svakih tri do šest mjeseci, a nakon toga svakih četiri do šest mjeseci do kraja pete godine. Nakon pete godine praćenja, kontrole se planiraju jednom godišnje. Slikovna dijagnostika, najčešće MSCT, a rjeđe MR vrata savjetuje se postoperativno u pacijenata s visokim rizikom za povrat bolesti, ili kod onih koji imaju kliničku sumnju na recidiv, a prije početka adjuvantnog liječenja. U pacijenata koji

nemaju potrebu za adjuvantnim liječenjem, savjetuje se učiniti MSCT vrata tri do četiri mjeseca nakon operacije, a on će se smatrati inicijalnim za daljnje praćenje. Nakon primarne radioterapije ili kemoradioterapije, dolazi u obzir učiniti MSCT vrata četiri do osam tjedana od završetka liječenja, ili i ranije ukoliko se sumnja na progresiju bolesti. Inače se nakon primarne radioterapije ili kemoradioterapije planira PET/CT zbog procjene odgovora tj. ostatne bolesti, minimalno dvanaest tjedana od završetka liječenja. Optimalnim vremenom za PET/CT smatra se razdoblje od tri do šest mjeseci nakon završetka liječenja. Nakon dva ili tri ciklusa indukcijske kemoterapije, potrebno je zbog procjene odgovora na terapiju učiniti slikovnu dijagnostiku, najčešće MSCT vrata, na temelju koje se donosi odluka o daljnjem liječenju. Kod sumnje na udaljenu diseminaciju bolesti nakon provedenog indukcijskog ili primarnog liječenja može se učiniti MSCT prsišta ili PET/CT. UZV vrata može pomoći u definiciji statusa limfnih čvorova, kako prije tako i nakon provedenog liječenja te tijekom praćenja. Nakon zračenja potrebna je i kontrola funkcije štitnjače jednom do dva puta godišnje te redovite kontrole stomatologa. U praćenju pacijenata, koji su s aktivnim liječenjem završili prije više od šest mjeseci, ne postoje smjernice o učestalosti i metodi slikovne dijagnostike kod asimptomatskih pacijenata koji na prethodnoj slikovnoj obradi nisu imali znakova ostatne zloćudne bolesti. U slučaju nastanka simptoma u obzir dolaze UZV vrata, MSCT ili MR vrata, a MSCT prsnog koša i trbuha ili PET/CT kod sumnje na udaljenu diseminaciju bolesti. U pacijenata kod kojih je pregled sluznice otežan ili nemoguć, savjetuje se jednom godišnje učiniti i slikovnu dijagnostičku obradu koja je rađena i prije liječenja (najčešće MSCT i UZV vrata) [4,42].

## 1.11 Tumorski mikrookoliš karcinoma grkljana

### 1.11.1 Imunološke stanice u mikrookolišu karcinoma grkljana

Tumorski mikrookoliš je složeni sustav, a dio je odgovora imunološkog sustava pacijenta na tumor. Čine ga izvanstanični matriks, krvne i limfne žile, živci, imunološke stanice, fibroblasti i druge stromalne stanice te različite molekule, poput citokina i kemokina. Kontinuirana interakcija tumora i tumorskog mikrookoliša odgovorna je ne samo za progresiju tumora, već i odgovor na liječenje. Tumor svojim djelovanjem inhibira imunološki sustav koji ga pokušava eliminirati te ga istovremeno potiče na protumorsko djelovanje. Ove su interakcije modulirane različitim molekulama. I prirodni i stečeni imunološki sustav sastavni su dio tumorskog mikrookoliša. Stanice koje sudjeluju u prirodnom imunološkom odgovoru su: neutrofili, makrofagi, dendritičke i supresijske stanice mijeloidnog porijekla te stanice prirodne ubojice (engl. *natural killer cell*, NK stanice). Neutrofili se inače nalaze u krvi, ali prilikom aktivacije prirodnog imunološkog odgovora brzo dolaze na mjesto infekcije, gdje imaju ulogu eliminacije mikroorganizama. Neposredno aktiviraju i stečeni imunološki sustav jer sudjeluju u odgovoru protutijela na patogene, prezentaciji antigena i aktivaciji T limfocita. Visok postotak neutrofila u krvnoj slici, kao i visok omjer neutrofila prema limfocitima, loš su prognostički čimbenik u različitim tumorskim sijelima, uključujući i karcinome larinksa, a neutrofili utječu i na rezistenciju na radioterapiju [173,174]. Makrofagi također sudjeluju u prirodnom i stečenom imunološkom odgovoru. Makrofagi M1 sudjeluju u antitumorskom odgovoru svojim citotoksičnim djelovanjem, a proizvode i proupalne citokine, dok M2 makrofagi imaju suprotno protuupalno djelovanje. Pomagački T limfociti aktiviraju M1 makrofage putem IFN- $\gamma$ . Visoka zastupljenost CD68<sup>+</sup> makrofaga u tumorskom tkivu pacijenata s karcinomima glave i vrata povezana je s lošijom prognozom, a povećava se s porastom stadija bolesti. Prisutnost regulacijskih T limfocita i M2 makrofaga u tumorskom tkivu karcinoma grkljana također je povezana s lošijom prognozom. Njihova aktivacija posljedica je povratne sprege, M2 makrofage aktiviraju tumorske stanice, a oni potom aktiviraju regulacijske T limfocite. Regulacijski T limfociti induciraju diferencijaciju makrofaga prema M2 fenotipu, što u konačnici dovodi do imunosupresije. Makrofazi M1 su u negativnoj korelaciji, a M2 u pozitivnoj korelaciji s ekspresijom PD-L1. Makrofagi povezani s tumorom (engl. *tumor-associated macrophages*, TAMs) su posebna vrsta makrofaga, a imaju isključivo protumorsko i imunosupresijsko djelovanje kao i supresijske stanice mijeloidnog porijekla (engl. *myeloid-derived suppressor cells*, MDSCs). Tumorske stanice luče različite čimbenike rasta koji induciraju diferencijaciju i proliferaciju ovih stanica te njihovu migraciju na mjesto primarnog

tumora, ali i mjesta budućih metastaza. Na ovim mjestima supresijske stanice mijeloidnog podrijetla imaju protumorski učinak, poput inhibicije proliferacije T stanica, i druge. Oni također potiču i protumorske neimunološke funkcije, poput povećane angiogeneze i propusnosti krvnih žila, što doprinosi nastanku diseminacije bolesti [174]. Trombociti također induciraju proliferaciju tumorskih stanica, angiogenezu i diseminaciju, a njihov povišen broj korelira s lošijom prognozom u različitim tumorskim sijelima [174]. Stanice NK čine dio prirodnog imunološkog odgovora i eliminiraju tumorske stanice ili patogene koji na sebi nemaju eksprimirane molekule MHC I (engl. *major histocompatibility complex*) aktivacijom apoptoze. Dendritičke stanice prezentiraju antigen T limfocitima i na taj se način aktivira stečeni imunološki odgovor. Osim prezentacije antigena, potrebni su još ko-stimulatori B7 i signali različitih citokina za aktivaciju tumor-specifičnih citotoksičnih T-limfocita. Na B7 skupinu molekula mogu se vezati inhibitorški receptori CTLA4 na T limfocitima te inhibirati njihovu aktivaciju [174]. Aktivnost cGAS-STING signalnog puta također je važna za aktivnost prirodnog, ali i stečenog imunološkog odgovora. Stanice raka izravno komuniciraju s ostalim stanicama u tumorskom mikrookolišu, ili posredno, putem različitih faktora rasta, citokina i kemokina. Dokazan je utjecaj mikrobiote na onkogenezu u pacijenata s karcinomima glave i vrata, a u uzorcima pacijenata s karcinomima grkljana postoji značajna razlika u sastavku bakterija naspram zdravih ispitanika [174].

Aktivaciju stečenog imunološkog odgovora inicira prirodni imunološki odgovor. Glavne efektorske stanice protutumorskog imunološkog odgovora su tumor-infiltrirajući limfociti (engl. *tumor-infiltrating lymphocytes*, TIL). Dokazana je prognostička vrijednost zastupljenosti tumor-infiltrirajućih limfocita u tumorskom mikrookolišu u različitim tumorskim sijelima. Tako je u karcinomu debelog crijeva kvantifikacija određenih T stanica (CD3+ i CD8+ stanice) imala značajniju prognostičku vrijednost od stadija bolesti po TNM klasifikaciji. I kod karcinoma glave i vrata prisutnost tumor-infiltrirajućih leukocita se sve više prepoznaje kao važan biomarker, s mogućom prognostičkom vrijednosti. Glavno ograničenje većine ovih studija je heterogenost rezultata zbog uključivanja svih sijela glave i vrata u istu analizu, a zbog relativno malih brojeva pacijenata po pojedinim sijelima. Pretpostavlja se da je prognostička vrijednost zastupljenosti tumor-infiltrirajućih limfocita vjerojatno drugačija između različitih tumorskih sijela glave i vrata što zahtjeva analizu homogenijih skupina pacijenata. Tako postoji sve veći broj istraživanja koja su pokazala bolju prognozu kad je prisutna obilna infiltracija limfocita u tumoru i tumorskom mikrookolišu pacijenata s pločastim karcinomima grkljana. Glavno ograničenje ovih studija su analize na relativno malom broju pacijenata te nepostojanje

standardiziranih protokola kvantifikacije tumor-infiltrirajućih limfocita, zbog čega se ono još ne primjenjuje u kliničkoj praksi [175].

Jedno od glavnih obilježja raka jest sposobnost izbjegavanja imunološkog odgovora koja e provodi kroz tri faze – eliminacija, ravnoteža i bijeg. Poznato je da zadnja faza, progresija raka, koju karakterizira abnormalna proliferacija stanica zapravo posljedica neravnoteže između agresivnog rasta tumora i oslabljenog imunološkog odgovora domaćina. Dva su glavna mehanizma rezistencije tumora na stečeni imunološki odgovor. Kod tumora s obilnom infiltracijom T limfocitima, može doći do inhibicije imunološkog odgovora različitim inhibitornim citokinima, a kod tumora koji nemaju upalni infiltrat (takozvani hladni tumori) nema posljedično ni aktivacije imunološkog odgovora. Kod tumora s obilnim upalnim infiltratom, kao što su karcinomi glave i vrata, inhibicija imunološkog dogovora je posljedica različitih mehanizama, poput snižene ekspresije molekula HLA, aktivacije MAPK signalnog puta, prekomjerne ekspresije antigena koji inhibiraju aktivnost T stanica te drugih imunosupresivnih citokina [174,175].

Izvršnu funkciju imunološkog odgovora u tumorima obavljaju citotoksični T limfociti, zbog čega se različitim pristupima pokušava predvidjeti njihova učinkovitost u tumoru. Nedostatak infiltracije tumorskog mikrookoliša jasni je znak neučinkovitosti imunološke obrane. Različiti su uzroci nedostatka T limfocita u tumorima, poput postojanja mehaničke barijere uslijed fibroze, nepropusnosti krvnih žila, nepostojanja kemokina koji privlače T limfocite. U više od 50 % pacijenata s karcinomima glave i vrata postoji obilan imunološki infiltrat u tumoru i njegovoj neposrednoj okolini, a on je povezan s boljom prognozom, kao i učinkovitosti indukcijske kemoterapije. Na aktivnost T stanica utječe i ekspresija molekula PD-L1 i CTLA-4. Ekspresija molekule PD-L1 je prisutna kod 30 %, a CTLA-4 kod 20 % pacijenata s karcinomima grkljana. Karcinomi grkljana imaju nižu ekspresiju CTLA-4 od ostalih karcinoma glave i vrata. Viša ekspresija PD-L1 na imunološkim, ali ne i na tumorskim stanicama, povezana je s boljom prognozom pacijenata s karcinomima larinksa. Na aktivnost T limfocita utječe i postojanje velikog broja neoantigena, opći imunološki status pacijenta i prisutnost protumorskih upalnih čimbenika. Poznato je da tumori s velikim brojem neoantigena imaju bolji imunološki odgovor. Pokazatelj koji se koristi u pokušaju kvantifikacije neoantigena je mutacijsko opterećenje tumora (engl. *tumor mutational burden*, TMB). U karcinomima grkljana PD-L1 ekspresija se koristi kao prediktivni biomarker u liječenju imunoterapijom. Osim T citotoksičnih limfocita, važna je uloga regulatornih T limfocita (engl. *regulatory T cells*, Tregs) koji sprečavaju prekomjeran imunološki odgovor. Tijekom kronične upale te prilikom



razvoja karcinoma u organizmu, dolazi do smanjenja aktivacije T stanica i njihovog iscrpljivanja (engl. *exhausted T cells*, Tex), pri čemu nastupa zadnja faza izbjegavanja imunološkog odgovora, faza bijega, što omogućava abnormalnu proliferaciju tumorskih stanica. Iscrpljeni T limfociti imaju visoku ekspresiju molekule PD-1 koja je osnova djelovanja inhibitora kontrolnih točaka [174]. Tumorske stanice napreduju izbjegavanjem imunološkog odgovora, privlačenjem regulatornih T limfocita, povećanjem ekspresije inhibitornih receptora kao što su PD-1 i CTLA-4 na tumor-infiltrirajućim limfocitima ili povećanjem ekspresije liganda PD-L1 na tumorskim stanicama. Upravo su ova otkrića dovela do primjene inhibitora kontrolnih točaka koji ciljaju PD-1, PD-L1 ili CTLA-4 put [174,175]. Sposobnost izbjegavanja imunološkog odgovora je u fokusu brojnih istraživanja koja moduliranjem imunološkog sustava pacijenata pokušavaju zaustaviti tumorski rast.

### **1.11.2 Inhibitori kontrolnih točaka**

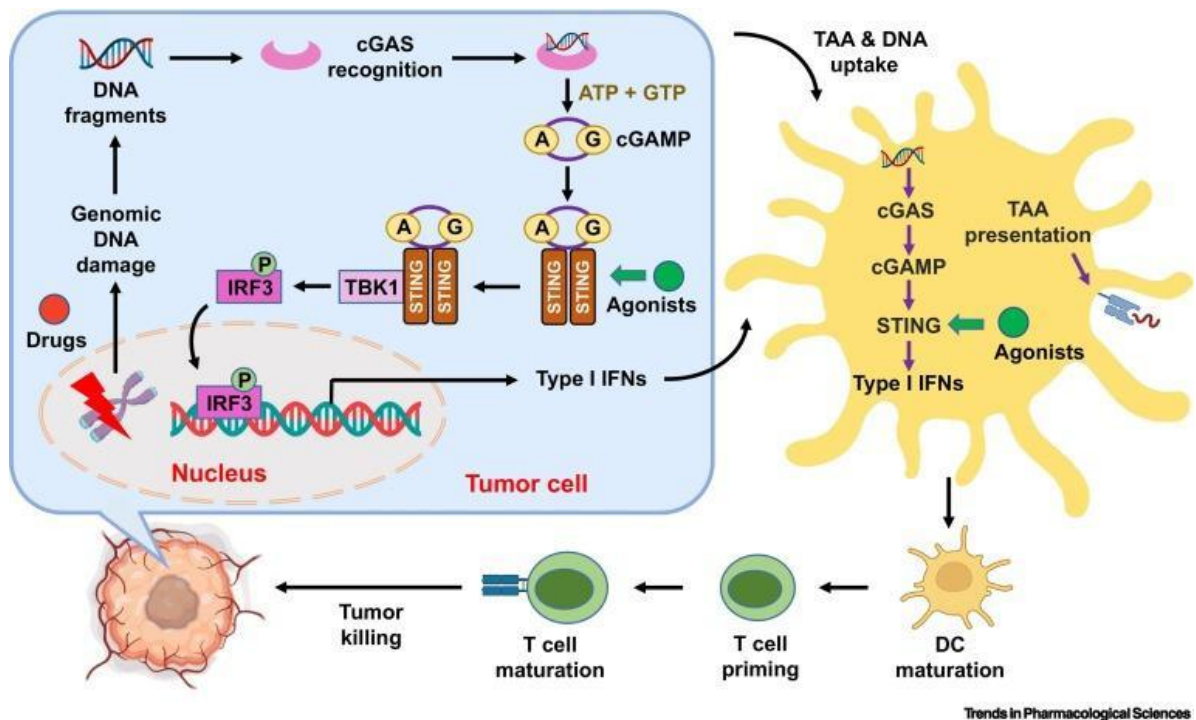
Jedan od načina reaktivacije imunološkog sustava, koji se koristi u liječenju zloćudnih bolesti, je primjena inhibitora kontrolnih točaka. Vezanje protutijela na inhibitorne receptore PD-1 i CTLA4 na tumor-infiltrirajućim T limfocitima te na ligand PD-L1 koji se nalazi na tumorskim stanicama, dovodi do reaktivacije T limfocita.

Unatoč poboljšanju rezultata liječenja operiranih pacijenata s visokim rizikom primjenom adjuvantne kemoradioterapije, stope petogodišnjeg preživljenja i dalje su niske, uz povrat bolesti u polovice pacijenata unutar tri godine od dijagnoze. Petogodišnje preživljenje pacijenata s HPV negativnim uznapredovalim tumorima glave i vrata i dalje je niže od 50 %, uz značajno narušenu funkciju grkljana. U prvoj i drugoj liniji liječenja pacijenata s neresektabilnim povratom bolesti i metastatskim karcinomima grkljana odobreni su PD-1 inhibitori, temeljem rezultata kliničkih studija faze tri. Nije poznato zašto primjena drugih inhibitora kontrolnih točaka, nije učinkovita u liječenju ovih karcinoma. Učinak imunoterapije u standardnim protokolima liječenja metastatskog karcinoma grkljana sugerira moguću primjenu ove terapije i u ranijim stadijima bolesti s ciljem bolje sustavne, ali i lokalne kontrole bolesti uz mogućnost poštediti organa [176]. Poznato je da vrijeme početka primjene imunoterapije inhibitorima kontrolnih točaka utječe na ishode u liječenju karcinoma, pa se tako ranijom primjenom imunoterapije može postići dugotrajan odgovor kod većeg broja pacijenata, što se povezuje s nepostojanjem na terapiju rezistentnih klonova tumorskih stanica. U tijeku su studije koje ispituju i pitanje duljine primjene imunoterapije, kao i sekvenciranje u odnosu na druge terapijske mogućnosti [176]. Koncept rane primjene imunoterapije pokazao se uspješnim u neoadjuvantnom liječenju pacijenata s drugim solidnim tumorima [177–179]. Zloćudni

tumori glave i vrata obilno su prožeti imunološkim stanicama i imaju veliko mutacijsko i antigensko opterećenje te se očekuje translacija prekliničkih rezultata u neoadjuvantnoj primjeni inhibitora kontrolnih točaka na rezultate kliničkih studija [180]. Za razliku od neoadjuvantne kemoterapije kojom se direktno izaziva smrt tumorske stanice radi smanjenja tumorske mase, primjenom neoadjuvantne imunoterapije potiče se aktivacija imunološkog sustava pacijenta s ciljem prepoznavanja antigena specifičnih za tumor, aktivacije citotoksičnih T stanica te uništenja tumorskih stanica unutar primarnog tumora, ali i mogućih mikrometastaza. Osim toga, primjena imunoterapije ima manje nuspojava od primjene drugih terapijskih opcija u liječenju karcinoma grkljana te omogućava jednostavno uzimanje bioptičkog materijala za translacijska istraživanja na nativnom tumorskom tkivu. To je važno za utvrđivanje prediktivnih biomarkera, imunoloških markera aktivnosti terapije i molekularnih mehanizama nastanka ovih karcinoma [176]. Bolje razumijevanje imunoloških procesa i precizniji prediktivni biomarkeri omogućili bi uspješniju selekciju pacijenata za primjenu ove terapije u ranijim stadijima bolesti. Poznato je kako PD-L1 ekspresija nije idealan biomarker u predviđanju odgovora na imunoterapiju inhibitorima kontrolnih točaka. Istražuje se potencijalna biomarkerska vrijednosti ekspresije PD-L2, HPV infekcije, mutacijskog opterećenja tumora, kao i fenotipa imunoloških i stromalnih stanica te molekula prisutnih u tumorskom mikrookolišu. U tijeku je više kliničkih studija koje istražuju primjenu imunoterapije u ranim stadijima karcinoma grkljana, samostalno ili u kombinaciji s drugim lijekovima i radioterapijom, a nedavno su objavljeni i rezultati nekih od ovih ispitivanja [176]. Zbog cijene, ali i mogućih nuspojava primjene imunoterapije, od posebnog je interesa definirati podskupinu pacijenata koja će njenom primjenom imati najveću korist, u svim stadijima bolesti. Istražuje se i mogućnost povećanja učinkovitosti imunoterapije inhibitorima kontrolnih točaka manipulacijama imunološkog sustava imunomodulatorima, što je dovelo do interesa za signalni put cGAS-STING zbog njegove uloge u prirođenom i stečenom imunološkom odgovoru.

### **1.11.3 cGAS-STING signalni put**

Stimulator gena za interferon (engl. *stimulator of interferon genes*, STING) je protein izražen na endoplazmatskom retikulumu u različitim vrstama stanica. Komponenta je signalne kaskade cGAS-STING (engl. *cyclic GMP-AMP synthase*) odgovorne za stimulaciju urođenog imunološkog odgovora, prvenstveno u vidu aktivacije i polarizacije makrofaga stranom DNA prilikom infekcije, ali i vlastitom DNA kod genomske nestabilnosti i oštećenja stanica [174,181]. Osim toga, signalni put cGAS-STING može utjecati na diferencijaciju T limfocita čime utječe na aktivaciju stečenog imunološkog odgovora [182,183] (slika 7).



**Slika 7.** cGAS-STING signalni put (preuzeto od Guo et al 2022).

Kad se dsDNA veže na cGAS nastaje ciklički GMP-AMP (cGAMP) koji aktivira STING. Sekundarni glasnik cGAMP izlaskom iz stanice dovodi do aktivacije imunološkog odgovora u susjednim stanicama i mikrookolišu. Dakle, cGAS je izravni senzor citosolne dvolančane DNA ključan za aktiviranje odgovora interferona tipa I na invaziju strane (virusne ili bakterijske) DNA, ali također igra važnu ulogu u karcinogenezi [184]. Postoje različiti mehanizmi koji sprječavaju kontakt kromatinske ili mitohondrijske DNA domaćina s proteinom cGAS i na taj način preveniraju aktivaciju ovog signalnog puta na vlastiti genetski materijal [185]. Istovremeno, cGAS je senzor disfunkcionalnosti ovih mehanizama što može rezultirati sterilnom upalom. U normalnim uvjetima u stanici cGAS se nalazi u čvrstom kompleksu s nukleosomima, s vrlo niskim koncentracijama u citoplazmi, što sprječava njegovu dimerizaciju i aktivaciju vlastitom DNA. Ovo je posebno važno pri mitozu stanice kada je genetski materijal izložen. Ipak, pri zastoju u mitozu dolazi do deaktivacije ovih zaštitnih mehanizama te aktivacije cGAS-STING signalnog puta, produkcije interferona, starenja i smrt stanice i posljedično imunološkog nadzora ovih potencijalno kancerogenih stanica. Potencijalno sve promjene u stanici koje mogu dovesti do izlaska DNA u citoplazmu, mogu utjecati na aktivaciju proteina cGAS. Slično se događa starenjem stanice, jer zbog gubitka čvrstoće ovojnice jezgre dolazi do otpuštanja genetskog materijala i aktivacije kronične upale ovisne o interferonu [185]. Tijekom ovog procesa formiraju se mikronukleusi, fragmenti kromatina u citoplazmi i specifičan fenotip povezan sa staničnom senescencijom (engl. *senescence-associated secretory phenotype*,

SASP), uz prisutnost proteaza, citokina i faktora rasta. SASP dovodi do aktivacije imunoloških stanica koje uklanjaju oštećene stanice, kao i stanice s mutiranom DNA, a koje bi se potencijalno mogle pretvoriti u tumorske. Dakle, cGAS inducirani SASP može imati protutumorski učinak, ali on ovisi o kontekstu.

Struktura dimeriziranog proteina STING se mijenja vezanjem cGAMP-a te se zatim premješta na Golgijev aparat i preko TBK1 aktivira niz složenih unutarstaničnih procesa koji dovode do fosforilacije IRF 3. Protein IRF3 se dimerizira i premješta u jezgru gdje potiče ekspresiju gena interferona I. Također, TBK1 dovodi do aktivacije NF $\kappa$ B signalnog puta i ekspresije proupalnih gena za različite citokine i kemokine te aktivacije imunološkog odgovora. Osim toga oligomerizirani STING aktivira nekanonsku autofagiju [185,186].

Osim uloge u aktivaciji prirođenog i stečenog imunološkog odgovora i posljedično antitumorskog učinka, cGAS-STING signalni put potencijalno može biti pokretač imunološki posredovanog nastanka i proliferacije zloćudnih stanica, ali i procesa metastaziranja. Nakupljanje DNA u citolozu, kao posljedice oštećenja, aktivira cGAS što dovodi do proizvodnje cGAMP-a te aktivacije proteina STING u tumorskim stanicama i antigen-prezentirajućim stanicama. Nadalje STING aktivira ekspresiju gena za interferon I te SASP fenotip. Citokini koji se otpuštaju iz tumorskih i antigen prezentirajućih stanica mogu aktivirati CD8<sup>+</sup> T limfocite i NK stanice. Protein STING aktivira i procese autofagije, inducira starenje i kroničnu upalu te regulira diferencijaciju supresijskih stanica mijeloidnog porijekla i makrofaga koji su prisutni u tumorskom mikrookolišu. Utjecaj signalnog puta cGAS-STING na tumorski mikrookoliš može inducirati proliferaciju ili supresiju tumorskih stanica. Kako bi izbjegle staničnu smrt, tumorske stanice moraju različitim mehanizmima spriječiti aktivnost cGAS-STING signalnog puta, čime protein STING postaje potencijalna terapijska meta [186].

Disfunkcija cGAS-STING signalnog puta je povezana s oskudnom infiltracijom imunoloških stanica i lošom prognozom kod više vrsta solidnih tumora [187–191]. Ekstrinzična ekspresija proteina STING na imunološkim stanicama, kao i intrinzična ekspresija koja je specifična za tumorske stanice, igraju različite uloge u kontroli odgovora tumorskog mikrookoliša, općenito inducirajući antitumorski učinak infiltracijom CD8<sup>+</sup> T limfocita i polarizacijom makrofaga M2 u M1 [192–194]. Osim toga, STING signalni put regulira mehanizme kontrole oštećenja DNA, a time i odgovor na terapiju koja dovodi do oštećenja DNA [192–194]. Upravo zbog svoje imunomodulatorne uloge cGAS-STING signalni put predstavlja atraktivnu metu u razvoju imunoterapije [195].

Nove generacije lijekova usmjerene na signalni put cGAS-STING, uključujući STING agoniste, odnedavno su potaknule zanimanje za antitumorsku ulogu ovog puta u karcinomima glave i vrata. Aktivnost cGAS-STING osi važna je za učinkovitost standardnih terapijskih opcija koje dovode do oštećenja DNA, poput cisplatine i zračenja, jer može utjecati na mehanizme nastanka slobodnih radikala (ROS), ali i na aktivnost PARP inhibitora [192]. Primjena STING agonista u monoterapiji, kao i u kombinaciji s inhibitorima kontrolnih točaka i terapijom koja dovodi do oštećenja DNA ispituje se u pretkliničkim i kliničkim istraživanjima [193,196].

Modulacija signalnog puta cGAS-STING ima potencijalnu terapijsku korist kod različitih tipova zloćudnih tumora i trenutno se istražuje u brojnim kliničkim studijama, ali njena uloga u razvoju i napredovanju karcinoma grkljana još nije istražena.

## 1.12 Problematika istraživanja

Paralelno s razvojem molekularne onkologije i genetike, razvijaju se i novi terapijski pristupi u liječenju karcinoma grkljana. Primjena imunoterapije inhibitorima kontrolnih točaka u pacijenata s uznapredovalim neresektabilnim karcinomima glave i vrata i metastatskom bolesti, dovela je do klinički i statistički značajnog produljenja ukupnog preživljenja, a kod manjeg broja pacijenata postignuta je dugotrajna kontrola bolesti [165,168]. Unatoč napretku u liječenju karcinoma grkljana, kao i glave i vrata uopće, i dalje su stope odgovora na terapiju niske, uz skromne rezultate i u ranim i u kasnim stadijima bolesti. S obzirom na to da su rezultati liječenja i dalje skromni, postoji značajna potreba za novim pristupima u liječenju, kao i poboljšanjem terapijskih ishoda pacijenata s karcinomima grkljana u smislu očuvanja organa i poboljšanja preživljenja bez znakova bolesti u ranijim, kao i ukupnog preživljenja u metastatskim stadijima bolesti [100,197]. Koncept primjene imunoterapije u ranim stadijima bolesti pokazao se uspješnim u neoadjuvantnom liječenju pacijenata s drugim solidnim tumorima. U tijeku je više kliničkih studija koje istražuju primjenu imunoterapije u ranim stadijima karcinoma grkljana, samostalno ili u kombinaciji s drugim terapijskim opcijama. Za što uspješniju selekciju pacijenata koji bi bili pogodni za primjenu ove terapije potrebno je bolje razumijevanje imunoloških procesa koji stoje u pozadini razvoja karcinoma grkljana, ali i precizniji prediktivni biomarkeri.

Uzimajući u obzir do sada poznate i opisane funkcije signalnog puta cGAS-STING, došlo je do razvoja i ispitivanja primjene različitih lijekova koji utječu na njegovu aktivnost, u prekliničkim i kliničkim studijama. Pokazano je da modulacija ovog signalnog puta STING agonistima ima terapijski potencijal kod zloćudnih tumora, s ciljem povećanja učinka imunološkog odgovora, a da je za njihovu učinkovitost potrebna ekspresija proteina STING. U tijeku su studije koje ispituju učinkovitost STING agonista kao monoterapije ili u kombinaciji s lijekovima koji se koriste kao standard u kliničkoj praksi (inhibitorima kontrolnih točaka, zračenjem, kemoterapijom) u različitim tumorskim sijelima. Ekspresija STING proteina te aktivacija cGAS-STING signalnog puta, kao i njihova uloga u razvoju i progresiji bolesti, prema našim spoznajama, nije do sada ispitana u karcinomima grkljana.

Ovom retrospektivno-prospektivnom studijom analizirani su epidemiološki podaci, kao i ekspresija proteina STING i cGAS u tumorskim stanicama, pacijenata s karcinomima grkljana stadija I do IV nemetastatske bolesti. Također je analizirana prisutnost imunoloških stanica, CD8<sup>+</sup> T limfocita, CD163<sup>+</sup> i CD68<sup>+</sup> makrofaga u uzorcima tumorskog tkiva ovih pacijenata. Dobiveni rezultati su korelirani s kliničkim i patohistološkim karakteristikama i ishodima, uz

prikaz epidemioloških rezultata analiziranih pacijenata. Epidemiološki podatci su ključni jer pružaju informacije o populaciji pacijenata, kao i uspjehu liječenja. Otkriće novih prognostičkih i prediktivnih biomarkera te uvođenje novih terapijskih opcija, važno je zbog utjecaja na kliničke ishode, ne samo u pacijenata s metastatskom bolesti, već i ranim stadijima karcinoma grkljana zbog psihosocijalne komponente funkcionalnog gubitka organa. S istim ciljem poboljšanja ishoda, važno je zbog specifičnosti funkcije grkljana, učestalosti ovih tumora, mutilirajućeg efekta terapijskih opcija kao i znatnog tereta za zdravstveni sustav, osmisliti i uvesti preventivne, ali i rane dijagnostičke postupnike čiji se razvoj temelji na dostupnim i preciznim epidemiološkim podacima [198].

## **2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA**

### **2.1 Hipoteza**

U uznapredovalim stadijima karcinoma grkljana prisutna je povećana razina ekspresije proteina STING u tumorskim stanicama. Povećana ekspresija proteina STING je u pozitivnoj korelaciji s višim stadijem bolesti, veličinom i proširenosti tumora (pT) i zahvaćenosti limfnih čvorova (N), a u negativnoj korelaciji s kliničkim ishodima.

### **2.2 Ciljevi istraživanja**

Osnovni cilj je bio utvrditi razinu ekspresije proteina STING u tumorskim stanicama pacijenata s karcinomima grkljana TNM stadija I do IV, bez udaljenih metastaza.

Sekundarni ciljevi su bili:

- istražiti korelaciju proteina STING s kliničko-patološkim karakteristikama i kliničkim ishodima
- istražiti ekspresiju proteina cGAS u tumorskim stanicama
- istražiti korelaciju proteina cGAS s kliničko-patološkim karakteristikama i kliničkim ishodima
- istražiti infiltraciju tumorskog tkiva CD8+ T stanicama, CD68+ i CD163+ makrofagima
- analizirati epidemiološke podatke populacije obuhvaćene ovim istraživanjem
- usporediti dobivene epidemiološke podatke s dostupnim epidemiološkim podacima iz literature
- klinički ishodi - ukupno preživljenje (OS) te preživljenje bez znakova bolesti (DFS).



### **3 ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA**

#### **3.1 Ispitanici**

Ovo retrospektivno-prospektivno istraživanje je obuhvatilo sve pacijente s karcinomom pločastih stanica grkljana koji su upućeni u Kliniku za onkologiju i radioterapiju KBC-a Split u razdoblju od 1. siječnja 2015. do 31. prosinca 2018. godine. Prikupljeni su podaci koji se odnose na demografske, kliničke i patološke značajke, kao i ishode. Klinički i epidemiološki podaci prikupljeni su iz pismohrane i bolničkog informatičkog sustava Klinike za onkologiju i radioterapiju, KBC-a Split. Podaci o preživljenju bez znakova bolesti (DFS) kao i ukupnom preživljenju (OS) prikupljeni su iz povijesti bolesti i podataka Matičnog ureda u Splitu. Imunohistokemijsko bojenje tkiva provedeno je na Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC-a Split, a analiza obojenih preparata u Laboratoriju za istraživanje raka Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu. Patohistološku dijagnozu potvrdila su neovisno dva iskusna patologa. Kliničko praćenje pacijenata završeno je 31. listopada 2022. godine.

Kliničko – patološke karakteristike koje su uključene u istraživanje bile su: dob, spol, primarno sijelo tumora, postojanje transglotičnog širenja tumora, stadij bolesti, T i N stadij bolesti, stupanj diferencijacije tumora, limfovaskularna i perineuralna invazija, pojava lokalnog povrata bolesti, udaljene diseminacije i novog primarnog tumora, ukupno (OS) i petogodišnje preživljenje i preživljenje bez znakova bolesti (DFS) te modaliteti liječenja. Ukupno preživljenje (OS) je definirano kao vrijeme od datuma dijagnoze patohistološke potvrde bolesti do datuma smrti od bolesti ili bilo kojeg drugog uzroka. Preživljenje bez znakova bolesti (DFS) je definirano kao vrijeme od datuma dijagnoze patohistološke potvrde bolesti do datuma povrata bolesti ili smrti od bolesti ili bilo kojeg drugog uzroka.

##### **3.1.1 Kriteriji uključenja**

U istraživanje su uključeni svi pacijenti iz navedenog vremenskog razdoblja s patohistološki potvrđenim karcinomom pločastih stanica grkljana, TNM stadija I do IV nemetastatske bolesti u trenutku postavljanja dijagnoze, kojima je dijagnoza postavljena u KBC-u Split, a nakon toga su upućeni na Kliniku za onkologiju i radioterapiju KBC-a Split.

##### **3.1.2 Kriteriji isključenja**

Iz istraživanja su isključeni pacijenti s utvrđenim stadijem IV metastatske bolesti u trenutku dijagnoze, kao i oni koji su dijagnosticirani, liječeni ili praćeni izvan KBC-a Split. Istraživanjem

nisu obuhvaćeni pacijenti koji zbog dobi i drugih komorbiditeta nisu bili kandidati za liječenje osim palijativnog, koji su odbili predloženo liječenje ili se nisu klinički pratili.

### **3.2 Određivanje veličine uzorka**

U pilot istraživanje uključeno je prvih 10 pacijenata, a potrebna veličina uzorka izračunata je uz pomoć programa „Sample size calculator Version 1.060“. Kako bi se dokazala povećana razina ekspresije proteina STING u tumorskim stanicama uznapredovalih naspram ranih stadija karcinoma grkljana, s razinom značajnosti  $p < 0,05$  te snagom istraživanja od 95 %, potrebna je veličina uzorka od 28 ispitanika po skupini. U ovu analizu uključeni su svi pacijenti koji su zadovoljili uključujuće kriterije.

### **3.3 Prikupljanje podataka**

Pretragom arhivske dokumentacije Klinike za onkologiju i radioterapiju pronađeno je ukupno 137 pacijenata u razdoblju od 1. siječnja 2015. do 31. prosinca 2018. godine, a od kojih je 91 zadovoljio uključujuće kriterije za epidemiološku analizu. Iz epidemiološke analize je isključeno 37 pacijenata kojima je dijagnoza postavljena van KBC-a Split, jedan pacijent koji je odbio liječenje, troje koji nisu nastavili redovito kliničko praćenje, kao i pet pacijenata koji nisu imali dovoljno tkiva za dokaz invazivnog karcinoma. Od 91 pacijenta uključenog u epidemiološku analizu, 59 pacijenata je imalo dovoljno tumorskog tkiva uklopljenog u parafinski blok, potrebnog za daljnje imunohistokemijske analize. Iz imunohistokemijske analize isključeni su pacijenti koji nisu operirani ili nisu imali dovoljno tumorskog tkiva uklopljenog u parafinski blok, njih ukupno 32. Od toga je bilo 30 pacijenata koji su liječeni primarnom radioterapijom te nisu imali dovoljno tumorskog tkiva, i 2 pacijenata koji su imali dovoljno tumorskog tkiva, ali imunohistokemijska analiza nije uspjela.

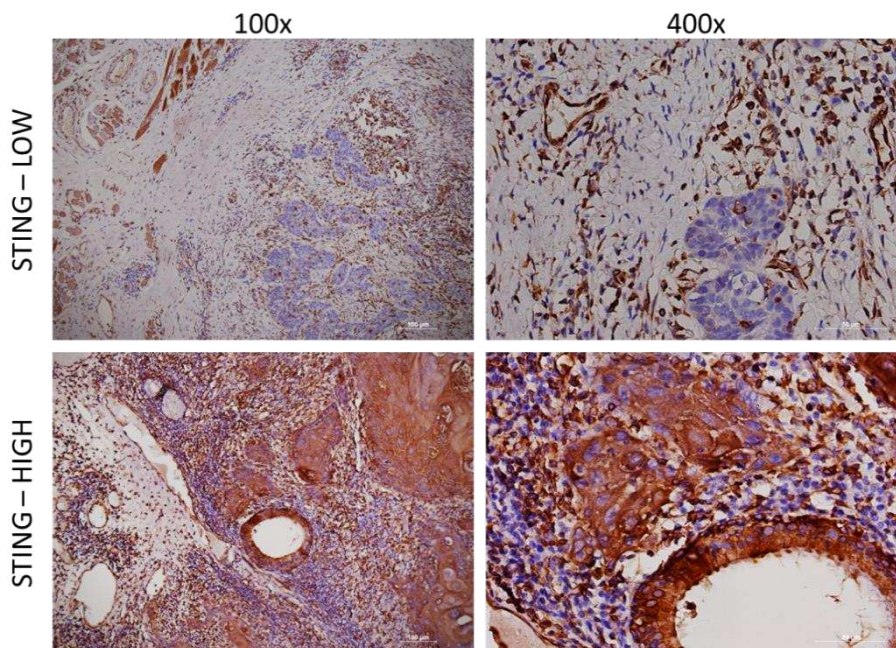
### **3.4 Imunohistokemija**

Imunohistokemijsko bojenje provedeno je na uzorcima tumorskog tkiva koji su fiksirani u 10 % neutralnom puferiranom formalinu i uklopljeni u parafinski blok. Rezovi debljine 4  $\mu\text{m}$  su prilijepljeni na pozitivno nabijena predmetna stakalca, deparafinizirani u ksilenu i rehidrirani korištenjem alkoholnih otopina silazne koncentracije. Kuhani su u EDTA puferu (pH 9,0) u mikrovalnoj pećnici, nakon čega su ostavljeni na sobnoj temperaturi 20 minuta, potom isprani u vodi i puferu TBS. Za blokiranje endogene peroksidaze korištena je otopina za blokiranje peroksidaze (dostavljena u kompletu EnVision, Dako-Cytomation, Glostrup, Danska). Nakon što su stakalca isprana u puferu TBS, inkubirana su 1 sat i 30 minuta s primarnim poliklonskim

mišjim anti-humanim c-GAS protutijelom (Proteintech, 26416-1-AP, razrjeđenje 1:200) ili STING protutijelom (Proteintech, 19851-1-AP, razrjeđenje 1:2000). Stakalca su nakon toga inkubirana u sekundarnim protutijelima (EnVision) nakon čega je slijedila vizualizacija metodom OptiView DAB IHC v6. Rezovi su obojeni hematoksilinom, dehidrirani i pokriveni sa stakalcem. Imunohistokemijsko bojenje pomoću protutijela anti-CD8 (Ventana, SP57, 790-4460, razrjeđenje 1:50), anti-CD68 (Ventana, PG-M1, M0876, razrjeđenje 1:50) i anti-CD163 (Ventana, MRQ-26, 163M-15, razrjeđenje 1:50) provedeno je na „Ultra Benchmark“ (Ventana Medical Systems, Inc. Oro Valley, AZ, SAD) uređaju prema uputama proizvođača.

### 3.5 Analiza imunohistokemijskog bojenja

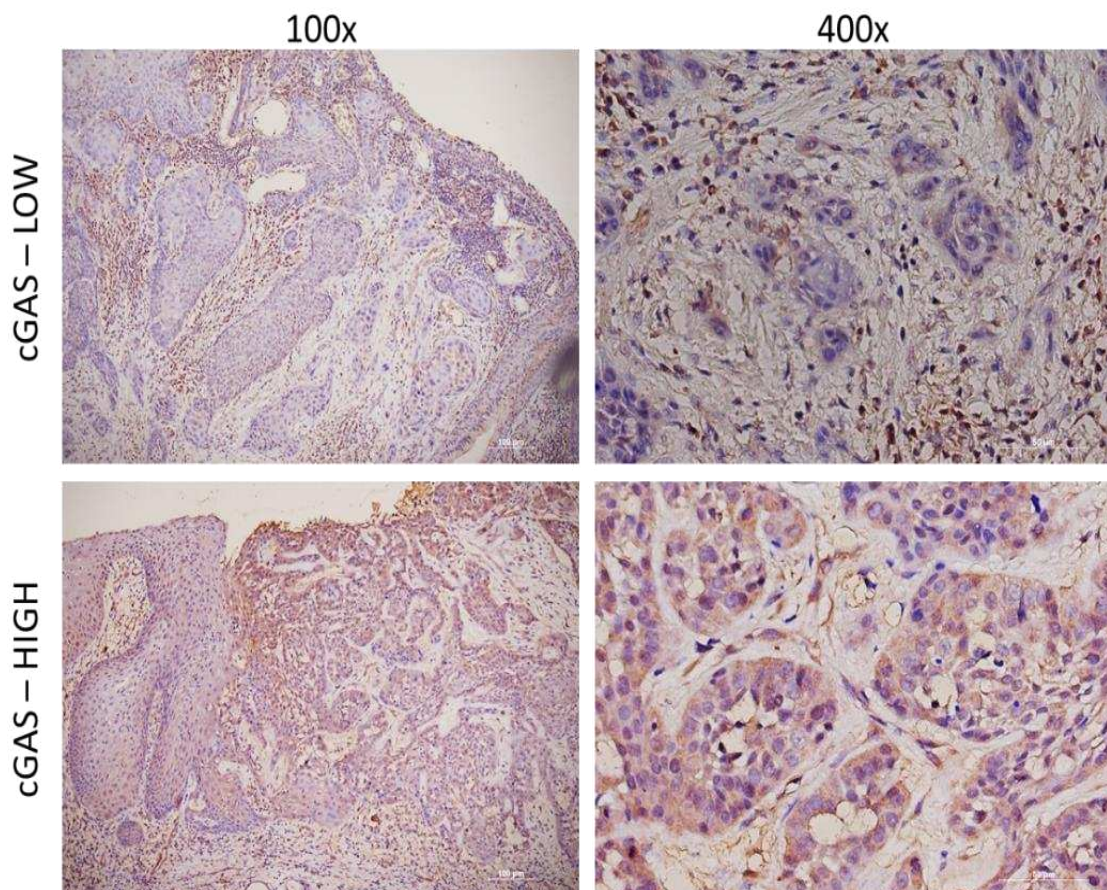
Imunohistokemijsku procjenu ekspresije proteina cGAS i STING provela su dva neovisna stručnjaka iz područja, koji nisu bili upućeni u dijagnozu i osobne podatke pacijenata. Polukvantitativna procjena razine ekspresije provedena je integracijom postotka i intenziteta imunološkog bojenja stanica raka, a zbog heterogenosti uzoraka kao minimalna razina obojenosti uzet je udio od 80 % tumorskih stanica. Intenzitet imunoreaktivnosti određen je prema osnovnom bojenju epitela i žljezdanog tkiva te je označen kao visok ili nizak, a zbog heterogenosti bojenja. Kod imunohistokemijske analize proteina STING čija je ekspresija rasla s porastom stadija bolesti, visokom ekspresijom je definirana obojenost tumora jednaka ili viša od obojenosti u zdravom tkivu (slika 8).



**Slika 8.** Reprezentativne slike imunohistokemijskog bojenja proteina STING s povećanjem od 100 puta (lijevo) i 400 puta (desno). Uzorci s niskom ekspresijom proteina STING prikazani su

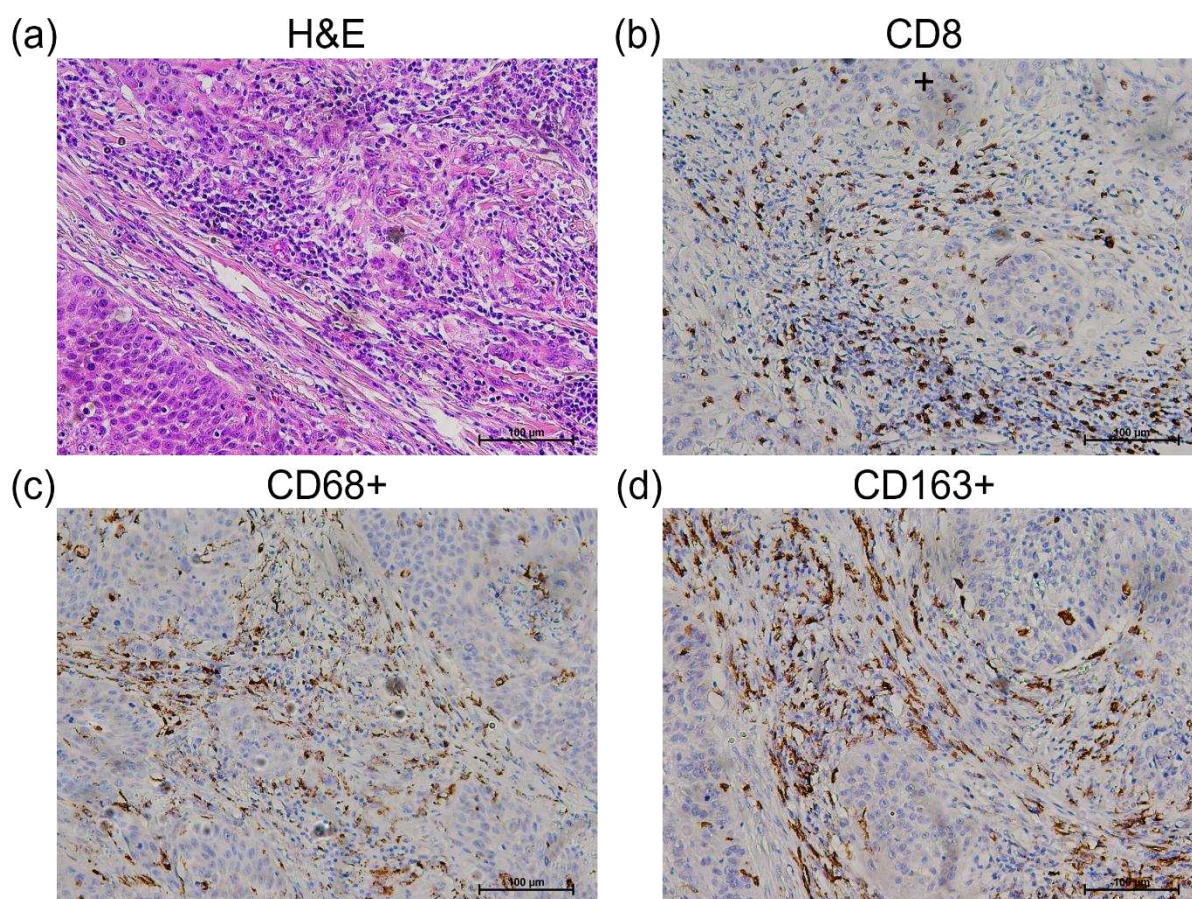
na gornjim slikama, a uzorci s visokom ekspresijom proteina STING na donjim slikama, pri povećanju od 100 i 400 puta.

Kod cGAS imunohistokemijske analize čija je ekspresija padala s porastom stadija bolesti, visokom ekspresijom je definirana obojenost tumora više od obojenosti u zdravom tkivu (slika 9).



**Slika 9.** Reprezentativne slike imunohistokemijskog bojenja proteina cGAS s povećanjem od 100 puta (lijevo) i 400 puta (desno). Uzorci s niskom ekspresijom proteina cGAS prikazani su na gornjim slikama, a uzorci s visokom ekspresijom proteina cGAS na donjim slikama, pri povećanju od 100 i 400 puta.

Za analizu relativne zastupljenosti imunoloških stanica u stromi tumora svi uzorci analizirani su bojenjem hematoksilinom i eozinom. Za procjenu CD8+, CD86+ i CD163+ imunoloških stanica, broj pozitivnih stanica izračunat je analizom imunohistokemijskog bojenja (slika 10).



**Slika 10.** Histološko hematoksilin i eozin bojenje (a) i imunohistokemijsko bojenje s protutijelima anti-CD8, anti-CD68 i anti-CD 163 (b-d). Reprezentativne slike upalnog infiltrata (hematoksilin i eozin) (a), CD8+ (b), CD68+ (c) i CD163+ (d) imunoloških stanica (povećanje od 200 puta).

Svaki uzorak je pregledan pri malom povećanju (40x), a područje s najvećim brojem pozitivno obojenih stanica u stromi, odabrano je za daljnju analizu. Svaki uzorak sadržavao je najmanje 50 CD8+, CD68+ ili CD163+ pozitivno obojenih stanica. Semikvantitativna analiza (0, +, ++, +++) vrućih točaka (engl. *hot spots*) provedena je pri velikom povećanju (400x). Prisutnost manje od 50 imunoloških stanica po vidnom polju definirana je kao nepostojanje zastupljenosti upalnog infiltrata ili CD8+, CD86+ i CD163+ imunoloških stanica u stromi tumora (0), dok je nizak broj stanica definiran kao zastupljenost do 100 stanica (+). Srednji broj stanica definiran je kao zastupljenost do 300 stanica (++) , a visok broj stanica kao zastupljenost više od 300 stanica (+++).

### 3.6 Statistički postupci

Kategoričke varijable prikazane su kao brojevi i postoci, dok su dob pacijenata, vrijeme praćenja i ukupno preživljenje (OS) predstavljeni kao medijan s interkvartilnim rasponima (IQR). Za testiranje neovisnosti dviju ili više kategoričkih varijabli korišteni su Fisherov test i chi-kvadrat ( $\chi^2$ ) test. Povezanosti između kategoričkih varijabli izračunate su pomoću Spearmanovog koeficijenta korelacije. Dodatno, višestruka logistička regresija korištena je za modeliranje vjerojatnosti povećane ekspresije proteina STING s uznapređovalim stadijem karcinoma grkljana. Kaplan-Meierova metoda i log-rank test su korišteni u analizi ishoda ukupnog preživljenja i preživljenja bez znakova bolesti u odnosu na sve analizirane varijable. Utjecaj ispitivanih varijabli na ukupno preživljenje i preživljenje bez znakova bolesti analizirani su Coxovom uninominalnom i multinominalnom analizom. Za sve navedene testove statistička značajnost je definirana kao  $p < 0,05$ . Podaci su analizirani i grafički prikazani pomoću programa „GraphPad Prism“ (verzija 9.5.1., La Jolla, CA, SAD).

## 4 REZULTATI RADA

### 4.1 Epidemiološka analiza

U razdoblju od 1. siječnja 2015. do 31. prosinca 2018. godine u Klinici za onkologiju i radioterapiju je liječen 91 pacijent koji je zadovoljio uključujuće kriterije ovog istraživanja za epidemiološku analizu. Kliničko-patološke karakteristike pacijenata uključenih u epidemiološku analizu, kao i modaliteti provedenog liječenja prikazani su u tablici 3.

**Tablica 3.** Kliničko-patološke karakteristike i modaliteti provedenog liječenja.

<b>Karakteristike</b>	<b>Ukupno, N = 91(%)</b>
<b>Dob, godine (IQR)</b>	65,0 (59,0 - 74,0)
<70	61 (67,1)
≥70	30 (32,9)
<b>Spol</b>	
Muški	85 (93,4)
Ženski	6 (6,6)
<b>Primarno sijelo tumora</b>	
Supraglotis	17 (18,7)
Glottis	72 (79,1)
Subglottis	2 (2,2)
<b>Transglotično širenje tumora</b>	
Da	27 (29,7)
Ne	64 (70,3)
<b>Stadij bolesti</b>	
I	26 (28,6)
II	15 (16,5)
III	28 (30,7)
IV	22 (24,2)
<b>T stadij bolesti</b>	
T1	26 (28,6)
T2	22 (24,2)
T3	34 (37,3)
T4	9 (9,9)
<b>N stadij bolesti</b>	

Nx, N0	66 (72,5)
N1	6 (6,6)
N2	17 (18,7)
N3	2 (2,2)
<b>Stupanj diferencijacije tumora</b>	
G1	29 (31,9)
G2	53 (58,2)
G3	8 (8,9)
<b>Lokalni povrat bolesti</b>	
Da	4 (4,4)
Ne	87 (95,6)
<b>Udaljena diseminacija bolesti</b>	
Da	5 (5,5)
Ne	86 (94,5)
<b>Novi primarni tumor</b>	
Da	21 (23,1)
Ne	70 (76,9)
<b>Ukupno preživljenje (OS)</b>	
Da	58 (63,7)
Ne	33 (36,3)
<b>Preživljenje bez znakova bolesti (DFS)</b>	
Da	54 (59,3)
Ne	37 (40,7)
<b>Petogodišnje preživljenje</b>	
Da	63 (69,2)
Ne	28 (30,8)
<b>Liječenje</b>	
Kirurški zahvat	58 (63,7)
Radioterapija + kirurški zahvat	3 (3,3)
Radioterapija	26 (28,6)
Kemoradioterapija	4 (4,4)
N = 58 (%)	



---

**Adjuvantno liječenje**

Bez adjuvantnog liječenja	21 (36,2)
Radioterapija	33 (56,9)
Kemoradioterapija	4 (6,9)

---

Medijan praćenja iznosio je 60,5 mjeseci (37,5 – 71,0 mjesec), a medijan životne dobi 65 godina. Dijagnoza karcinoma grkljana postavljena je u 67,1 % pacijenata prije 70. godine, a više od 93 % činili su muškarci. Primarno sijelo karcinoma larinksa bilo je najčešće u području glotisa, i to kod 72 (79,1 %) pacijenta. Kod 17 (18,7 %) pacijenata primarno sijelo je bilo u području supraglotisa, a kod samo dva (2,2 %) u subglotičnoj regiji. Od toga je kod 27 pacijenata (29,7 %) tumor zahvatio sva tri anatomski područja grkljana (transglotično širenje). Stadij III bolesti je najčešće utvrđen pri dijagnozi (28 pacijenata, 30,7 %), a nakon njega po učestalosti je stadij I bolesti (26 pacijenata, 28,6 %). Trideset četiri (37,3 %) pacijenta su imala T3, a 26 (28,6 %) T1 primarni tumor. Kod 25 (27,5 %) pacijenata je pri dijagnozi utvrđena diseminacija u regionalne limfne čvorove, i to kod 17 (18,7 %) njih N2, a šest (6,6 %) N1 bolest. Najčešće je bio zastupljen srednji stupanj diferencijacije (53 pacijenta, 58,2 %), dok je dobro diferencirani karcinom zabilježen kod 29 (31,9 %) pacijenata. Lokalni povrat bolesti razvio se kod četvero (4,4 %), a udaljena diseminacija bolesti kod petero (5,5 %) pacijenata. Novi primarni tumor dijagnosticiran je kod 21 (23,1 %) pacijenta. Najčešće utvrđeno novo primarno sijelo bio je karcinom pluća (9 pacijenata, 42,8 %). Druga sijela bila su: karcinom debelog crijeva (3 pacijenta), karcinom prostate (2 pacijenta), karcinom jezika (2 pacijenta) te karcinom mokraćnog mjehura, papilarni karcinom štitnjače, karcinom dojke, želuca, melanom, multipli mijelom i Ne-Hodgkinov limfom (po jedan pacijent). Dva pacijenta su u tijeku praćenja imala utvrđena po dva nova primarna tumora (jedan karcinom jezika i pluća, a drugi Non-Hodgkinov limfom i karcinom pluća).

Do trenutka završetka analize 58 (63,7 %) pacijenata je bilo živo, a 33 (36,3 %) ih je preminulo. U trenutku analize nisu bili dosegnuti ni medijan ukupnog (OS) ni petogodišnjeg preživljenja, a medijan preživljenja bez znakova bolesti (DFS) iznosio je 7 godina (slika 11).



**Slika 11.** Ukupno preživljenje (OS), preživljenje bez znakova bolesti (DFS) i petogodišnje preživljenje.

Pedeset osam (63,7 %) pacijenata primarno je liječeno kirurški, a troje (3,3 %) pacijenata je liječeno kirurški nakon primarne radioterapije zbog prisutnosti ostatne bolesti. Nakon kirurškog zahvata kod 33 (56,9 %) pacijenata je provedena adjuvantna radioterapija, a kod njih četvero (6,9 %) adjuvantna kemoradioterapija. Primarnom radioterapijom liječeno je 30 (32,9 %) pacijenata, a kemoradioterapijom četvero (4,4 %).

Analizirali smo ukupno preživljenje (OS) i preživljenja bez znakova bolesti (DFS) s obzirom na varijable koje se odnose na karakteristike pacijenata (dob, spol), karakteristike tumora (mjesto primarnog tumora, postojanje transglotičnog širenja, stupanj diferencijacije tumora T, N i stadij bolesti, limfovaskularna i perineuralna invazija) te pojavu lokalnog povrata bolesti, udaljene diseminacije i novog primarnog tumora, kao i provedeno liječenje.

Rezultati Coxove uninominalne analize za ukupno preživljenje (OS) i preživljenje bez znakova bolesti (DFS) prikazani su u tablici 4, a Kaplan-Meierove krivulje prikazane su na slici 12 i 13.

**Tablica 4.** Coxova uninominalna analiza čimbenika rizika.

Karakterisitike	Ukupno preživljenje (OS)			Preživljenje bez znakova bolesti (DFS)		
	HR	CI 95%	<i>p</i> vrijednost	HR	CI 95%	<i>p</i> vrijednost
<b>Dob</b>						
<70	1			1		
≥70	1,939	0,921-4,081	0,0526	1,586	0,785-3,203	0,1619

<b>Spol</b>						
Muški	1			1		
Ženski	0,339	0,092- 1,257	0,1057	0,436	0,1122- 1,697	0,3979
<b>Primarno sijelo tumora</b>						
Supraglotis i subglotis	1			1		
Glotis	0,438	0,180- 1,066	<b>0,0214</b>	0,673	0,263- 1,724	0,3410
<b>Transglotično širenje tumora</b>						
Da	1			1		
Ne	0,833	0,394- 1,762	0,6205	0,9918	0,489- 2,010	0,9818
<b>Stadij bolesti</b>						
I-II	1			1		
III-IV	2,145	1,083- 4,245	<b>0,0384</b>	2,032	1,067- 3,872	<b>0,0384</b>
<b>T</b>						
T1-T2	1			1		
T3-T4	1,432	0,722- 2,841	0,2177	1,447	0,757- 2,766	0,2587
<b>N</b>						
Nx, N0-N1	1			1		
N2-N3	5,220	1,939- 14,05	<b>&lt;0,0001</b>	4,949	1,918- 12,77	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Stupanj diferencijacije tumora</b>						
G1	1			1		
G2-G3	1,314	0,619- 2,790	0,4997	1,27	0,622- 2,596	0,5301
<b>Primarno liječenje</b>						
Kirurško	1			1		
OPP	1,605	0,756- 3,410	0,1789	1,309	0,645- 2,657	0,4322

**Adjuvantno liječenje**

Da	1			1		
Ne	1,121	0,439- 2,857	0,8052	1,215	0,519- 2,843	0,6390

---

**Lokoregionalni povrat bolesti**

Da	1			-		
Ne	2,900	0,668- 12,58	0,1551	-	-	-

---

**Udaljena diseminacija bolesti**

Da	1			-		
Ne	0,352	0,053- 2,312	0,0698	-	-	-

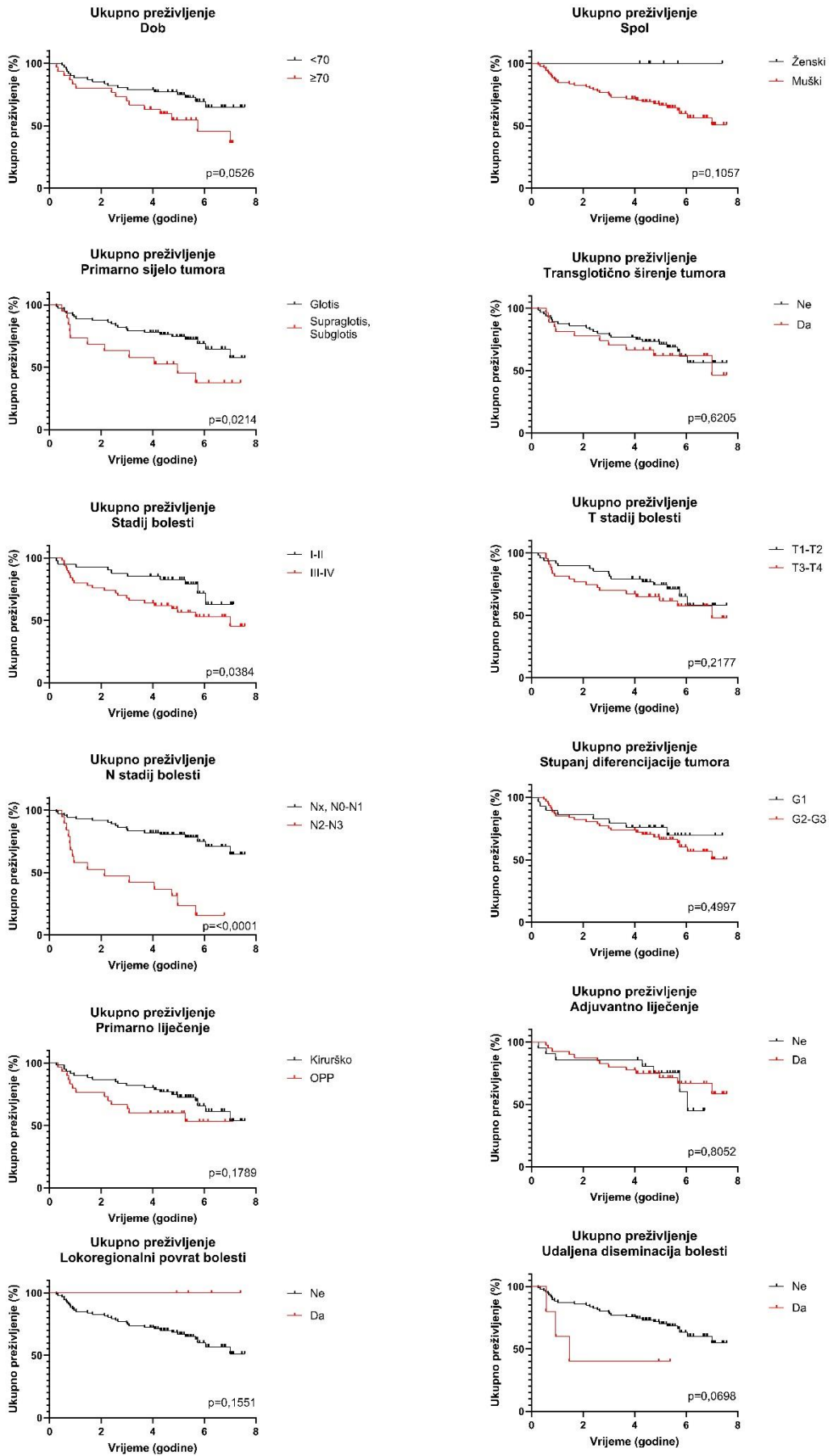
---

**Novi primarni tumor**

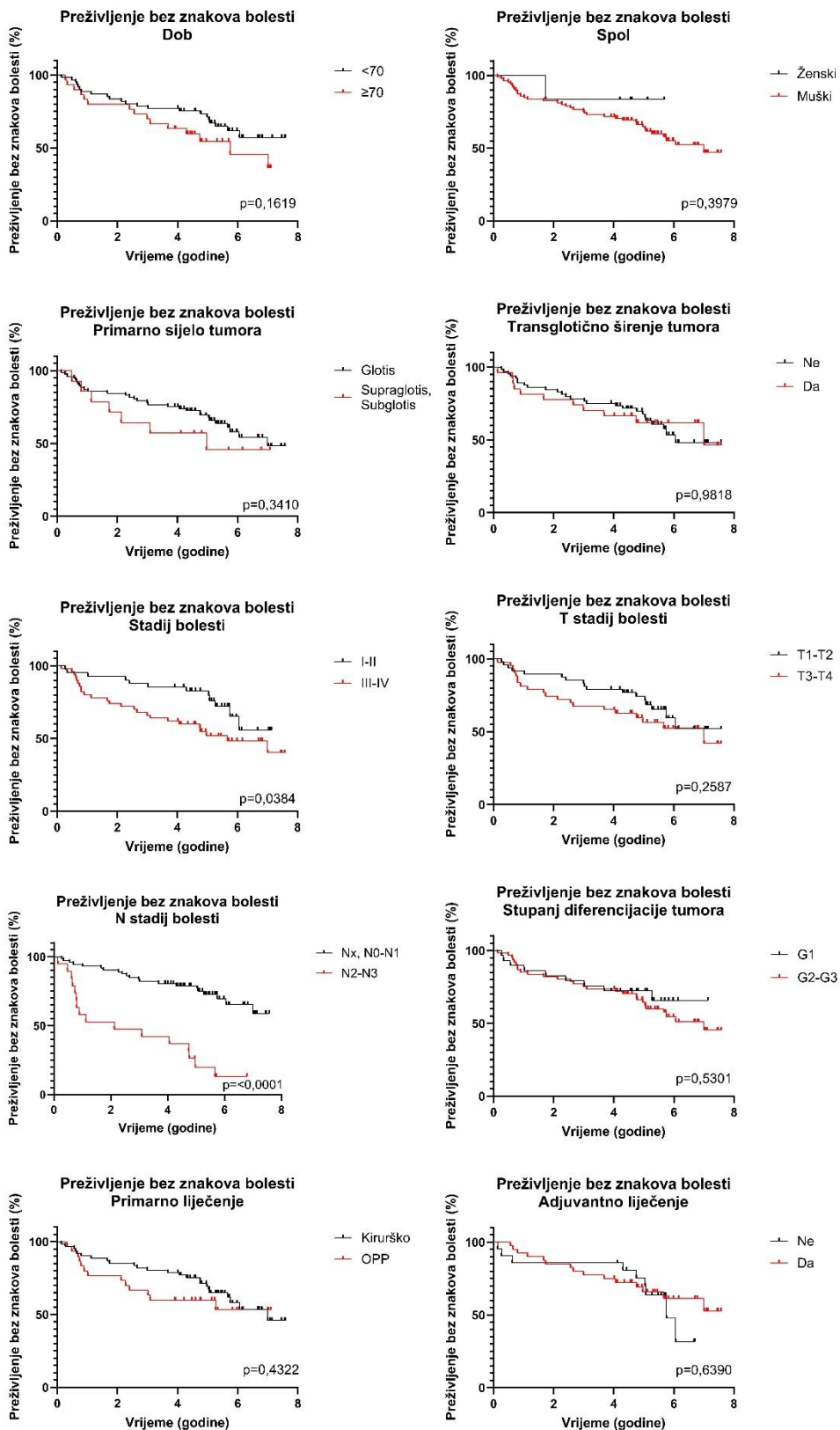
Da	1			1		
Ne	0,806	0,359- 1,809	0,5804	0,7904	0,366- 1,707	0,5232

---

OPP (engl. *organ preservation protocol*) protokol očuvanja organa primarnom radioterapijom ili kemoradioterapijom



Slika 12. Kaplan-Meirova krivulja ukupnog preživljenja u odnosu na čimbenike rizika.



**Slika 13.** Kaplan-Meirova krivulja preživljenja bez znakova bolesti u odnosu na čimbenike rizika.

Mjesto primarnog tumora, stadij bolesti, kao i status limfnih čvorova utjecali su na ukupno preživljenje (OS). Coxovom uninominalnom analizom je pokazano da pacijenti s karcinomom područja glotisa imaju statistički značajno višu vjerojatnost ukupnog preživljenja (OS), za 2,3 puta ( $p=0,0214$ ), u odnosu na pacijente sa supraglotičnim i subglotičnim karcinomima. Statistički je značajno viša vjerojatnost smrti za 5,2 puta ( $p<0,0001$ ) i povrata bolesti za 4,9 puta ( $p<0,0001$ ) u pacijenata sa zahvaćenim limfnim čvorovima (N2 i N3). Pacijenti s uznapredovalim stadijima bolesti (stadij III i IV) imaju statistički značajno višu vjerojatnost smrti za 2,1 puta ( $p=0,0384$ ) i povrata bolesti za 2,0 puta ( $p=0,0384$ ).

Multinomialnom Coxovom analizom ispitali smo ukupno preživljenje (OS) i preživljenja bez znakova bolesti (DFS) u odnosu na dob pacijenata i karakteristike tumora (mjesto primarnog tumora, postojanje transglotičnog širenja, stupanj diferencijacije tumora T, N i stadij bolesti).

Rezultati te analize prikazani su tablicama 5 i 6.

**Tablica 5.** Multinomialna Coxova analiza ukupnog preživljenja (OS) u odnosu na dob pacijenata i karakteristike tumora.

<b>Ukupno preživljenje (OS)</b>			
<b>Karakteristike</b>	<b>HR</b>	<b>CI 95%</b>	<b><i>p</i> vrijednost</b>
<b>Dob</b>			
<70	1		
≥70	2,109	0,974 - 4,508	0,0543
<b>Primarno sjelo tumora</b>			
Supraglotis, subglotis	1		
Glotis	0,998	0,394 - 2,615	0,9964
<b>Transglotično širenje tumora</b>			
Da	1		
Ne	0,807	0,309 - 2,136	0,6618
<b>Stadij bolesti</b>			
I-II	1		
III-IV	1,080	0,191 - 5,290	0,9271
<b>T stadij bolesti</b>			
T1-T2	1		
T3-T4	0,948	0,321 - 3,262	0,9265
<b>N stadij bolesti</b>			
Nx, N0-N1	1		
N2-N3	7,016	2,456 - 21,56	<b>0,0004</b>
<b>Stupanj diferencijacije tumora</b>			
G1	1		
G2 i G3	0,593	0,222 - 1,612	0,2932

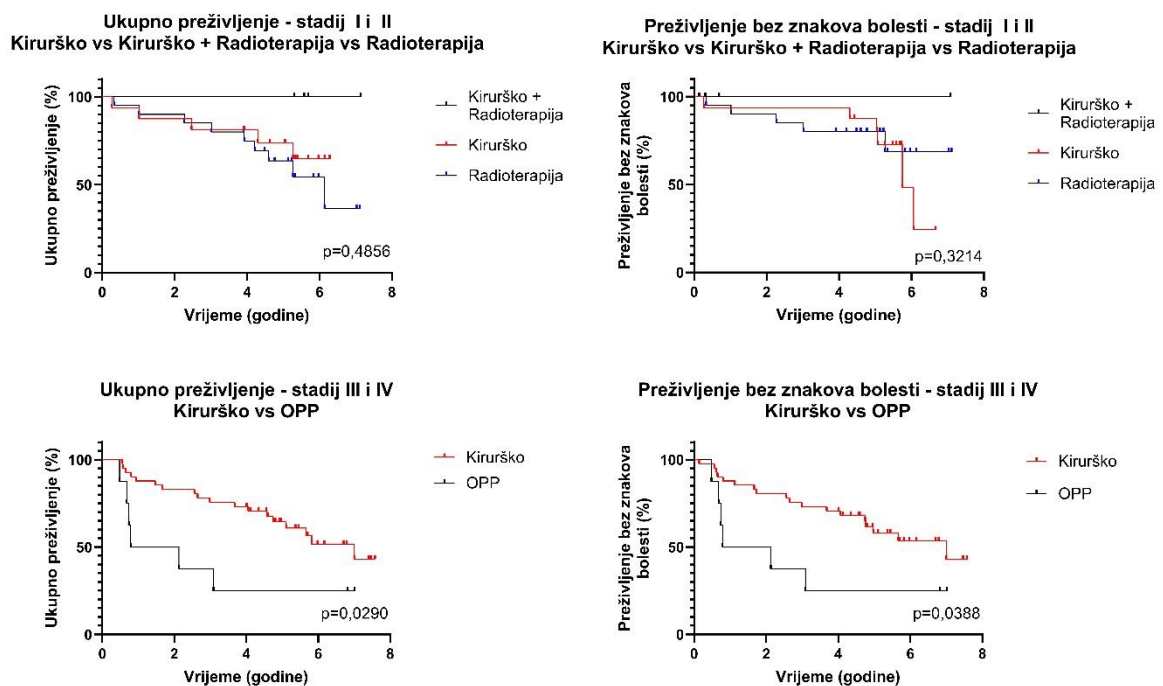


**Tablica 6.** Multinomialna Coxova analiza preživljenja bez znakova bolesti (DFS) u odnosu na dob pacijenata i karakteristike tumora.

<b>Preživljenje bez znakova bolesti (DFS)</b>			
<b>Karakteristike</b>	<b>HR</b>	<b>CI 95%</b>	<b><i>p</i> vrijednost</b>
<b>Dob</b>			
<70	1		
≥70	1,628	0,769 - 3,351	0,1910
<b>Primarno sijelo tumora</b>			
Supraglotis, subglotis	1		
Glotis	1,098	0,434 - 2,840	0,8447
<b>Transglotično širenje tumora</b>			
Da	1		
Ne	1,059	0,390 - 2,909	0,9099
<b>Stadij bolesti</b>			
I-II	1		
III-IV	1,289	0,256 - 5,381	0,7426
<b>T stadij bolesti</b>			
T1-T2	1		
T3-T4	0,837	0,296 - 2,809	0,7526
<b>N stadij bolesti</b>			
Nx, N0-N1	1		
N2-N3	5,302	1,976 - 14,97	<b>0,0011</b>
<b>Stupanj diferencijacije tumora</b>			
G1	1		
G2 i G3	1,119	0,520 - 2,534	0,7790

Nakon uzimanja u obzir svih navedenih varijabli, samo je N stadij neovisno statistički značajno utjecao na ukupno preživljenje (OS), uz 7,0 puta ( $p=0,0004$ ) viši rizik za smrt kod N2 i N3 bolesti. Slični su rezultati i za preživljenje bez znakova bolesti (DFS) gdje je samo N2 i N3 stadij bolesti, bez utjecaja drugih navedenih ispitivanih varijabli, bio neovisno statistički značajno povezan s preživljenjem bez znakova bolesti (DFS), uz 5,3 puta ( $p=0,0011$ ) viši rizik za pojavu bolesti.

Nadalje, analizirali smo utjecaj provedenog modaliteta liječenja po stadijima bolesti na ukupno preživljenje (OS) i preživljenje bez znakova bolesti (DFS). Na slici 14 su prikazani rezultati Coxove uninominalne analize.



**Slika 14.** Kaplan-Meirova krivulja ukupnog preživljenja (OS) i preživljenja bez znakova bolesti (DFS). Utjecaj provedenog modaliteta liječenja po stadijima bolesti na ishode.

Kod uznapredovalih stadija bolesti (stadij III i IV) kirurškim se liječenjem u odnosu na protokol očuvanja organa (radioterapija, kemoradioterapija) postiže statistički značajno dulje ukupno preživljenje (OS), kao i preživljenje bez znakova bolesti (DFS), dok ne postoji značajna razlika između primjene same radioterapije ili kemoradioterapije u pacijenata s ovim stadijima bolesti. Kod ranih stadija bolesti (stadij I i II) ne postoji statistički značajna razlika u ukupnom preživljenju (OS) ni preživljenju bez znakova bolesti (DFS), bez obzira na primijenjenu metodu liječenja.

## 4.2 Imunohistokemijska analiza ekspresije proteina STING i cGAS te infiltracije imunološkim stanicama

Analiza ekspresije proteina STING i cGAS te prisutnost imunološkog infiltrata provedena je pomoću imunohistokemijskog bojenja u uzorcima tumorskog tkiva pacijenata koji su liječeni kirurški. Kliničko-patološke karakteristike pacijenata uključenih u imunohistokemijske analize prikazane su u tablici 7.

**Tablica 7.** Kliničko-patološke karakteristike i modaliteti provedenog liječenja pacijenata uključenih u imunohistokemijske analize.

Karakteristike	Ukupno, N = 59 (%)
<b>Dob, godine (IQR)</b>	65.0 (58.0–71.0)
<70	42 (71,2)
≥70	17 (28,8)
<b>Spol</b>	
Muški	56 (94,9)
Ženski	3 (5,1)
<b>Primarno sjelo tumora</b>	
Supraglotis	11 (18,6)
Glottis	46 (78,0)
Subglottis	2 (3,4)
<b>Transglotično širenje tumora</b>	
Da	22 (37,3)
Ne	37 (62,7)
<b>Stadij bolesti</b>	
I	11 (18,6)
II	9 (15,3)
III	27 (45,8)
IV	12 (20,3)
<b>pT stadij bolesti</b>	
T1	11 (18,7)
T2	12 (20,3)
T3	31 (52,5)
T4	5 (8,5)

<b>pN stadij bolesti</b>	
Nx, N0	43 (72,9)
N1	5 (8,5)
N2	10 (16,9)
N3	1 (1,7)
<hr/>	
<b>Stupanj diferencijacije tumora</b>	
G1	16 (27,1)
G2	37 (62,7)
G3	6 (10,2)
<hr/>	
<b>Limfovaskularna invazija</b>	
Da	15 (25,4)
Ne	44 (74,6)
<hr/>	
<b>Perineuralna invazija</b>	
Da	7 (11,9)
Ne	52 (88,1)
<hr/>	
<b>Udaljena diseminacija bolesti</b>	
Da	4 (6,8)
Ne	55 (93,2)
<hr/>	
<b>Ukupno preživljenje (OS)</b>	
Da	41 (60,5)
Ne	18 (30,5)
<hr/>	

Medijan praćenja za ovih 59 pacijenata iznosio je 64 (49 - 73) mjeseca, medijan životne dobi pri dijagnozi 65 godina. Većina pacijenata bili su muškarci (94,9 %), a više od 70 % ih je bilo mlađe od 70 godina. Primarno sijelo karcinoma larinksa bilo je najčešće u području glotisa, i to kod 46 (78,0 %) pacijenta. Kod 11 (18,6 %) pacijenata primarno sijelo je bilo u području supraglotisa, a kod dva (3,4 %) u subglotičnoj regiji. Od toga je kod 22 pacijenata (37,3 %) tumor zahvatio sva tri anatomski područja grkljana (transglotično širenje).

Kod 16 (27,1 %) pacijenata utvrđen je dobro diferencirani karcinom, kod njih 37 (62,7 %) srednje diferencirani, a kod šest (10,2 %) slabo diferencirani karcinom. Kod 16 (27,1 %) pacijenata su pronađene metastaze u limfnim čvorovima u kirurškom uzorku, a od toga je pet (8,5 %) pacijenata imalo patološki N1, a 10 pacijenata (16,9 %) N2 stadij bolesti. Trideset i šest (61,7 %) pacijenata je imalo uznapredovali stadij bolesti (stadij III i IV) pri dijagnozi. Petnaest

(25,4 %) pacijenata je imalo potvrđenu limfovaskularnu, a sedam (11,9 %) perineuralnu invaziju. Lokalni povrat bolesti, kao i udaljena diseminacija, zabilježeni su kod po četiri (6,8 %) pacijenta. Drugi primarni zloćudni tumor dijagnosticiran je kod 14 (23,7 %) pacijenata u tijeku kliničkog praćenja. U trenutku analize podataka medijan ukupnog preživljenja (OS) za ovu skupinu pacijenata nije dosegnut, a medijan preživljenja bez znakova bolesti (DFS) je iznosio 7 godina (84 mjeseca). Od 59 pacijenata, u trenutku analize podataka, 41 (69,5 %) pacijent je bio živ, a 18 (30,5 %) ih je preminulo.

Učinjena je imunohistokemijska analiza ekspresije proteina STING i cGAS u tumorskom tkivu svih 59 pacijenata. Rezultati imunohistokemijske analize ekspresije proteina STING i cGAS u tumorskom tkivu pacijenata prikazani su na slikama 8 i 9 i u tablici 8.

**Tablica 8.** Imunohistokemijska analiza ekspresije proteina STING i cGAS.

Ekspresija proteina		Pacijenti, N = 59	%
<b>STING</b>	Niska	33	55.9
	Visoka	26	44.1
<b>cGAS</b>	Niska	37	62.7
	Visoka	22	37.3

Kliničko-patološke karakteristike pacijenata s visokom i niskom ekspresijom proteina STING prikazane su u tablici 9.

**Tablica 9.** Kliničko-patološke karakteristike pacijenata s visokom i niskom ekspresijom proteina STING.

Karakteristike	STING – niska ekspresija N = 33 (%)	STING – visoka ekspresija N = 26 (%)	<i>p</i> vrijednost
<b>Dob</b>			
<b>Godine (IQR)</b>	64,5 (56,5–70,25)	65,0 (58,0–71,5)	
<70	22 (66,7)	20 (76,9)	0,5636 §
≥70	11 (33,3)	6 (23,1)	
<b>Spol</b>			
Muški	31 (93,9)	25 (96,1)	>0,9999 §
Ženski	2 (6,1)	1 (3,9)	
<b>Primarno sijelo tumora</b>			
Supraglotis	4 (12,1)	7 (26,9)	0,3341 ‡
Glottis	28 (84,9)	18 (69,2)	
Subglottis	1 (3,0)	1 (3,9)	
<b>Transglotično širenje tumora</b>			
Da	10 (30,3)	12 (46,2)	0,2805 §
Ne	23 (69,7)	14 (53,8)	
<b>Stadij bolesti</b>			
I	8 (24,2)	3 (11,5)	<b>0,0139 ‡</b>
II	7 (21,2)	2 (7,7)	
III	16 (48,5)	11 (42,3)	
IV	2 (6,1)	10 (38,5)	
<b>pT stadij bolesti</b>			
T1	8 (24,2)	3 (11,45)	0,0952 ‡
T2	9 (27,3)	3 (11,45)	
T3	15 (45,5)	16 (61,5)	
T4	1 (3,0)	4 (15,4)	
<b>pN stadij bolesti</b>			
Nx, N0	28 (84,8)	15 (57,7)	<b>0,0458 ‡</b>
N1	3 (9,1)	2 (7,7)	
N2	2 (12,1)	8 (30,7)	

N3	0 (0,0)	1 (3,9)	
<b>Stupanj diferencijacije tumora</b>			
G1	13 (39,4)	3 (11,45)	
G2	17 (51,5)	20 (76,9)	0,0566 ‡
G3	3 (9,1)	3 (11,45)	
<b>Limfovaskularna invazija (LVI)</b>			
Da	5 (15,2)	10 (38,5)	
Ne	28 (84,8)	16 (61,5)	0,0693 §
<b>Perineuralna invazija (PNI)</b>			
Da	5 (15,6)	2 (8,3)	
Ne	28 (84,4)	24 (91,7)	0,4490 §
<b>Ekspresija proteina cGAS</b>			
Niska	21 (63,6)	16 (61,5)	
Visoka	12 (30,4)	10 (38,5)	0,4317 §
<b>Ukupno preživljenje</b>			
Da	27 (81,8)	14 (53,8)	
Ne	6 (18,2)	12 (46,2)	<b>0,0258 §</b>

§ Fisherov egzaktni test, ‡ Chi-kvadrat test.

Povišena ekspresija proteina STING u tumorskim stanicama pozitivno je korelirala s uznapređovalim stadijem bolesti (stadij III i IV) i patološki pozitivnim limfnim čvorovima (pN+) u bivarijantnoj analizi (Chi-kvadrat test,  $p=0,0139$ ,  $p=0,0458$ ). Zbog male veličine uzorka korišten je Fisherov egzaktni test za usporedbu ekspresije proteina STING u tumorskim stanicama s klinički značajno uznapređovalim stadijima karcinoma grkljana, stadij IV naspram stadija I do III, i primarnim tumorima patološkog stadija T3 i T4 (pT3 i pT4) naspram stadija T1 i T2 (pT1 i pT2). Osim toga, uspoređena je intrinzična ekspresija proteina STING u pacijenata s metastazama u regionalnim limfnim čvorovima (pN+) u odnosu na one s negativnim limfnim čvorovima (pN0). Potvrđena je pozitivna korelacija nemetastatskog stadija IV karcinoma grkljana, primarnog tumora patološkog stadija T3 i T4 (pT3 i pT4), kao i metastaza u regionalne limfne čvorove (pN+) s povišenom intrinzičnom ekspresijom proteina STING, u tumorskim stanicama (Fisherov egzaktni test,  $p=0,0031$ ,  $p=0,0336$ ,  $p=0,0371$ ).

Uspoređena je i intrinzična ekspresija proteina STING slabije diferenciranih tumora (G2 i G3) u odnosu na dobro diferencirane (G1). Utvrđena je pozitivna korelacija između slabije diferenciranih (G2 i G3) karcinoma grkljana s povišenom ekspresijom proteina STING u tumorskim stanicama (Fisherov egzaktni test,  $p=0,0204$ ).

Povišena ekspresija proteina STING statistički je značajno korelirala samo s uznapredovalim stadijem bolesti (nemetastatski stadij IV) u modelu višestruke logističke regresije ( $\beta=1,849$ ,  $SE=\pm 0,8643$ ,  $p=0,0324$ ), a nakon uzimanja u obzir i čimbenika rizika poput dobi, spola, primarnog sijela tumora i ekspresije proteina cGAS.

Kako pacijenti s uznapredovalim stadijem karcinoma grkljana imaju kraće ukupno preživljenje (OS), visoka ekspresija proteina STING bila je u korelaciji s nižim ukupnim preživljenjem (OS) (Fisherov egzaktni test,  $p=0,0258$ ).

Pacijenti kojima je primarno sijelo bio glotis imali su značajno nižu ekspresiju proteina STING (Fisherov egzaktni test,  $p=0,0337$ ) od pacijenata sa supraglotičnim, subglotičnim ili transglotičnim karcinomima. Od 11 pacijenata sa supraglotičnim i dva pacijenta sa subglotičnim karcinomima, samo je jedan imao stadij II, dok su ostali imali uznapredovale stadije (stadij III i IV) bolesti. Nasuprot tome, 19 od 46 pacijenata s primarnim karcinomima glotisa imalo je stadiji I i II, a preostali uznapredovale stadije bolesti. Statistički značajno veći broj pacijenata s primarnim sijelom u glotisu imao je stadij I i II bolesti, kao i patološki stadij primarnog tumora jedna i dva (pT1 i pT2), a bez prisutnih metastaza u limfnim čvorovima vrata (pN0), uz negativnu limfovaskularnu i perineuralnu invaziju (Fisherov egzaktni test,  $p=0,0099$ ,  $p=0,0431$ ,  $p=0,0034$ ,  $p=0,0033$ ,  $p=0,0317$ ). Utvrđena je umjerena negativna korelacija između karcinoma područja glotisa naspram stadija bolesti, patološkog stadija limfnih čvorova (pN) i limfovaskularne invazije (Spearman  $R=-0,29$ ,  $R=-0,35$ ,  $R=-0,47$ ,  $R=-0,35$ ; a  $p=0,024$ ,  $p=0,007$ ,  $p=0,0003$ ,  $p=0,008$ ).

Imunohistokemijski je analizirana i ekspresija proteina cGAS u tumorskom tkivu ovih 59 pacijenata. Dvadeset i dva uzoraka su imala pojačano bojenje, tj. ekspresiju proteina cGAS u tumorskim stanicama, u usporedbi sa zdravim okolnim tkivom, istog uzorka. Međutim, povišena ekspresija proteina cGAS nije bila u korelaciji s kliničko-patološkim karakteristikama ili ekspresijom proteina STING (tablica 10).



**Tablica 10.** Kliničko-patološke karakteristike pacijenata s niskom i visokom ekspresijom proteina cGAS.

<b>Karakteristike</b>	<b>cGAS – niska ekspresija N = 33 (%)</b>	<b>cGAS – visoka ekspresija N = 26 (%)</b>	<b><i>p</i> vrijednost</b>
<b>Dob</b>			
<b>Godine (IQR)</b>	66,0 (61,0-73,5)	61,5 (55,0-65,7)	
<70	24 (64,9)	18 (81,8)	0,2369 <sup>§</sup>
≥70	13 (35,1)	4 (18,2)	
<b>Spol</b>			
Muški	35 (94,6)	21 (95,5)	>0,9999 <sup>§</sup>
Ženski	2 (5,4)	1 (4,5)	
<b>Primarno sijelo tumora</b>			
Supraglotis	8 (21,6)	3 (13,6)	0,7129 <sup>‡</sup>
Glottis	28 (75,7)	18 (81,8)	
Subglottis	1 (2,7)	1 (4,6)	
<b>Transglotično širenje tumora</b>			
Da	15 (40,5)	7 (31,8)	0,5845 <sup>§</sup>
Ne	22 (59,5)	15 (68,2)	
<b>Stadij bolesti</b>			
I	5 (13,5)	6 (27,3)	0,5020 <sup>‡</sup>
II	7 (18,9)	2 (9,1)	
III	17 (46,0)	10 (45,5)	
IV	8 (21,6)	4 (18,2)	
<b>pT stadij bolesti</b>			
T1	5 (13,5)	6 (27,3)	0,5251 <sup>‡</sup>
T2	9 (24,3)	3 (13,6)	
T3	20 (54,1)	11 (50,0)	
T4	3 (8,1)	2 (9,1)	
<b>pN stadij bolesti</b>			
Nx, N0	27 (73,0)	16 (72,8)	0,5882 <sup>‡</sup>
N1	3 (8,1)	2 (9,1)	
N2	7 (18,9)	3 (13,6)	

N3	0 (0,0)	1 (4,5)	
<b>Stupanj diferencijacije</b>			
<b>tumora</b>			
G1	13 (35,1)	3 (13,6)	
G2	19 (51,4)	18 (81,8)	0,0644‡
G3	5 (13,5)	1 (4,5)	
<b>Limfovaskularna invazija</b>			
<b>(LVI)</b>			
Da	5 (27,0)	5 (22,7)	
Ne	32 (73,0)	17 (77,3)	0,7673§
<b>Perineuralna invazija (PNI)</b>			
Da	5 (15,6)	2 (9,1)	
Ne	32 (84,4)	20 (90,9)	0,7019§
<b>Ekspresija proteina cGAS</b>			
Niska	21 (56,8)	12 (54,5)	
Visoka	16 (43,2)	10 (45,5)	0,4317§
<b>Ukupno preživljenje</b>			
Da	27 (73,0)	14 (63,6)	
Ne	10 (27,0)	8 (36,4)	0,5614§

§ Fisherov egzaktni test, ‡ Chi-kvadrat test.

Histološka analiza pokazala je obilnu infiltraciju imunološkim stanicama u tumorskom mikrookolišu svih 59 uzoraka. Imunološke stanice uglavnom su imale prisutnu visoku ekspresiju proteina STING, s više od 50 % pozitivnih stanica u svim uzorcima, bez obzira na njegovu razinu ekspresije u tumorskim stanicama (slika 8). Uzorci su dodatno imunohistokemijski obojeni na CD8+ T stanice te CD68+ i CD163+ makrofage. U skladu s histološkom analizom, svi su uzorci imali više od 50 pozitivnih CD8+, CD68 i CD163+ stanica u žarišnim točkama (engl. *hot spots*) po polju, pri povećanju od 400 puta, što se smatra visokom infiltracijom imunološkim stanicama (Slika 10). Daljnja kvantifikacija imunoloških stanica nije otkrila značajnu razliku u sastavu imunoloških stanica u tumorskom mikrookolišu naspram niske ili visoke ekspresije proteina STING-a ili cGAS-a (tablica 11 i 12).

**Tablica 11.** Prisutnost imunoloških stanica u uzorcima s visokom i niskom ekspresijom proteina STING.

Karakteristike	STING – niska STING – visoka		<i>P</i> vrijednost
	ekspresija N = 33 (%)	ekspresija N = 26 (%)	
<b>Upalni infiltrat</b>	0	0 (0)	0,7778‡
	+	11 (33,3)	
	++	16 (48,3)	
	+++	6 (18,2)	
<b>CD8+ T limfociti</b>	0	0 (0)	0,5029‡
	+	5 (15,2)	
	++	19 (57,6)	
	+++	9 (27,3)	
<b>CD68+ makrofagi</b>	0	0 (0)	0,1154‡
	+	2 (6,1)	
	++	24 (72,7)	
	+++	7 (21,2)	
<b>CD163+ makrofagi</b>	0	0 (0)	0,3810‡
	+	4 (12,1)	
	++	18 (54,6)	
	+++	11 (33,3)	

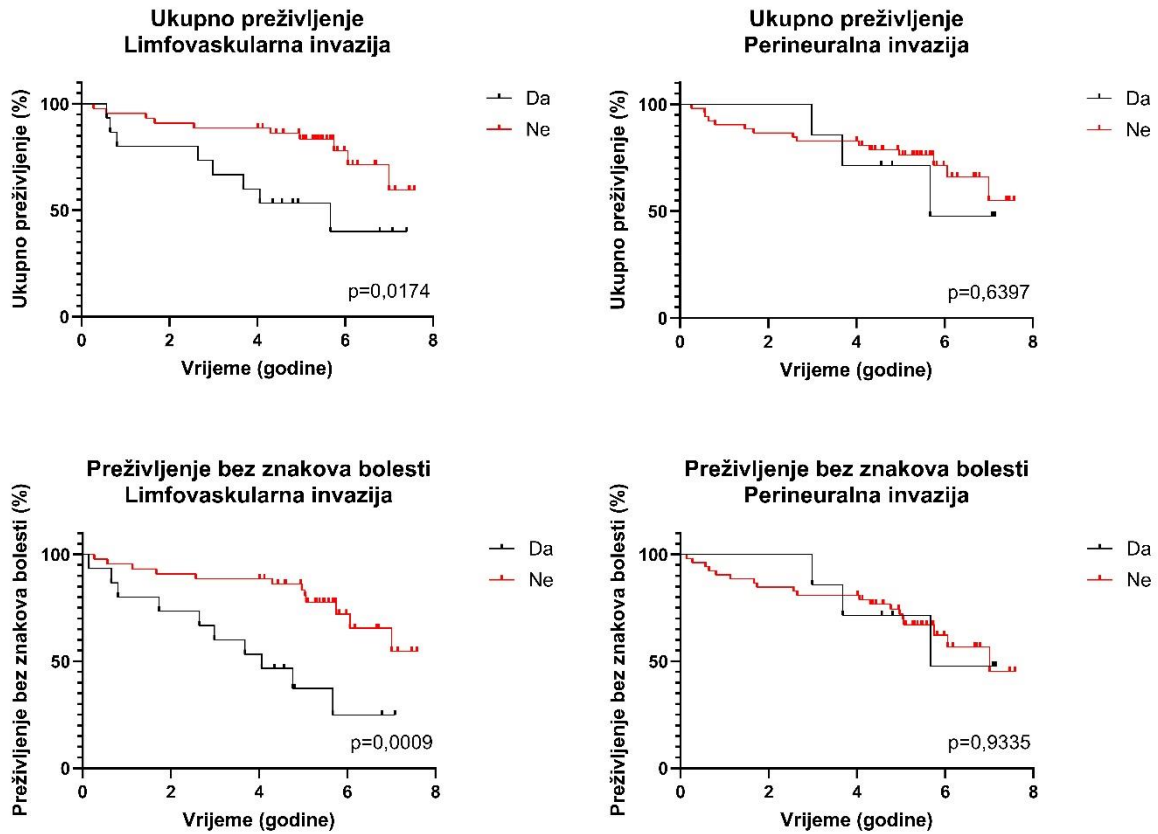
+ nizak, ++ srednji, +++ visoki broj stanica. ‡ Chi-kvadrat test.

**Tablica 12.** Prisutnost imunoloških stanica u uzorcima s visokom i niskom ekspresijom proteina cGAS.

Karakteristike		cGAS – niska	cGAS – visoka	<i>P</i> vrijednost
		ekspresija N = 37 (%)	ekspresija N = 22 (%)	
<b>Upalni infiltrat</b>	0	0 (0)	0 (0)	0,2819‡
	+	16 (43,3)	6 (27,3)	
	++	14 (37,8)	13 (59,1)	
	+++	7 (18,9)	3 (13,6)	
<b>CD8+ T limfociti</b>	0	0 (0)	0 (0)	0,4634‡
	+	6 (16,2)	4 (18,2)	
	++	21 (56,8)	9 (40,9)	
	+++	10 (27,0)	9 (40,9)	
<b>CD68+ makrofagi</b>	0	0 (0)	0 (0)	0,1419‡
	+	4 (10,8)	1 (4,5)	
	++	25 (67,6)	11 (50)	
	+++	8 (21,6)	10 (45,5)	
<b>CD163+ makrofagi</b>	0	0 (0)	0 (0)	0,5607‡
	+	7 (18,9)	2 (9,1)	
	++	18 (48,7)	11 (0,5)	
	+++	12 (32,4)	9 (40,9)	

+ nizak, ++ srednji, +++ visoki broj stanica. ‡ Chi-kvadrat test.

U tumorskom tkivu pacijenta koji su liječeni kirurški odredili smo postojanje limfovaskularne (LVI) i perineuralne invazije (PNI). Analiza ukupnog preživljenja (OS) i preživljenja bez znakova bolesti (DFS) za navedene čimbenike rizika pokazala je statistički značajno višu vjerojatnost smrti ( $p=0,0174$ ) i povrata bolesti ( $p=0,0009$ ) u pacijenata s prisutnom limfovaskularnom invazijom u tumorskom tkivu (slika 15).



**Slika 15.** Kaplan-Meirova krivulja ukupnog preživljenja i preživljenja bez znakova bolesti u odnosu na limfovaskularnu i perineuralnu invaziju.

## 5 RASPRAVA

Karcinomi grkljana predstavljaju značajan medicinski, socijalni i javno-zdravstveni problem u svijetu. Osim činjenice da se radi o malignoj bolesti, sama lokalizacija tumora i utjecaj na funkcije disanja, gutanja i govora, kao i mutilirajuće posljedice liječenja, daju dodatnu težinu ovoj bolesti. Posljedice liječenja često znače gubitak mogućnosti govora, poremećaje gutanja, uz oštećenja sluznice i vezivnih tkiva, brigu o traheostomi, kao i znatan estetski defekt koji predstavlja snažan psiho-socijalni teret za pacijenta, ali i sustav.

Stope incidencije karcinoma glave i vrata, kao i karcinoma larinksa, koji se nalazi na drugom mjestu po učestalosti nakon karcinoma usne šupljine, općenito su u porastu na globalnoj razini [1]. One se za karcinome larinksa značajno razlikuju među različitim geografskim regijama, ali i u demografskim obilježjima pojedinih populacija. Češće se javljaju kod muškaraca, a učestalost raste s dobi. Postoji jasna povezanost sa životnim navikama, prije svega pušenjem i konzumacijom alkohola. Više stope incidencije zabilježene su u populaciji nižeg socio-ekonomskog statusa [199]. Unatoč razvoju programa prevencije, suvremenih dijagnostičkih metoda i napretku u svim modalitetima liječenja, u zemljama s visokim socio-demografskim indeksom i dalje su najviše stope incidencije karcinoma grkljana. Ipak, za ukupne dobno-standardizirane stope incidencije zabilježen je najviši pad upravo u ovim zemljama u tijeku vremena, dok je u području Istočne Azije, Oceanije i na Karibima zabilježen značajan porast [200]. Zadnjih 30 godina porastao je broj smrti uzorkovanih karcinomom grkljana, ali se bilježi pad dobno-standardizirane stope mortaliteta od 1,62 % na godišnjoj razini u istom vremenskom razdoblju [1,200]. Statističke analize SEER baze podataka pokazuju smanjenje petogodišnjeg preživljenja sa 66 % na 61,6 % u razdoblju od 1975. do 2019. godine [101,201]. Navedeno se u literaturi pojašnjava učestalijom primjenom protokola očuvanja organa (radioterapija, kemoradioterapija) naspram kirurških zahvata. Različita istraživanja pokazala su nekonzistentnu povezanost stope mortaliteta karcinoma grkljana s različitim čimbenicima rizika, što dodatno otežava konkretne zaključke. Potrebna su daljnja preciznija istraživanja faktora koji utječu na odgovor na terapiju i prognozu, tj. stope preživljenja [202].

Epidemiološke analize karcinoma područja glave i vrata, tako i grkljana, uglavnom su oskudnije u odnosu na podatke dostupne za učestalija sijela, poput karcinoma dojke, pluća ili prostate. Navedeno je moguće posljedica relativno niskih stopa incidencije i mortaliteta, od oko 4,5 %, na globalnoj razini [1]. Isto tako, dodatni problem je i relativno slabija suradljivost ovih pacijenata, posebno nakon završetka liječenja, tijekom perioda praćenja, što se može povezati s njihovim životnim navikama, ali i socio-ekonomskim obilježjima. Zbog navedenog se i u

opsežnijim registrima značajan dio pacijenata gubi iz praćenja, što utječe na kvalitetu dostupnih podataka. Kako bi se potencijalno povećala kvaliteta epidemioloških i kliničkih podataka bilo bi poželjno uvesti dodatne parametre poput anamnestičkih podataka o čimbenicima rizika i socio-ekonomskom statusu, kao i distribuciji bolesti po stadijima, a u korelaciji s kliničkim ishodima. Svakako bi bilo važno u epidemiološke studije karcinom grkljana uključiti i raspodjelu prema histološkom podtipu i anatomskom mjestu primarnog sijela (glotis, supraglotis, subglotis), a zbog razlika ne samo u kliničkoj slici, već i biološkom ponašanju bolesti i prognozi. Osim klasičnih epidemioloških podataka, u ove se analize sve više uključuju i istraživanja o utjecaju na kvalitetu života te opterećenju troškovima koje dijagnoza karcinoma grkljana donosi za zdravstveni sustav.

Zadnjih je desetljeća došlo do napretka u spoznajama o razlikama u biološkim, etiološkim i histološkim obilježjima, načinu liječenja i prognozi ovih karcinoma. Produbljivanje epidemioloških podataka ključno je za razvoj i poboljšanje svih čimbenika uključenih u dijagnostiku, liječenje i tercijarnu prevenciju, kao i potencijalni razvoj programa ranog otkrivanja karcinoma grkljana. Za mogući napredak u prevenciji, ranijem otkrivanju i liječenju karcinoma larinksa, potrebno je pažnju posvetiti i prosvjećenosti te edukaciji opće populacije, kao i populacije u riziku. Pravodobna i optimalna dijagnostika, posebno pravilna definicija kliničkog stadija bolesti, omogućila bi kvalitetniji odabir modaliteta liječenja i potencijalno poboljšala ishode. Osim poboljšanja parametara ishoda liječenja, time bi se omogućila i lakša rehabilitacija te reintegracija pacijenata u društvo.

Prema posljednjim epidemiološkim podacima, za Republiku Hrvatsku su dostupni podatci o ukupnom broju oboljelih i umrlih, a unatoč visokoj stopi učestalosti, ukupna je dobno-standardizirana stopa incidencije u padu na godišnjoj razini što je visoko vjerojatno posljedica smanjene prevalencije pušenja u periodu od 2003. do 2008. godine [1,203]. Razumijevanjem preciznih epidemioloških obrazaca stječemo znanja o čimbenicima rizika, karakteristikama populacije pacijenata terapijskim pristupima i uspjehu liječenja. Kako ne postoje detaljniji epidemiološki podatci za Republiku Hrvatsku, ukupno, a ni po županijama, odlučili smo provesti retrospektivnu analizu epidemioloških parametara, kliničko – patoloških karakteristika oboljelih i tumora, načina i ishoda liječenja na populaciji pacijenata liječenih u Klinici za onkologiju i radioterapiju KBC-a Split. U ovu analizu uključen je ukupno 91 pacijent, a više od 90 % su bili muškarci, što je i očekivano prema dostupnim podacima iz literature. Medijan praćenja iznosio je oko pet godina, a medijan dobi pri dijagnozi 65 godina starosti. Prema dostupnim epidemiološkim analizama učestalost karcinoma grkljana doseže vrhunac nakon

dobi od 65 godina, na temelju čega bi se potencijalno moglo zaključiti da je populacija pacijenata obuhvaćena ovim istraživanjem relativno mlađa u odnosu na globalnu. Navedeno možemo smatrati očekivanim zbog visoke prevalencije pušenja, gdje je Republika Hrvatska prema europskim statistikama na samom vrhu [204]. U retrospektivnoj analizi iz Rumunjske, također je zabilježena populacija pacijenata mlađa od globalne, uz više od 70 % slučajeva uznapredovale bolesti pri dijagnozi, što odgovara epidemiološkoj slici i rizičnim faktorima karakterističnim za ovu regiju Europe [205]. Prema podacima iz literature, muškarci imaju statistički značajno više stope incidencije i mortaliteta, što odgovara i rezultatima našeg istraživanja. Zadnjih desetljeća zabilježeno je smanjenje razlike incidencije među spolovima što je vjerojatno posljedica promjena u životnom stilu, pri čemu prevalencija pušenja cigareta i uzimanja alkohola značajno raste kod žena [206]. Na temelju podataka iz literature, pušenje cigareta i uzimanje alkohola povezani su sa 60 % i 30 % ukupne smrtnosti od karcinoma grkljana [17]. Zbog manjkavosti u dokumentaciji, za našu populaciju pacijenata nije bilo moguće prikupiti podatke o faktorima rizika, pušenju cigareta i uzimanju alkohola. Prema retrospektivnoj analizi na više od 1000 pacijenata s područja sjeverne Grčke, u trenutku dijagnoze 87 % pacijenata bili su pušači, a 43 % je svakodnevno koristilo alkohol [207]. U našoj populaciji pacijenata je, za razliku od najučestalije dijagnosticiranih dobro diferenciranih karcinoma na globalnoj razini, na prvom mjestu sa 60 % zastupljenosti bio srednje diferencirani karcinom pločastih stanica. Slične je rezultate pokazala i talijanska studija koja je obuhvatila pacijente s uznapredovalim stadijima bolesti (stadij III i IV) koji su liječeni primarno kirurški. U oko 55 % slučajeva utvrđen je srednje diferencirani karcinom grkljana. Oko 40 % pacijenata je dijagnosticirano s karcinomom glotisa, a oko 30 % transglotisa i supraglotisa. Gotovo 60 % pacijenata imalo je metastaze u regionalne limfne čvorove pri dijagnozi, a 44 % ih je liječeno adjuvantnom radioterapijom te 10 % kemoradioterapijom [208]. Nasuprot tome, prema novijim podacima SEER baze od 2013. do 2019. godine, 50 % pacijenata u SAD-u se dijagnosticira u stadiju I bolesti, a nešto manje od 30 % u stadiju II, što ukazuje na učinkovitost uvedenih mjera zdravstvene zaštite u smislu prevencije pušenja i uzimanja alkohola, kao i napretku u dijagnostici i ranom otkrivanju bolesti. Ipak, gotovo kod gotovo 60 % ove populacije pacijenata nije poznat točan stadij bolesti [16]. Iako se populacije pacijenata ne mogu izravno usporediti, u našem je istraživanju trećina pacijenata imala stadij I, a trećina stadij III bolesti pri dijagnozi. Oko 20 % pacijenata imalo je nemetastatski stadij IV (IVA i IVB stadij) bolesti pri dijagnozi. U uznapredovalim stadijima (stadij III i IV) bolesti dijagnosticirano je oko 50 % pacijenata. Prema TNM klasifikaciji pri dijagnozi je oko 50 % pacijenata imalo stadij primarnog tumora T3 i T4, a oko 30 % njih metastaze u regionalne limfne čvorove, najčešće stadija N2, u oko 19



% pacijenata. U skupini pacijenata obuhvaćenih ovim istraživanjem naspram podataka iz SEER baze, zabilježene su više stope uznapredovalih stadija bolesti, što je vjerojatno očekivano zbog neprosvijećenosti, prevalencije pušenja i uzimanja alkohola, kao i specifičnosti zahvaćene populacije i kasne dijagnoze bolesti. Nasuprot američkoj populaciji pacijenata, talijanska analiza pokazuje rezultate koji su potencijalno sličniji našim podacima, i po pitanju spola, dobi, stupnja diferencijacije i zastupljenosti primarnog sijela tumora, iako direktne usporedbe nisu moguće. Navedeno nije iznenađujuće zbog epidemioloških specifičnosti mediteranskog područja. Petogodišnje preživljenje za skupinu pacijenata obuhvaćenih SEER analizom od 2013. do 2019. godine iznosi 61,6 %, za sve stadije bolesti [16]. Naše istraživanje, koje je obuhvatilo pacijente sa svim stadijima osim inicijalno metastatske bolesti, pokazalo je stope petogodišnjeg preživljenja oko 70 %. Važno je uzeti u obzir činjenicu da je više od polovice pacijenata pri dijagnozi imalo uznapredovali stadij bolesti, stadij III i IV. Ovakav dobar rezultat bi se možda mogao promatrati i u kontekstu visokog postotka pacijenata liječenih primarno kirurški te potom adjuvantnom terapijom, a u sklopu ranijih podataka iz literature kojima se pad u petogodišnjem preživljenju potencijalno pripisuje sve češćoj primjeni protokola očuvanja larinksa. Karcinomi glotisa bili su najčešće zastupljeni, u oko 80 % naših pacijenata, dok je kod oko 20 % pacijenata primarno sijelo bio supraglotis. Kod populacije pacijenata obuhvaćene ovim istraživanjem zabilježena je nešto viša zastupljenost karcinoma glotisa nego u dostupnoj literaturi. Kod gotovo trećine pacijenata je utvrđeno transglotično širenje tumora, što je viši postotak u odnosu na svjetske epidemiološke podatke i vjerojatno posljedica činjenice da je u našoj populaciji više od polovice pacijenata imalo stadij III i IV pri dijagnozi. Prema rezultatima druge retrospektivne analize stopa recidiva za karcinome glotisa nakon 2 godine iznosila je 4 %, supraglotisa 16 %, a subglotisa 11 % [209]. Prema rezultatima naše analize lokalni povrat bolesti zabilježen je kod ukupno 4,5 %, udaljena diseminacija bolesti kod 5,5 %, a drugi primarni tumor kod čak 23 % pacijenata. Talijanska studija zabilježila je stopu lokoregionalnih recidiva od oko 18 %, a udaljene diseminacije bolesti i drugih primarnih tumora zajedno u oko 17 % pacijenata. Ipak, ovom su studijom obuhvaćeni samo uznapredovali stadiji bolesti [208]. U retrospektivnoj združenoj analizi pacijenata liječenih zbog karcinoma grkljana primarno kirurški u KBC-u Rijeka i bolnici u Beču, u kojoj je oko 63 % pacijenata bilo u uznapredovalim stadijima bolesti (stadij III i IV), povrat bolesti je bio zabilježen kod oko 18 %, a drugi primarni tumor kod oko 26 % pacijenata, što korelira s rezultatima naše analize [210]. Kod oko 64 % naših pacijenata provedeno je primarno kirurško liječenje, za razliku od spomenute populacije iz združene analize gdje je taj postotak iznosio oko 87 % [210]. Primarna radioterapija je provedena kod oko 30 % naših pacijenata, dok je 4 % pacijenata liječeno primarnom

kemoradioterapijom. Adjuvantna radioterapija provedena je kod oko 51 % pacijenata u gore spomenutoj združenoj analizi, a kod oko 36 % naših pacijenata [210]. Moglo bi se zaključiti da su rezultati združene analize sličniji našim podacima, što je očekivano s obzirom na to da se radi o populaciji iz iste regije, iako se ovakve populacije pacijenata ne mogu izravno uspoređivati. Prema rezultatima našeg istraživanja mjesto primarnog tumora, stadij bolesti i status limfnih čvorova značajno utječu na ukupno preživljenje. Kod uznapredovalih stadija bolesti (stadij III i IV) kirurškim se liječenjem u odnosu na protokol očuvanja organa postiglo značajno dulje ukupno preživljenje, kao i preživljenje bez znakova bolesti. Nakon uzimanja u obzir svih navedenih varijabli, samo je N stadij neovisno utjecao na ukupno preživljenje, uz 7 puta viši rizik od smrti kod N2 i N3 bolesti. Slični su rezultati pokazani i za preživljenje bez znakova bolesti. Uz sve navedene analize, pokazano je statistički značajno kraće ukupno preživljenje i viši rizik povrata bolesti u pacijenata s prisutnom limfovaskularnom invazijom u tumorskom tkivu. Nasuprot tome, u talijanskoj studiji pušenje je bilo jedina neovisna varijabla s utjecajem na petogodišnje preživljenje i za bolest specifično preživljenje. Nijedna ispitivana varijabla nije neovisno utjecala na preživljenje bez znakova bolesti [208]. Stavljajući rezultate našeg istraživanja u kontekst zapadnoeuropskih zemalja i SAD-a, oko 50 % naših pacijenata dijagnosticira se u uznapredovalim stadijima bolesti (stadij III i IV), a trećina ima prisutne metastaze u regionalnim limfnim čvorovima. Vjerojatno kao posljedica uznapredovalosti bolesti, primarno se kirurški liječilo više od 60 % ove populacije pacijenata, a adjuvantnom radioterapijom i kemoradioterapijom ukupno njih 40 %. Pokazana je relativno niska stopa lokalnog povrata, kao i udaljene diseminacije bolesti. Petogodišnje preživljenje je nešto više od zabilježenog u literaturi, unatoč uznapredovalim stadijima bolesti pri dijagnozi. Zabilježen je visok udio pacijenata s razvojem drugog primarnog tumora, najčešće raka pluća, što bi se potencijalno moglo objasniti rizičnim čimbenicima, poznavajući opće epidemiološke podatke o rizičnim faktorima za Republiku Hrvatsku [204]. Ograničenja ovog istraživanja uključuju retrospektivni dizajn, relativno mali broj pacijenata, kao i nedostatak podataka o čimbenicima rizika (pušenje cigareta, uzimanje alkohola). Potrebno je naglasiti da u analizu nisu uključeni pacijenti s inicijalno metastatskom bolesti, niti drugim patološkim podtipovima karcinoma grkljana osim klasičnog pločastih stanica. Zbog visokih stopa incidencije i mortaliteta, visoke zastupljenosti rizičnih faktora među općom populacijom, kao i relativno skromnih rezultata liječenja, bilo bi potrebno raditi na razvoju i poboljšanju svih čimbenika uključenih u dijagnostiku i liječenje bolesti, a posebno prevenciji i prosvjećenosti populacije. U kontekstu poboljšanja ishoda liječenja, unatoč promjeni paradigme koja se dogodila primjenom imunoterapije inhibitorima kontrolnih točaka u liječenju metastatskih karcinoma glave i vrata,

pa tako i karcinoma grkljana, i dalje imamo skromne rezultate po pitanju stope odgovora i ukupnog preživljenja. Slično je i kod nemetastatskih stadija, posebno lokoregionalno uznapredovale bolesti, zbog visoke stope povrata bolesti i diseminacije. U eri imunoterapije poseban naglasak se stavlja na važnost selekcije pacijenata. Posljedično, postoji značajna potreba za boljim razumijevanjem karcinoma grkljana na staničnoj i molekularnoj razini. Zato su današnja istraživanja usmjerena na proučavanje složenih imunoloških interakcija i njihovih promjena tijekom vremena, između samog tumora i domaćina, kako u tumorskom mikrookolišu, tako i na sustavnoj razini [211]. Njihov je cilj definirati nove prognostičke i prediktivne biomarkere, u metastatskim, ali i ranim stadijima bolesti. Uzimajući u obzir izraženu heterogenost tumora grkljana, njihovo imunosupresivno mikrookruženje i sposobnost izbjegavanja urođenog i prirođenog imunološkog nadzora, važno je proniknuti u potencijalno jedinstvene i specifične molekularne i imunološke mehanizme karcinoma grkljana. Upravo zato je cilj ovog istraživanja bio ispitati ekspresiju proteina STING i cGAS u tumorskim stanicama pacijenata s karcinomima grkljana TNM stadija I do IV, bez udaljenih metastaza. Istraživanje je provedeno na tumorskom tkivu 59 pacijenata koji su zadovoljili uključujuće kriterije za imunohistokemijsku analizu. Signalni put cGAS-STING ima važnu ulogu u aktivaciji urođenog, a kako može utjecati na diferencijaciju T limfocita, time i aktivaciji stečenog imunološkog odgovora [182,183]. Zbog značajne uloge u modulaciji mikrookoliša tumora i kontrole mehanizama oštećenja DNA, cGAS-STING signalni put je meta brojnih istraživanja [192–194,212,213]. Odnedavno se istražuje mogućnost manipulacije antitumorskom ulogom cGAS-STING signalnog puta u karcinomima glave i vrata, uz pomoć nove generacije lijekova usmjerenih na ovaj signalni put, poput STING agonista. Aktivnost cGAS-STING osi važna je za učinke cisplatine i radioterapije, koji dovode do oštećenja DNA, jer može utjecati na proizvodnju slobodnih radikala kisika, ali i za aktivnost PARP inhibitora [212]. Primjena STING agonista kao monoterapije, u kombinaciji s imunoterapijom ili drugim modalitetima liječenja koji dovode do oštećenja DNA, ispituje se u pretkliničkim i kliničkim studijama [193]. Analizom utišavanja pojedinačnih gena u ljudskom genomu metodom CRISPR-Cas9, STING se pokazao kao kritični intrinzični regulator odgovora tumorskih stanica na radioterapiju [192]. Primjena radioterapije i cisplatine ključna je ne samo u slučaju neresektibilnih stadija karcinoma grkljana, već i u ranijim stadijima bolesti s ciljem očuvanja organa. Unatoč relativno dobrom odgovoru, kod dijela se pacijenata razvije rezistencija na navedeno liječenje i posljedično progresija bolesti. Lokalni povrat bolesti ili udaljena diseminacija bolesti utvrđeni su kod osam pacijenata (14 %) uključenih u ovu analizu, što ukazuje na značajnu potrebu za boljom kontrolom bolesti. Upravu u tu svrhu ispituje se primjena STING agonista, s ciljem

poboljšanja odgovora na imunoterapiju. Pretraživanjem dostupne literature nije pronađena ni jedna studija koja je istraživala ekspresiju proteina STING u tumorskim stanicama karcinoma grkljana. Prethodno objavljene studije temeljene na TCGA (engl. *The Cancer Genome Atlas*) bazi podataka istraživale su ekspresiju gena STING u karcinomima glave i vrata na transkriptomskoj razini, ali bez razlike u utjecaju njegove intrinzične ekspresije specifične za tumorske stanice, i cGAS-STING aktivacije u imunološkim stanicama. Ova su istraživanja uključila cijelu populaciju karcinoma glave i vrata, bez razlike u odnosu prema primarnom sijelu tumora [192,212]. Osim toga, TCGA studije su pokazale da se ekspresija gena STING smanjuje s povećanjem stadija bolesti u pločastom karcinomu orofaringealnog područja. Navedeno je u skladu s prethodnim rezultatima u drugim tumorskim sijelima [187–191]. Rezultati našeg istraživanja jasno pokazuju povećanje intrinzične ekspresije proteina STING u tumorskim stanicama karcinoma grkljana s porastom stadija bolesti. Visoke razine ekspresije proteina STING evidentirane su u 10 od 12 pacijenata (83,3 %) sa stadijem IV nemetastatskog karcinoma larinksa. Osim toga, rezultati ovog istraživanja su pokazali obilan imunološki infiltrat u svim uzorcima tumorskog tkiva, što je u skladu s nedavnom TCGA studijom koja je pokazala vrlo gust i prilično konzistentan udio imunoloških stanica u uzorcima, bez obzira na mutacijsko opterećenje tumora. U TCGA uzorcima PD-L1 ekspresija bila je značajno viša u visokorizičnih pacijenata, što je definirano na temelju 6 gena vezanih uz mutacijsko opterećenje tumora [214]. Navedeni rezultati su u skladu s našim rezultatima, s obzirom na to da povećana ekspresija proteina STING u uznapredovalim stadijima bolesti može povisiti ekspresiju PD-L1 [215]. Kako je u svim našim uzorcima bila prisutna obilna infiltracija imunološkim stanicama s visokom ekspresijom proteina STING, transkriptomska analiza ne bi bila prikladna za razlikovanje visoke razine ekspresije ovog proteina u tumorskim stanicama u odnosu na imunološke. Zbog velike gustoće imunološkog infiltrata u svim uzorcima, specifična kvantifikacija, tj. razlika u udjelu pojedinih imunoloških stanica u mikrookolišu tumora, nije bila moguća na histološkim preparatima. Isto nije bilo moguće ni imunohistokemijskim bojenjem CD8<sup>+</sup> T limfocita te CD68<sup>+</sup> i CD163<sup>+</sup> makrofaga, koji su svi bili visoko zastupljeni u analiziranim uzorcima. Navedeno nije iznenađujuće u kontekstu dviju ranijih studija koje su pokazale da nema razlike u zastupljenosti ovih stanica u imunološkom infiltratu visokorizičnih i niskorizičnih pacijenata iz TCGA baze podataka. Infiltracija CD8<sup>+</sup> T limfocitima, CD68<sup>+</sup> i CD163<sup>+</sup> makrofagima ne korelira s visokim mutacijskim opterećenjem tumora i ekspresijom PD-L1, a također ni ne utječe na ishode [214,216]. Značajna razlika u udjelu različitih imunoloških stanica u karcinomima grkljana dokazana je za plazma, T pomagačke i T regulatorne limfocite u skupini niskog rizika te M0 makrofage u skupini visokog rizika

pacijenata iz TCGA baze podataka [214]. Osim toga, Han i suradnici su usporedili utjecaj infiltracije imunoloških stanica na ishode pacijenata s karcinomom grkljana. Od 22 istražene vrste stanica, visoka infiltracija M1 makrofaga, dendritičnih stanica i CD4+ T limfocita bila je povezana sa statistički značajnim produljenjem preživljenja [216]. Slično našim rezultatima za karcinom grkljana, ekspresija proteina STING nije bila u korelaciji s tumor-infiltrirajućim limfocitima u uzorcima svjetlostaničnog karcinoma bubrežnih stanica [217]. CSG-3 podtip metastatskog karcinoma mokraćnog mjehura koji ima visoku ekspresiju gena važnih za aktivaciju cGAS-STING signalnog puta, ima najvišu razinu tumor-infiltrirajućih leukocita te je posljedično povezan s duljim ukupnim preživljenjem primjenom imunoterapije [218]. Pozitivna korelacija između cGAS i STING RNA ekspresije pronađena je samo u tumorima podtipa CSG-3, koji imaju aktivan cGAS-STING signalni put, analizom TCGA baze podataka između različitih vrsta tumora [218]. Iako je u našim uzorcima karcinoma larinksa prisutan obilan imunološki infiltrat unutar tumora, nije bilo korelacije između ekspresije proteina STING i cGAS. Potrebne su stoga daljnje analize ekspresije gena pod utjecajem STING-cGAS signalnog puta kako bi se stekao uvid u funkcionalnu aktivnost tog puta u karcinomima grkljana. Bilo bi svakako značajno utvrditi radiokemosenzitivnost tumora s visokom ekspresijom proteina STING, kao i učinkovitost STING agonista kod tih tumora. Ukoliko je ekspresija proteina STING u tumorskim stanicama niska, tumor razvija otpornost na terapiju koja uzrokuje oštećenje DNA, što je važan problem u liječenju karcinoma larinksa [192]. Na temelju učinkovitosti u kliničkim studijama, primjenjuju se PARP inhibitori u liječenju pacijenata sa zametnim mutacijama u genu BRCA, uglavnom u karcinomima jajnika, prostate, gušterače i dojke [193,219,220]. Kao što je ranije dokazano, PARP inhibitori mogu modulirati imunološki odgovor kroz cGAS-STING signalni put, čak i u stanicama bez zametne mutacije u genu BRCA [221]. Aktivnost PARP inhibitora u kombinaciji s inhibitorima kontrolnih točaka, kemoterapijom i STING agonistima trenutno se istražuje u pretkliničkim i kliničkim studijama [193,222,223]. Karcinomi grkljana imaju veliko mutacijsko opterećenje, zbog čestih mutacija u genima koju su odgovorni za popravak DNA, a prema našim rezultatima pokazuju i povećanje ekspresije proteina STING u uznapredovalim stadijima bolesti. Kako je za učinkovitost STING agonista potrebna intrinzična aktivnost proteina STING, pacijenti s karcinomom grkljana potencijalno su dobri kandidat za primjenu PARP inhibitora i STING agonista. Navedena kombinacija potencijalno bi se mogla primijeniti, ne samo u metastatskim, već i lokoregionalno uznapredovalim stadijima bolesti, i to u kombinaciji s različitim, standardnim modalitetima liječenja (radioterapija, kemoterapija, imunoterapija), ali i u različitim fazama tijekom liječenja (primarno, neoadjuvantno i adjuvantno liječenje). U tijeku

su klinička ispitivanja koja istražuju učinkovitost primjene STING agonista uz imunoterapiju inhibitorima kontrolnih točaka i radioterapiju [193,222,223].

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da su stope lokalnog povrata, kao i udaljene diseminacije relativno niske unatoč činjenici što je većina pacijenata obuhvaćenih epidemiološkom analizom dijagnosticirana u uznapredovalim stadijima bolesti. S druge strane učestalost razvoja drugih primarnih tumora je relativno visoka. Također, imunohistokemijska analiza je pokazala da postoji povišena ekspresija proteina STING specifična za tumorske stanice u uzorcima tkiva karcinoma grkljana u uznapredovalim stadijima bolesti. Upravo je ovo ono što razlikuje karcinome grkljana od drugih zloćudnih tumora podrijetla glave i vrata, gdje je utvrđen pad ekspresije proteina STING s porastom stadija bolesti, a što bi moglo biti važno za razvoj i uvođenje novih terapijskih mogućnosti u liječenju ovih pacijenata. Za potvrdu navedenih rezultata svakako su potrebne daljnje prospektivne studije.

## 6 ZAKLJUČCI

1. Retrospektivna analiza epidemioloških podataka provedena je na populaciji pacijenata koji su dijagnosticirani, liječeni ili praćeni u KBC-u Split u razdoblju od 1. siječnja 2015. do 31. prosinca 2018. godine. Rezultati ove analizu su prikaz realne epidemiološke situacije, kao i modaliteta i ishoda liječenja u KBC-u Split.
2. Više od 90 % ispitanika bili su muškarci. Kod gotovo 80 % pacijenata dijagnosticiran je karcinom glotisa, a transglotično širenje tumora bilo je prisutno kod gotovo trećine pacijenata.
3. Oko 50 % pacijenata imalo je uznapredovali stadij (stadij III i IV) bolesti pri dijagnozi, a manje od trećine imalo je metastaze u limfne čvorove vrata. Više od 60 % pacijenata liječeno je primarno kirurški, a njih 60 % liječeno je potom adjuvantno.
4. Lokalni povrat bolesti zabilježen je kod 4,4 % pacijenata, udaljena diseminacija bolesti kod 5,5 % pacijenata, a čak 23,1 % pacijenata razvilo je drugi primarni tumor. Najčešće sijelo drugog primarnog tumora bio je rak pluća (42,8 %).
5. Mjesto primarnog tumora, stadij bolesti te zahvaćenost limfnih čvorova utjecali su na ukupno preživljenje (OS).
6. U odnosu na dob pacijenata i karakteristike tumora (mjesto primarnog tumora, postojanje transglotičnog širenja, stupanj diferencijacije tumora T, N i stadij bolesti), samo je N stadij neovisno statistički značajno utjecao na ukupno preživljenje (OS) i preživljenje bez znakova bolesti (DFS).
7. Kod uznapredovalih stadija bolesti (stadij III i IV) kirurškim se liječenjem u odnosu na protokol očuvanja organa (radioterapija, kemoradioterapija) postiglo statistički značajno dulje ukupno preživljenje (OS) te preživljenje bez znakova bolesti (DFS). Ne postoji značajna razlika između primjene same radioterapije ili kemoradioterapije u pacijenata s uznapredovalim stadijima bolesti.
8. U trenutku analize nije bio dosegnut medijan ukupnog (OS) ni petogodišnjeg preživljenja, dok je medijan preživljenja bez znakova bolesti (DFS) iznosio 7 godina.
9. Analiza ekspresije proteina STING i cGAS te prisutnosti imunološkog infiltrata provedena je imunohistokemijskim bojenjem uzoraka tumorskog tkiva 59 pacijenata koji su liječeni kirurški.

10. Povišena ekspresija proteina STING u tumorskim stanicama pozitivno je korelirala s uznapredovalim stadijem bolesti i patološki pozitivnim limfnim čvorovima (pN+) (Chi-kvadrat test,  $p=0,0139$ ,  $p=0,0458$ ).
11. Utvrđena je pozitivna korelacija između nemetastatskog stadija IV karcinoma grkljana, primarnog tumora patološkog stadija T3 i T4 (pT3 i pT4), kao i metastaza u regionalne limfne čvorove (pN+) s povišenom intrinzičnom ekspresijom proteina STING u tumorskim stanicama (Fisherov egzaktni test,  $p=0,0031$ ,  $p=0,0336$ ,  $p=0,0371$ ).
12. Utvrđena je pozitivna korelacija između slabije diferenciranih (G2 i G3) karcinoma grkljana s povišenom ekspresijom proteina STING u tumorskim stanicama (Fisherov egzaktni test,  $p=0,0204$ ).
13. Povišena ekspresija proteina STING statistički je značajno korelirala samo s uznapredovalim stadijem bolesti (nemetastatski stadij IV) u modelu višestruke logističke regresije ( $\beta=1,849$ ,  $SE=\pm 0,8643$ ,  $p=0,0324$ ) nakon uzimanja u obzir i čimbenika rizika poput dobi, spola, primarnog sijela tumora i ekspresije proteina cGAS.
14. S obzirom na to da pacijenti s uznapredovalim stadijem karcinoma grkljana imaju kraće ukupno preživljenje (OS), visoka ekspresija proteina STING bila je u korelaciji s nižim ukupnim preživljenjem (OS) (Fisherov egzaktni test,  $p=0,0258$ ).
15. Pacijenti kojima je primarno sijelo karcinoma bio glotis imali su značajno nižu ekspresiju proteina STING (Fisherov egzaktni test,  $p=0,0337$ ) od pacijenata sa supraglotičnim, subglotičnim ili transglotičnim karcinomima.
16. Statistički značajno veći broj pacijenata s primarnim sijelom karcinoma u glotisu imao je stadij I i II bolesti, kao i patološki stadij primarnog tumora jedna i dva (pT1 i pT2), a bez prisutnih metastaza u limfnim čvorovima vrata (pN0), uz negativnu limfovaskularnu i perineuralnu invaziju (Fisherov egzaktni test,  $p=0,0099$ ,  $p=0,0431$ ,  $p=0,0034$ ,  $p=0,0033$ ,  $p=0,0317$ ).
17. Utvrđena je umjerena negativna korelacija između karcinoma područja glotisa naspram stadija bolesti, patološkog stadija limfnih čvorova (pN) i limfovaskularne invazije (Spearman  $R=-0,29$ ,  $R=-0,35$ ,  $R=-0,47$ ,  $R=-0,35$ ; a  $p=0,024$ ,  $p=0,007$ ,  $p=0,0003$ ,  $p=0,008$ ).
18. Analiza ukupnog preživljenja (OS) i preživljenja bez znakova bolesti (DFS) pokazala je statistički značajno veću vjerojatnost smrti ( $p=0,0174$ ) i povrata bolesti ( $p=0,0009$ ) u pacijenata s prisutnom limfovaskularnom invazijom u tumorskom tkivu.



19. Histološka analiza pokazala je obilnu infiltraciju imunološkim stanicama u tumorskom mikrookolišu svih 59 uzoraka. Detaljna kvantifikacija imunoloških stanica nije otkrila značajnu razliku u sastavu imunoloških stanica u tumorskom mikrookolišu naspram niske ili visoke ekspresije proteina STING-a ili cGAS-a.

20. U trenutku analize podataka medijan ukupnog preživljenja (OS) za ovih 59 pacijenata također nije dosegnut, a medijan preživljenja bez znakova bolesti (DFS) je iznosio 7 godina (84 mjeseca).

## 7 SAŽETAK

Zbog relativno niske stope odgovora i skromnih ishoda primjene imunoterapije inhibitorima kontrolnih točaka u recidivirajućem ili metastatskom karcinomu grkljana, potrebna je bolja selekcija pacijenata, uz učinkovitije prediktivne i prognostičke biomarkere. Retrospektivna analiza epidemioloških podataka provedena je na populaciji pacijenata koji su prema uključujućim kriterijima dijagnosticirani, liječeni ili praćeni u KBC-u Split u razdoblju od 1. siječnja 2015. do 31. prosinca 2018. godine. Rezultati istraživanja na 91 pacijentu su pokazali visok udio pacijenata s primarnim sijelom područja glotisa (oko 80 %) te uznapredovalim stadijima (oko 50 %) bolesti pri dijagnozi koji su većinom liječeni kirurški (više od 60 %), nakon čega je kod oko 60 % pacijenata, a ovisno o faktorima rizika, provedena adjuvantna terapija. Stope povrata bolesti kao i udaljene diseminacije bile su niske (4,4 % i 5,5 %), za razliku od učestalosti pojave drugog primarnog tumora kod 23,1 % pacijenata. Mjesto primarnog tumora (glotis), stadij III i IV te N2 i N3 su značajno utjecali na ukupno preživljenje. Stadij N2 i N3 su neovisno značajno utjecali na ukupno preživljenje, uz 7,0 puta ( $p=0,0004$ ) viši rizik od smrti, kao i preživljenje bez znakova bolesti, uz 5,3 puta ( $p=0,0011$ ) viši rizik za pojavu bolesti. Kod uznapredovalih stadija bolesti (stadij III i IV) kirurškim se liječenjem u odnosu na protokol očuvanja organa postiglo značajno dulje ukupno preživljenje ( $p=0,0290$ ), kao i preživljenje bez znakova bolesti ( $p=0,0388$ ). Medijani petogodišnjeg kao i ukupnog preživljenja nisu dosegnuti. Medijan preživljenja bez znakova bolesti iznosio je 7 godina. Imunohistokemijska analiza ekspresije proteina STING, cGAS i imunološkog infiltrata provedena je na uzorcima tumorskog tkiva 59 pacijenata koji su liječeni kirurški. Povišena ekspresija proteina STING u tumorskim stanicama pozitivno je korelirala sa stadijem IV, pT3, pT4, pN+, kao i slabijim stupnjem diferencijacije tumora (G2 i G3). Povišena ekspresija proteina STING značajno je korelirala samo s nemetastatskim stadijem IV u modelu višestruke logističke regresije ( $\beta=1,849$ ,  $SE=\pm 0,8643$ ,  $p=0,0324$ ). Rezultati ovog istraživanja su pokazali da postoji povišena ekspresija proteina STING specifična za tumorske stanice u uzorcima tkiva karcinoma grkljana u uznapredovalim stadijima bolesti što razlikuje karcinome grkljana od drugih zloćudnih tumora podrijetla glave i vrata, a što bi moglo biti važno za razvoj i uvođenje novih terapijskih mogućnosti u liječenju ovih pacijenata.

## 8 SUMMARY

Doctoral dissertation title:

### **Elevated Tumor Cell-Intrinsic STING Expression in Advanced Laryngeal Cancer**

Due to the relatively low response rate and modest outcomes of immunotherapy targeting checkpoint inhibitors in recurrent or metastatic laryngeal cancer, we need more precise patient selection, along with more efficient predictive and prognostic biomarkers. A retrospective analysis of epidemiological data was conducted on the population of patients who were diagnosed, treated, or monitored at the University Hospital Split from January 1 2015, to December 31 2018. Total of 91 patients were included in the analysis. The results showed a high proportion of patients with primary lesions of the glottic area (approximately 80%) and advanced stages (approximately 50%) of the disease at diagnosis. In most cases, patients were treated surgically (> 60%). Approximately 60% of patients were treated adjuvantly, depending on the risk factors. The recurrence rates and dissemination of the disease rates were low (4.4% and 5.5%, respectively), in contrast to the occurrence of a second primary tumor in 23.1% of patients. The location of the primary tumor (glottis), stage of the disease (stages III and IV), and lymph node status (N2 and N3) had a statistically significant effect on overall survival. Only N stage independently had a significant effect on overall survival, with a 7.0-fold ( $p=0.0004$ ) higher risk of death in N2 and N3 disease, as well as disease-free survival, with a 5.3 times ( $p=0.0011$ ) higher risk of the disease recurrence. In advanced disease stages (stages III and IV), surgical treatment compared to the organ preservation protocol resulted in a significantly longer overall survival ( $p=0.0290$ ) as well as survival without signs of disease ( $p=0.0388$ ). Despite the advanced stage of the disease at diagnosis, the median five-year survival as well as overall survival were not reached. The median disease-free survival was 7 years. Fifty-nine tumor tissue samples from surgically treated patients were immunohistochemically stained for STING, cGAS expression, and immune infiltration. Elevated tumor cell-intrinsic STING expression was positively associated with stage IV, pT3, pT4, and pN+ laryngeal cancers, and with higher histological grades (G2 and G3). Elevated STING expression was significantly associated with stage IV cancer in a multiple logistic regression model ( $\beta=1.849$ ,  $SE=\pm 0.8643$ ,  $P=0.0324$ ). The results of this study showed that there is an elevated expression of the STING protein specific to tumor cells in tissue samples of laryngeal carcinoma in advanced stages of the disease, which distinguishes laryngeal carcinoma

from other malignant tumors of head and neck origin. This could be important for the development and introduction of new therapeutic options for treating these patients.

## 9 ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci:

**Ime i prezime:** Jelena Viculin, doktorica medicine, specijalistica radioterapije i onkologije

### Obrazovanje, akademski stupnjevi i radno iskustvo:

- 2015. – danas, Klinika za onkologiju i radioterapiju, KBC Split, specijalistica radioterapije i onkologije
- 2015. – danas, Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu, Katedra za kliničku onkologiju, asistent
- 2013. – 2015. Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, poslijediplomski studij „Klinička onkologija“
- 2010. – danas, Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu, Doktorski studij „Biologija novotvorina“
- 2010. – 2015. KBC Split, Klinika za onkologiju i radioterapiju, specijalizacija radioterapije i onkologije
- 2010. Dom zdravlja Šibenik, Hitna ambulanta
- 2009. – 2010. KBC Split, pripravnički staž
- 2002. – 2008. Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu, doktor medicine

### Područje užeg interesa:

- Tumori glave i vrata
- Tumori probavnog sustava
- Tumori pluća i medijastinuma

### **Članstva i funkcije u znanstvenim i strukovnim organizacijama:**

- Hrvatsko onkološko društvo
- Hrvatska liječnička komora
- Hrvatski liječnički zbor
- HUBOL

### **Radovi koji se citiraju u indeksnim publikacijama:**

1. **Viculin J**, Degoricija M, Vilović K, Gabela I, Franković L, Vrdoljak E, Korac Prlic J. Elevated Tumor Cell-intrinsic STING Expression in Advanced Laryngeal Cancer. *Cancers* (Basel). 2023 Jul 5;15(13):3510. doi: 10.3390/cancers15133510.
2. Kunac N, Degoricija M, **Viculin J**, Omerović J, Terzić J, Vilović K, Korac-Prlic J. Activation of cGAS-STING Pathway Is Associated with MSI-H Stage IV Colorectal Cancer. *Cancers* (Basel). 2022 Dec 30;15(1):221. doi: 10.3390/cancers15010221.
3. Ban M, **Viculin J**, Tomic S, Capkun V, Strikic A, Mise BP, Utrobicic I, Vrdoljak E. Retrospective analysis of efficacy of trastuzumab in adjuvant treatment of HER 2 positive early breast cancer - single institution experience. *Neoplasma*. 2016;63(5):761-7. doi: 10.4149/neo\_2016\_513

### **Publicirani radovi u ostalim časopisima:**

1. Vrdoljak E, Bošković L, Petrić Miše B, Boraska Jelavić T, **Viculin J**, Strikić A, Ban M. News in oncological treatment. *Medix*, 2012.(100)179-187.

### **Sudjelovanje u pisanju medicinskih knjiga:**

1. Vrdoljak E, Belac Lovasić I, Kusić Z, Gugić D, Juretić A i sur. *Klinička Onkologija*. Medicinska naklada, Zagreb, 2018.
2. Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Gugić D, Krajina Z i sur. *Klinička Onkologija*. Medicinska naklada, Zagreb, 2013.

### **Kongresni sažetci:**

1. **Viculín J.** Targeted therapy of metastatic colorectal cancer. Libri oncologici: Croatian Journal of Oncology, 2023., Hrvatski onkološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem, 2023.
2. Bišof V, Katić A, Soče M, Vidović M, **Viculín J**, Vrdoljak E, Pleština S. Real world survival outcomes in advanced gastric and esophagogastric adenocarcinoma – a retrospective analysis from University Hospital Centres Zagreb and Split. Libri oncologici: Croatian Journal of Oncology, 2023., Hrvatski onkološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem, 2023.
3. Bošković L, Hrepić D, Boban M, Boraska Jelavić T, **Viculín J**, Vrdoljak E. Durvalumab in the treatment of stage III NSCLC – single centre experience. Lib Oncol. 2022;50(Suppl 1):85–156
4. **Viculín J**, Ban M, Bošković L, Katić A, Buljubašić Franić M, Vrdoljak E. The up-dated insight into immunotherapy with checkpoint inhibitors in patients with metastatic colorectal cancer – our daily practice. Lib Oncol. 2022;50(Suppl 1):85–156
5. Katić A, Omrčen T, **Viculín J**, Boban M, Hrepić D, Vrdoljak E. Treatment patterns and survival outcomes of patients with metastatic gastric cancer at the Department of Oncology and radiotherapy, University Hospital of Split from 2018 to 2020 – retrospective analysis. Lib Oncol. 2022;50(Suppl 1):85–156
6. Ban M, Bošković L, **Viculín J**, Buljubašić Franić M, Vrdoljak E. The first insight in immunotherapy with checkpoint inhibitors for metastatic colorectal cancer in our daily practice. Lib Oncol. 2021;49(Suppl 1):83–140
7. Viculin I, **Viculín J**, Boban M, Bošković L, Vrdoljak E, Boraska Jelavić T. The efficacy and safety of concurrent chemoradiotherapy in patients with non-small cell lung cancer - single institution study at Department of Oncology and Radiotherapy, University Hospital of Split. Lib Oncol. 2020;48(Suppl 1):73–143
8. Bošković L, Hrepić D, **Viculín J**, Boban M, Boraska Jelavić T, Vrdoljak E. Nivolumab u liječenju nemikrocelularnog karcinoma pluća - iskustva Klinike za onkologiju KBC Split, Hrvatski onkološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem, 2018. (kratko priopćenje)
9. Bošković L, Hrepić D, **Viculín J**, Boban M, Boraska Jelavić T, Vrdoljak E. Nivolumab in clinical practice: real world experience in the University Hospital Split// 14th Central European Oncology Congress: Book of Abstracts, Hrvatsko onkološko društvo, 2018. (prošireni sažetak izlaganja sa skupa)

10. Vrdoljak E, **Viculin J**, Strikić A, Hrepić D, Ban M. Single institution experience in adjuvant treatment of HER 2 positive breast cancer patients. CEOC 2013., Opatija
11. Omrčen T, Ledina D, Boraska Jelavić T, Boban M, Mikuš S, Petrić Miše B, Bošković L, Ban M, Prskalo T, Božić M, **Viculin J**, Strikić A, Vrdoljak E. Combination of adjuvant radiotherapy and androgen deprivation therapy after radical prostatectomy on high-risk prostate cancer patients - retrospective analysis in single institution// 2014. str. 14-14. (sažetak izlaganja sa skupa)
12. Vrdoljak E, **Viculin J**. Moderni pristup u liječenju sindroma zloćudnog tumora kod onkoloških bolesnika. Knjiga sažetaka IV. hrvatskog kongresa Potporno liječenje onkoloških bolesnika, 2011. str. 16-18.



## 10 LITERATURA

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71:209–49. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21660>.
- [2] Gormley M, Creaney G, Schache A, Ingarfield K, Conway DI. Reviewing the epidemiology of head and neck cancer: definitions, trends and risk factors. *Br Dent J* 2022;233:780. <https://doi.org/10.1038/S41415-022-5166-X>.
- [3] Gatta G, Botta L, Sánchez MJ, Anderson LA, Pierannunzio D, Licitra L, et al. Prognoses and improvement for head and neck cancers diagnosed in Europe in early 2000s: The EUROCARE-5 population-based study. *Eur J Cancer* 2015;51:2130–43. <https://doi.org/10.1016/J.EJCA.2015.07.043>.
- [4] Haddad RI, Hicks WL, Hitchcock YJ, Jimeno A, Leizman D, Pinto HA, et al. NCCN Guidelines Version 2.2023 Head and Neck Cancers Continue NCCN Guidelines Panel Disclosures. 2023.
- [5] Johnson DE, Burtneß B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* 2020;6. <https://doi.org/10.1038/S41572-020-00224-3>.
- [6] Bosetti C, Carioli G, Santucci C, Bertuccio P, Gallus S, Garavello W, et al. Global trends in oral and pharyngeal cancer incidence and mortality. *Int J Cancer* 2020;147:1040–9. <https://doi.org/10.1002/IJC.32871>.
- [7] Menezes F dos S, Fernandes GA, Antunes JLF, Villa LL, Toporcov TN. Global incidence trends in head and neck cancer for HPV-related and -unrelated subsites: A systematic review of population-based studies. *Oral Oncol* 2021;115. <https://doi.org/10.1016/J.ORALONCOLOGY.2020.105177>.
- [8] Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 2009;45:309–16. <https://doi.org/10.1016/J.ORALONCOLOGY.2008.06.002>.
- [9] Windon MJ, D’Souza G, Rettig EM, Westra WH, van Zante A, Wang SJ, et al. Increasing prevalence of human papillomavirus-positive oropharyngeal cancers among older adults. *Cancer* 2018;124:2993–9. <https://doi.org/10.1002/CNCR.31385>.
- [10] O’Neill JP, Shaha AR. Nutrition Management of Patients with Malignancies of the Head and Neck. *Surgical Clinics of North America* 2011;91:631–9. <https://doi.org/10.1016/J.SUC.2011.02.005>.
- [11] Orell-Kotikangas H, Österlund P, Mäkitie O, Saarilahti K, Ravasco P, Schwab U, et al. Cachexia at diagnosis is associated with poor survival in head and neck cancer patients. *Acta Otolaryngol* 2017;137(7):778-785. <https://doi.org/10.1080/00016489.2016.1277263>.
- [12] Ingarfield K, McMahon AD, Hurley K, Toms S, Pring M, Thomas SJ, et al. Inequality in survival of people with head and neck cancer: Head and Neck 5000 cohort study. *Head Neck* 2021;43:1252–70. <https://doi.org/10.1002/HED.26589>.

- [13] Pulte D, Brenner H. Changes in survival in head and neck cancers in the late 20th and early 21st century: a period analysis. *Oncologist* 2010;15:994–1001. <https://doi.org/10.1634/THEONCOLOGIST.2009-0289>.
- [14] Du E, Mazul AL, Farquhar D, Brennan P, Anantharaman D, Abedi-Ardekani B, et al. Long-term Survival in Head and Neck Cancer: Impact of Site, Stage, Smoking, and Human Papillomavirus Status. *Laryngoscope* 2019;129:2506–13. <https://doi.org/10.1002/LARY.27807>.
- [15] Osazuwa-Peters N, Simpson MC, Zhao L, Boakye EA, Olomukoro SI, Deshields T, et al. Suicide risk among cancer survivors: Head and neck versus other cancers. *Cancer* 2018;124:4072–9. <https://doi.org/10.1002/CNCR.31675>.
- [16] Laryngeal Cancer — Cancer Stat Facts n.d. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/laryn.html>
- [17] Nocini R, Molteni G, Mattiuzzi C, Lippi G. Updates on larynx cancer epidemiology. *Chin J Cancer Res* 2020;32:18–25. <https://doi.org/10.21147/J.ISSN.1000-9604.2020.01.03>.
- [18] Lubin JH, Muscat J, Gaudet MM, Olshan AF, Curado MP, Dal Maso L, et al. An examination of male and female odds ratios by BMI, cigarette smoking, and alcohol consumption for cancers of the oral cavity, pharynx, and larynx in pooled data from 15 case-control studies. *Cancer Causes Control* 2011;22:1217–31. <https://doi.org/10.1007/S10552-011-9792-X/METRICS>.
- [19] Cancer Statistics Review - SEER Statistics n.d. <https://seer.cancer.gov/csr/>
- [20] Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 1988;1;48(11):3282-7.
- [21] Wyss A, Hashibe M, Chuang SC, Lee YCA, Zhang ZF, Yu GP, et al. Cigarette, cigar, and pipe smoking and the risk of head and neck cancers: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Am J Epidemiol* 2013;178:679–90. <https://doi.org/10.1093/AJE/KWT029>.
- [22] Lewin F, Norell SE, Johansson H, Gustavsson P, Wennerberg J, Biörklund A et al. Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck: a population-based case-referent study in Sweden. *Cancer* 1998; 1;82(7):1367-75. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0142\(19980401\)82:7<1367::aid-cncr21>3.0.co;2-3](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0142(19980401)82:7<1367::aid-cncr21>3.0.co;2-3).
- [23] Andre K, Schraub S, Mercier M, Bontemps P. Role of alcohol and tobacco in the aetiology of head and neck cancer: a case-control study in the Doubs region of France. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1995;31B:301–9. [https://doi.org/10.1016/0964-1955\(95\)00041-0](https://doi.org/10.1016/0964-1955(95)00041-0).
- [24] Wyss AB, Hashibe M, Lee YCA, Chuang SC, Muscat J, Chen C, et al. Smokeless Tobacco Use and the Risk of Head and Neck Cancer: Pooled Analysis of US Studies in the INHANCE Consortium. *Am J Epidemiol* 2016;184:703–16. <https://doi.org/10.1093/AJE/KWW075>.

- [25] Tan EH, Adelstein DJ, Droughton MLT, Van Kirk MA, Lavertu P. Squamous cell head and neck cancer in nonsmokers. *Am J Clin Oncol* 1997;20:146–50. <https://doi.org/10.1097/00000421-199704000-00008>.
- [26] De Stefani E, Boffetta P, Oreggia F, Fierro L, Mendilaharsu M. Hard liquor drinking is associated with higher risk of cancer of the oral cavity and pharynx than wine drinking. A case-control study in Uruguay. *Oral Oncol* 1998;34:99–104. [https://doi.org/10.1016/S1368-8375\(97\)00062-6](https://doi.org/10.1016/S1368-8375(97)00062-6).
- [27] Druesne-Pecollo N, Tehard B, Mallet Y, Gerber M, Norat T, Hercberg S, et al. Alcohol and genetic polymorphisms: effect on risk of alcohol-related cancer. *Lancet Oncol* 2009;10:173–80. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70019-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70019-1).
- [28] Zhang Y, Wang R, Miao L, Zhu L, Jiang H, Yuan H. Different Levels in Alcohol and Tobacco Consumption in Head and Neck Cancer Patients from 1957 to 2013. *PLoS One* 2015;10:124045. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0124045>.
- [29] Zhang WL, Zhu ZL, Huang MC, Tang YJ, Tang YL, Liang XH. Susceptibility of Multiple Primary Cancers in Patients With Head and Neck Cancer: Nature or Nurture? *Front Oncol* 2019;9:496153. <https://doi.org/10.3389/FONC.2019.01275/BIBTEX>.
- [30] Tsang CM, Lui VWY, Bruce JP, Pugh TJ, Lo KW. Translational genomics of nasopharyngeal cancer. *Semin Cancer Biol* 2020;61:84–100. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2019.09.006>.
- [31] Hennessey PT, Westra WH, Califano JA. Human papillomavirus and head and neck squamous cell carcinoma: recent evidence and clinical implications. *J Dent Res* 2009;88:300–6. <https://doi.org/10.1177/0022034509333371>.
- [32] Rowhani-Rahbar A, Carter JJ, Hawes SE, Hughes JP, Weiss NS, Galloway DA, et al. Antibody responses in oral fluid after administration of prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Infect Dis* 2009;200:1452–5. <https://doi.org/10.1086/606026>.
- [33] Gillison ML, Chaturvedi AK, Lowy DR. HPV prophylactic vaccines and the potential prevention of noncervical cancers in both men and women. *Cancer* 2008;113:3036–46. <https://doi.org/10.1002/CNCR.23764>.
- [34] Rosenberg PS, Alter BP, Ebell W. Cancer risks in Fanconi anemia: findings from the German Fanconi Anemia Registry. *Haematologica* 2008;93:511–7. <https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.12234>.
- [35] Dos Santos ES, Pérez-de-Oliveira ME, Normando AGC, Gueiros LAM, Rogatto SR, Vargas PA, et al. Systemic conditions associated with increased risk to develop oral squamous cell carcinoma: Systematic review and meta-analysis. *Head Neck* 2022;44:2925–37. <https://doi.org/10.1002/HED.27193>.
- [36] Chuang SC, Jenab M, Heck JE, Bosetti C, Talamini R, Matsuo K, et al. Diet and the risk of head and neck cancer: A pooled analysis in the INHANCE consortium. *Cancer Causes and Control* 2012;23:69–88. <https://doi.org/10.1007/S10552-011-9857-X/TABLES/11>.

- [37] Hauptmann M, Lubin JH, Stewart PA, Hayes RB, Blair A. Mortality from solid cancers among workers in formaldehyde industries. *Am J Epidemiol* 2004;159:1117–30. <https://doi.org/10.1093/AJE/KWH174>.
- [38] Vaughan TL, Stewart PA, Teschke K, Lynch CF, Swanson GM, Lyon JL, et al. Occupational exposure to formaldehyde and wood dust and nasopharyngeal carcinoma. *Occup Environ Med* 2000;57:376–84. <https://doi.org/10.1136/OEM.57.6.376>.
- [39] Vaughan TL, Stewart PA, Davis S, Thomas DB. Work in dry cleaning and the incidence of cancer of the oral cavity, larynx, and oesophagus. *Occup Environ Med* 1997;54:692. <https://doi.org/10.1136/OEM.54.9.692>.
- [40] Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:467–75. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-04-0551>.
- [41] Grégoire V, Ang K, Budach W, Grau C, Hamoir M, Langendijk JA, et al. Delineation of the neck node levels for head and neck tumors: a 2013 update. DAHANCA, EORTC, HKNPCSG, NCIC CTG, NCRI, RTOG, TROG consensus guidelines. *Radiother Oncol* 2014;110:172–81. <https://doi.org/10.1016/J.RADONC.2013.10.010>.
- [42] Marioni G, Marchese-Ragona R, Cartei G, Marchese F, Staffieri A. Current opinion in diagnosis and treatment of laryngeal carcinoma. *Cancer Treat Rev* 2006;32:504–15. <https://doi.org/10.1016/J.CTRV.2006.07.002>.
- [43] Laryngeal Cancer Treatment (PDQ®) - NCI n.d. <https://www.cancer.gov/types/head-and-neck/hp/adult/laryngeal-treatment-pdq>
- [44] Suárez-Quintanilla J, Cabrera AF, Sharma S. *Anatomy, Head and Neck: Larynx* 2022:1.
- [45] Koroulakis A, Agarwal M. *Laryngeal Cancer*. StatPearls 2022.
- [46] Laryngeal Cancer Update: A Review n.d. [https://www.researchgate.net/publication/321977519\\_Laryngeal\\_Cancer\\_Update\\_A\\_Review](https://www.researchgate.net/publication/321977519_Laryngeal_Cancer_Update_A_Review)
- [47] Kerawala CJ, Campbell A. Provision and quality assurance for head and neck cancer care. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2000;38:543–5. <https://doi.org/10.1054/BJOM.2000.0460>.
- [48] BlueBooksOnline n.d. <https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/52>
- [49] Omland T, Lie KA, Akre H, Sandlie LE, Jebsen P, Sandvik L, et al. Recurrent respiratory papillomatosis: HPV genotypes and risk of high-grade laryngeal neoplasia. *PLoS One* 2014;9. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0099114>.
- [50] Kanazawa T, Fukushima N, Imayoshi S, Nagatomo T, Kawada K, Nishino H, et al. Rare case of malignant transformation of recurrent respiratory papillomatosis associated with human papillomavirus type 6 infection and p53 overexpression. *Springerplus* 2013;2. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-153>.
- [51] Derkay CS, Wiatrak B. Recurrent respiratory papillomatosis: a review. *Laryngoscope* 2008;118:1236–47. <https://doi.org/10.1097/MLG.0B013E31816A7135>.

- [52] Gale N, Cardesa A, Hernandez-Prera JC, Slootweg PJ, Wenig BM, Zidar N. Laryngeal Dysplasia: Persisting Dilemmas, Disagreements and Unsolved Problems-A Short Review. *Head Neck Pathol* 2020;14:1046–51. <https://doi.org/10.1007/S12105-020-01149-9>.
- [53] Hellquist H, Ferlito A, Mäkitie AA, Thompson LDR, Bishop JA, Agaimy A, et al. Developing Classifications of Laryngeal Dysplasia: The Historical Basis. *Adv Ther* 2020;37:2667–77. <https://doi.org/10.1007/S12325-020-01348-4>.
- [54] Gale N, Zidar N, Poljak M, Cardesa A. Current views and perspectives on classification of squamous intraepithelial lesions of the head and neck. *Head Neck Pathol* 2014;8:16–23. <https://doi.org/10.1007/S12105-014-0530-Z>.
- [55] Gale N, Blagus R, El-Mofty SK, Helliwell T, Prasad ML, Sandison A, et al. Evaluation of a new grading system for laryngeal squamous intraepithelial lesions--a proposed unified classification. *Histopathology* 2014;65:456–64. <https://doi.org/10.1111/HIS.12427>.
- [56] Zhang HK, Liu HG. Is severe dysplasia the same lesion as carcinoma in situ? 10-Year follow-up of laryngeal precancerous lesions. *Acta Otolaryngol* 2012;132:325–8. <https://doi.org/10.3109/00016489.2011.642812>.
- [57] Pathology Outlines - Conventional squamous cell carcinoma n.d. <https://www.pathologyoutlines.com/topic/larynxcarcinomageneral.html>
- [58] Agaimy A, Weichert W. [Grading of head and neck neoplasms]. *Pathologe* 2016;37:285–92. <https://doi.org/10.1007/S00292-016-0173-9>.
- [59] Helliwell T, Chernock R, Dahlstrom JE, Gale N, McHugh J, Perez-Ordoñez B, et al. Data Set for the Reporting of Carcinomas of the Hypopharynx, Larynx, and Trachea: Explanations and Recommendations of the Guidelines From the International Collaboration on Cancer Reporting. *Arch Pathol Lab Med* 2019;143:432–8. <https://doi.org/10.5858/ARPA.2018-0419-SA>.
- [60] Sethi S, Lu M, Kapke A, Benninger MS, Worsham MJ. Patient and tumor factors at diagnosis in a multi-ethnic primary head and neck squamous cell carcinoma cohort. *J Surg Oncol* 2009;99:104–8. <https://doi.org/10.1002/JSO.21190>.
- [61] Fletcher KT, Gal TJ, Ebelhar AJ, Valentino J, Brill YM, Dressler E V., et al. Prognostic indicators and survival in salvage surgery for laryngeal cancer. *Head Neck* 2017;39:2021–6. <https://doi.org/10.1002/HED.24860>.
- [62] Tsai MH, Chuang HC, Lin YT, Huang TL, Fang FM, Lu H, et al. Survival Outcomes and Predictors for Patients who Failed Chemoradiotherapy/Radiotherapy and Underwent Salvage Total Laryngectomy. *Int J Environ Res Public Health* 2021;18:1–9. <https://doi.org/10.3390/IJERPH18020371>.
- [63] Rodrigo JP, Sánchez-Canteli M, López F, Wolf GT, Hernández-Prera JC, Williams MD, et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes in the Tumor Microenvironment of Laryngeal Squamous Cell Carcinoma: Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomedicines* 2021;9(5):486. <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES9050486>.

- [64] Sharbel DD, Abkemeier M, Groves MW, Albergotti WG, Byrd JK, Reyes-Gelves C. Occult Metastasis in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2021;130:67–77. <https://doi.org/10.1177/0003489420937744>.
- [65] Young RJ, Urban D, Angel C, Corry J, Lyons B, Vallance N, et al. Frequency and prognostic significance of p16(INK4A) protein overexpression and transcriptionally active human papillomavirus infection in laryngeal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2015;112:1098–104. <https://doi.org/10.1038/BJC.2015.59>.
- [66] Larque AB, Conde L, Hakim S, Alos L, Jares P, Vilaseca I, et al. P16(INK<sup>4a</sup>) overexpression is associated with CDKN2A mutation and worse prognosis in HPV-negative laryngeal squamous cell carcinomas. *Virchows Arch* 2015;466:375–82. <https://doi.org/10.1007/S00428-015-1725-8>.
- [67] Bradford CR, Ferlito A, Devaney KO, Mäkitie AA, Rinaldo A. Prognostic factors in laryngeal squamous cell carcinoma. *Laryngoscope Investig Otolaryngol* 2020;5:74–81. <https://doi.org/10.1002/LIO2.353>.
- [68] Hendriksma M, Montagne MW, Langeveld TPM, Veselic M, van Benthem PPG, Sjögren E V. Evaluation of surgical margin status in patients with early glottic cancer (Tis-T2) treated with transoral CO2 laser microsurgery, on local control. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2018;275:2333–40. <https://doi.org/10.1007/S00405-018-5070-9>.
- [69] Singh A, Qayyumi B, Chaturvedi P. An Update on Surgical Margins in the Head Neck Squamous Cell Carcinoma: Assessment, Clinical Outcome, and Future Directions. *Curr Oncol Rep* 2020;22. <https://doi.org/10.1007/S11912-020-00942-7>.
- [70] College of American Pathologists. Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Cancers of the Larynx 2017.
- [71] Ferlito A, Rinaldo A, Mannarà GM. Is primary radiotherapy an appropriate option for the treatment of verrucous carcinoma of the head and neck? *J Laryngol Otol* 1998;112:132–9. <https://doi.org/10.1017/S0022215100140137>.
- [72] López F, Williams MD, Cardesa A, Hunt JL, Strojjan P, Rinaldo A, et al. How phenotype guides management of non-conventional squamous cell carcinomas of the larynx? *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2017;274:2709–26. <https://doi.org/10.1007/S00405-017-4533-8>.
- [73] Cobo F, Talavera P, Concha Á. Review article: relationship of human papillomavirus with papillary squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: a review. *Int J Surg Pathol* 2008;16:127–36. <https://doi.org/10.1177/1066896908314700>.
- [74] Thompson LDR, Wenig BM, Heffner DK, Gnepp DR. Exophytic and papillary squamous cell carcinomas of the larynx: A clinicopathologic series of 104 cases. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1999;120:718–24. <https://doi.org/10.1053/HN.1999.V120.A92773>.
- [75] Stelow EB, Mills SE. Squamous cell carcinoma variants of the upper aerodigestive tract. *Am J Clin Pathol* 2005;124 Suppl. <https://doi.org/10.1309/CR5JXUY3J2YGTC1D>.

- [76] Masand RP, El-Mofty SK, Ma XJ, Luo Y, Flanagan JJ, Lewis JS. Adenosquamous carcinoma of the head and neck: relationship to human papillomavirus and review of the literature. *Head Neck Pathol* 2011;5:108–16. <https://doi.org/10.1007/S12105-011-0245-3>.
- [77] Lee RJ, Lin T, Lee SA, Lee KK, Christensen RE. Importance of tumor extent in adenosquamous carcinoma of the head and neck: a retrospective cohort study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2017;124:114–20. <https://doi.org/10.1016/J.OOOO.2017.03.004>.
- [78] Kass JI, Lee SC, Abberbock S, Seethala RR, Duvvuri U. Adenosquamous carcinoma of the head and neck: Molecular analysis using CRTC-MAML FISH and survival comparison with paired conventional squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 2015;125:E371–6. <https://doi.org/10.1002/LARY.25519>.
- [79] Dubal PM, Unsal AA, Echanique KA, Vazquez A, Reder LS, Baredes S, et al. Laryngeal adenosquamous carcinoma: A population-based perspective. *Laryngoscope* 2016;126:858–63. <https://doi.org/10.1002/LARY.25704>.
- [80] Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershewald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin* 2017;67:93–9. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21388>.
- [81] Aupérin A. Epidemiology of head and neck cancers: an update. *Curr Opin Oncol* 2020;32:178–86. <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000629>.
- [82] Mulcahy CF, Mohamed ASR, Kanwar A, Hutcheson KA, Ghosh A, Vock D, et al. Age-adjusted comorbidity and survival in locally advanced laryngeal cancer. *Head Neck* 2018;40:2060–9. <https://doi.org/10.1002/HED.25200>.
- [83] Li R, Yu S, Zhu W, Wang S, Yan L. Studying the impact of young age on prognosis and treatment in laryngeal squamous cell carcinomas using the SEER database. *PeerJ* 2019;7. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.7368>.
- [84] Fong PY, Tan SH, Lim DWT, Tan EH, Ng QS, Sommat K, et al. Association of clinical factors with survival outcomes in laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC). *PLoS One* 2019;14. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0224665>.
- [85] Tulli M, Re M, Bondi S, Ferrante L, Dajko M, Giordano L, et al. The prognostic value of anterior commissure involvement in T1 glottic cancer: A systematic review and meta-analysis. *Laryngoscope* 2020;130:1932–40. <https://doi.org/10.1002/LARY.28395>.
- [86] Wang Z, Zeng Q, Li Y, Lu T, Liu C, Hu G. Extranodal Extension as an Independent Prognostic factor in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Patients. *J Cancer* 2020;11:7196–201. <https://doi.org/10.7150/JCA.47700>.
- [87] Abdeyrim A, He S, Zhang Y, Mamtali G, Asla A, Yusup M, et al. Prognostic value of lymph node ratio in laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *J Otolaryngol Head Neck Surg* 2020;49. <https://doi.org/10.1186/S40463-020-00421-W>.

- [88] Lee KC, Chuang SK. The nonsurgical management of early stage (T1/2 N0 M0) laryngeal cancer: A population analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2020;130:18–24. <https://doi.org/10.1016/J.OOOO.2020.01.006>.
- [89] Boxberg M, Kuhn PH, Reiser M, Erb A, Steiger K, Pickhard A, et al. Tumor Budding and Cell Nest Size Are Highly Prognostic in Laryngeal and Hypopharyngeal Squamous Cell Carcinoma: Further Evidence for a Unified Histopathologic Grading System for Squamous Cell Carcinomas of the Upper Aerodigestive Tract. *Am J Surg Pathol* 2019;43:303–13. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000001178>.
- [90] Mäkitie AA, Almangush A, Rodrigo JP, Ferlito A, Leivo I. Hallmarks of cancer: Tumor budding as a sign of invasion and metastasis in head and neck cancer. *Head Neck* 2019;41:3712–8. <https://doi.org/10.1002/HED.25872>.
- [91] Rodrigo JP, Ferlito A, Suárez C, Shaha AR, Silver CE, Devaney KO, et al. New molecular diagnostic methods in head and neck cancer. *Head Neck* 2005;27:995–1003. <https://doi.org/10.1002/HED.20257>.
- [92] Mäkitie AA, Monni O. Molecular profiling of laryngeal cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2009;9:1251–60. <https://doi.org/10.1586/ERA.09.102>.
- [93] Greenman J, Homer JJ, Stafford ND. Markers in cancer of the larynx and pharynx. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 2000;25:9–18. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2273.2000.00339.X>.
- [94] Johnson DE, Burtneß B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nature Reviews Disease Primers* 2020 6:1 2020;6:1–22. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00224-3>.
- [95] Almadori G, Bussu F, Cadoni G, Galli J, Rigante M, Artuso A, et al. Multistep laryngeal carcinogenesis helps our understanding of the field cancerisation phenomenon: a review. *Eur J Cancer* 2004;40(16):2383-8. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2004.04.023>.
- [96] Falco M, Tammaro C, Takeuchi T, Cossu AM, Scafuro G, Zappavigna S, et al. Overview on Molecular Biomarkers for Laryngeal Cancer: Looking for New Answers to an Old Problem. *Cancers (Basel)* 2022;14. <https://doi.org/10.3390/CANCERS14071716>.
- [97] Chau NG, Perez-Ordóñez B, Zhang K, Pham NA, Ho J, Zhang T, et al. The association between EGFR variant III, HPV, p16, c-MET, EGFR gene copy number and response to EGFR inhibitors in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck Oncol* 2011;3. <https://doi.org/10.1186/1758-3284-3-11>.
- [98] Shimkin MB, Griswold MH, Cutler SJ. Survival in untreated cancer. *CA Cancer J Clin* 1984;34(5):282-94. <https://doi.org/10.3322/canjclin.34.5.282>.
- [99] Chen AY, Halpern M. Factors predictive of survival in advanced laryngeal cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2007;133:1270–6. <https://doi.org/10.1001/ARCHOTOL.133.12.1270>.
- [100] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 2016;66:7–30. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21332>.



- [101] Siegel Mph RL, Miller KD, Sandeep N, Mbbs W, Ahmedin |, Dvm J, et al. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin* 2023;73:17–48. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21763>.
- [102] Shaikh MAAN, Kumar KP, Walli AK, Kannan R, Pradhan SA. A Review on Early Glottic Cancer. *Int J Head Neck Surg* 2022;13:41–6. <https://doi.org/10.5005/JP-JOURNALS-10001-1523>.
- [103] Dey P, Arnold D, Wight R, MacKenzie K, Kelly C, Wilson J. Radiotherapy versus open surgery versus endolaryngeal surgery (with or without laser) for early laryngeal squamous cell cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2002. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002027>.
- [104] Warner L, Chudasama J, Kelly CG, Loughran S, Mckenzie K, Wight R, et al. Radiotherapy versus open surgery versus endolaryngeal surgery (with or without laser) for early laryngeal squamous cell cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2014;2014. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002027>.
- [105] Ogol'tsova ES, Paches AI, Matiakin EG, Dvořin VV, Fedotenko SP, Alferov VS, et al. Comparative evaluation of the effectiveness of radiotherapy, surgery and combined treatment of stage I-II laryngeal cancer (T1-2NoMo) based on the data of a cooperative randomized study. *Vestn Otorinolaringol* 1990;(3):3-7.
- [106] Higgins KM. What treatment for early-stage glottic carcinoma among adult patients: CO2 endolaryngeal laser excision versus standard fractionated external beam radiation is superior in terms of cost utility? *Laryngoscope* 2011;121:116–34. <https://doi.org/10.1002/lary.21226>.
- [107] Vaculik MF, MacKay CA, Taylor SM, Trites JRB, Hart RD, Rigby MH. Systematic review and meta-analysis of T1 glottic cancer outcomes comparing CO2 transoral laser microsurgery and radiotherapy. *J Otolaryngol Head Neck Surg* 2019;48:1–11. <https://doi.org/10.1186/S40463-019-0367-2/FIGURES/5>.
- [108] Jones TM, De M, Foran B, Harrington K, Mortimore S. Laryngeal cancer: United Kingdom National Multidisciplinary guidelines. *J Laryngol Otol* 2016;130:S75–82. <https://doi.org/10.1017/S0022215116000487>.
- [109] Ambrosch P. The role of laser microsurgery in the treatment of laryngeal cancer. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2007;15:82–8. <https://doi.org/10.1097/MOO.0B013E3280147336>.
- [110] Fu KK, Pajak TF, Trotti A, Jones CU, Spencer SA, Phillips TL, et al. A radiation therapy oncology group (RTOG) phase III randomized study to compare hyperfractionation and two variants of accelerated fractionation to standard fractionation radiotherapy for head and neck squamous cell carcinomas: First report of RTOG 9003. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;48:7–16. [https://doi.org/10.1016/S0360-3016\(00\)00663-5](https://doi.org/10.1016/S0360-3016(00)00663-5).
- [111] Mendenhall WM, Werning JW, Hinerman RW, Amdur RJ, Villaret DB. Management of T1-T2 glottic carcinomas. *Cancer* 2004;100:1786–92. <https://doi.org/10.1002/CNCR.20181>.
- [112] Hinerman RW, Mendenhall WM, Amdur RJ, Stringer SP, Villaret DB, Robbins KT. Carcinoma of the supraglottic larynx: treatment results with radiotherapy alone or with

planned neck dissection. *Head Neck* 2002;24:456–67. <https://doi.org/10.1002/HED.10069>.

- [113] Fowler JF, Lindstrom MJ. Loss of local control with prolongation in radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992;23:457–67. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(92\)90768-D](https://doi.org/10.1016/0360-3016(92)90768-D).
- [114] Hansen O, Overgaard J, Hansen HS, Overgaard M, Høyer M, Jørgensen KE, et al. Importance of overall treatment time for the outcome of radiotherapy of advanced head and neck carcinoma: Dependency on tumor differentiation. *Radiother Oncol* 1997;43:47–51. [https://doi.org/10.1016/S0167-8140\(97\)01904-X](https://doi.org/10.1016/S0167-8140(97)01904-X).
- [115] Yamazaki H, Nishiyama K, Tanaka E, Koizumi M, Chatani M. Radiotherapy for early glottic carcinoma (T1N0M0): results of prospective randomized study of radiation fraction size and overall treatment time. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;64:77–82. <https://doi.org/10.1016/J.IJROBP.2005.06.014>.
- [116] Overgaard J, Hansen HS, Specht L, Overgaard M, Grau C, Andersen E, et al. Five compared with six fractions per week of conventional radiotherapy of squamous-cell carcinoma of head and neck: DAHANCA 6&7 randomised controlled trial. *Lancet* 2003;362:933–40. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14361-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14361-9).
- [117] Garden AS, Forster K, Wong PF, Morrison WH, Schechter NR, Ang KK. Results of radiotherapy for T2N0 glottic carcinoma: Does the “2” stand for twice-daily treatment? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;55:322–8. [https://doi.org/10.1016/S0360-3016\(02\)03938-X](https://doi.org/10.1016/S0360-3016(02)03938-X).
- [118] Gowda R V., Henk JM, Mais KL, Sykes AJ, Swindell R, Slevin NJ. Three weeks radiotherapy for T1 glottic cancer: The Christie and Royal Marsden Hospital Experience. *Radiother Oncol* 2003;68:105–11. [https://doi.org/10.1016/S0167-8140\(03\)00059-8](https://doi.org/10.1016/S0167-8140(03)00059-8).
- [119] Moon SH, Cho KH, Chung EJ, Lee CG, Lee KC, Chai GY, et al. A prospective randomized trial comparing hypofractionation with conventional fractionation radiotherapy for T1-2 glottic squamous cell carcinomas: results of a Korean Radiation Oncology Group (KROG-0201) study. *Radiother Oncol* 2014;110:98–103. <https://doi.org/10.1016/J.RADONC.2013.09.016>.
- [120] Trotti A, Zhang Q, Bentzen SM, Emami B, Hammond ME, Jones CU, et al. Randomized trial of hyperfractionation versus conventional fractionation in T2 squamous cell carcinoma of the vocal cord (RTOG 9512). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2014;89:958–63. <https://doi.org/10.1016/J.IJROBP.2014.04.041>.
- [121] Pfister DG, Laurie SA, Weinstein GS, Mendenhall WM, Adelstein DJ, Ang KK, et al. American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline for the use of larynx-preservation strategies in the treatment of laryngeal cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:3693–704. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.07.4559>.
- [122] Viani L, Stell PM, Dalby JE. Recurrence after radiotherapy for glottic carcinoma. *Cancer*. 1991 Feb 1;67(3):577-84. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19910201\)67:3<577:aid-cnrc2820670309>3.0.co;2-w](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19910201)67:3<577:aid-cnrc2820670309>3.0.co;2-w).

- [123] Kazem I, Van Den Broek P. Planned preoperative radiation therapy vs. definitive radiotherapy for advanced laryngeal carcinoma. *Laryngoscope* 1984;94:1355–8. <https://doi.org/10.1288/00005537-198410000-00017>.
- [124] Desanto LW. T3 glottic cancer: options and consequences of the options. *Laryngoscope* 1984;94:1311-1315. <https://doi.org/10.1288/00005537-198410000-00010>.
- [125] Harwood AR, Bryce DP, Rider WD. Management of T3 glottic cancer. *Arch Otolaryngol* 1980;106:697–9. <https://doi.org/10.1001/ARCHOTOL.1980.00790350039011>.
- [126] Ogura JH, Spector GJ, Sessions DG. Conservation surgery for epidermoid carcinoma of the marginal area (aryepiglottic fold extension). *Laryngoscope* 1975;85:1801–7. <https://doi.org/10.1288/00005537-197511000-00001>.
- [127] Harris HS, Watson FR, Spratt JS. Carcinoma of the larynx. A retrospective study of 144 cases. *The American Journal of Surgery* 1969;118:676–84. [https://doi.org/10.1016/0002-9610\(69\)90212-8](https://doi.org/10.1016/0002-9610(69)90212-8).
- [128] Som ML. Cordal cancer with extension to vocal process. *Laryngoscope* 1975;85:1298–307. <https://doi.org/10.1288/00005537-197508000-00005>.
- [129] Bourhis J, Overgaard J, Audry H, Ang KK, Saunders M, Bernier J, et al. Hyperfractionated or accelerated radiotherapy in head and neck cancer: a meta-analysis. *Lancet* 2006;368:843–54. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69121-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69121-6).
- [130] Kramer S, Gelber RD, Snow JB, Marcial VA, Lowry LD, Davis LW, et al. Combined radiation therapy and surgery in the management of advanced head and neck cancer: final report of study 73-03 of the Radiation Therapy Oncology Group. *Head Neck Surg* 1987;10:19–30. <https://doi.org/10.1002/HED.2890100105>.
- [131] Tupchong L, Phil D, Scott CB, Blitzer PH, Marcial VA, Lowry LD, et al. Randomized study of preoperative versus postoperative radiation therapy in advanced head and neck carcinoma: long-term follow-up of RTOG study 73-03. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991;20:21–8. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(91\)90133-O](https://doi.org/10.1016/0360-3016(91)90133-O).
- [132] Amdur RJ, Parsons JT, Mendenhall WM, Million RR, Stringer SP, Cassisi NJ. Postoperative irradiation for squamous cell carcinoma of the head and neck: an analysis of treatment results and complications. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989;16:25–36. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(89\)90006-0](https://doi.org/10.1016/0360-3016(89)90006-0).
- [133] Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, Jacobs J, Campbell BH, Saxman SB, et al. Postoperative Concurrent Radiotherapy and Chemotherapy for High-Risk Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med* 2004 May 6;350(19):1937-44. doi: 10.1056/NEJMoa032646.
- [134] Bernier J, Dometge C, Ozsahin M, Matuszewska K, Lefèbvre J-L, Greiner RH, et al. Postoperative Irradiation with or without Concomitant Chemotherapy for Locally Advanced Head and Neck Cancer. *N Engl J Med* 2004 May 6;350(19):1945-52. doi: 10.1056/NEJMoa032641.
- [135] Bernier J, Cooper JS, Pajak TF, Van Glabbeke M, Bourhis J, Forastiere A, et al. Defining risk levels in locally advanced head and neck cancers: a comparative analysis of

- concurrent postoperative radiation plus chemotherapy trials of the EORTC (#22931) and RTOG (# 9501). *Head Neck* 2005;27:843–50. <https://doi.org/10.1002/HED.20279>.
- [136] Group\* TD of VALCS. Induction Chemotherapy plus Radiation Compared with Surgery plus Radiation in Patients with Advanced Laryngeal Cancer. *N Engl J Med*. 1991 Jun 13;324(24):1685-90. doi: 10.1056/NEJM199106133242402.
- [137] Forastiere AA, Goepfert H, Maor M, Pajak TF, Weber R, Morrison W, et al. Concurrent Chemotherapy and Radiotherapy for Organ Preservation in Advanced Laryngeal Cancer. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa031317> 2003;349:2091–8.
- [138] Forastiere AA, Zhang Q, Weber RS, Maor MH, Goepfert H, Pajak TF, et al. Long-term results of RTOG 91-11: a comparison of three nonsurgical treatment strategies to preserve the larynx in patients with locally advanced larynx cancer. *J Clin Oncol* 2013;31:845–52. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.43.6097>.
- [139] Pointreau Y, Garaud P, Chapet S, Sire C, Tuchais C, Tortochaux J, et al. Randomized trial of induction chemotherapy with cisplatin and 5-fluorouracil with or without docetaxel for larynx preservation. *J Natl Cancer Inst* 2009;101:498–506. <https://doi.org/10.1093/JNCI/DJP007>.
- [140] Janoray G, Pointreau Y, Garaud P, Chapet S, Alfonsi M, Sire C, et al. Long-term Results of a Multicenter Randomized Phase III Trial of Induction Chemotherapy With Cisplatin, 5-fluorouracil, ± Docetaxel for Larynx Preservation. *J Natl Cancer Inst* 2015;108. <https://doi.org/10.1093/JNCI/DJV368>.
- [141] Posner MR, Hershock DM, Blajman CR, Mickiewicz E, Winquist E, Gorbounova V, et al. Cisplatin and Fluorouracil Alone or with Docetaxel in Head and Neck Cancer. *N Engl J Med*. 2007 Oct 25;357(17):1705-15. doi: 10.1056/NEJMoa070956.
- [142] Posner MR, Norris CM, Wirth LJ, Shin DM, Cullen KJ, Winquist EW, et al. Sequential therapy for the locally advanced larynx and hypopharynx cancer subgroup in TAX 324: survival, surgery, and organ preservation. *Ann Oncol*. 2009 May;20(5):921-7. doi: 10.1093/annonc/mdn752.
- [143] Lefebvre JL, Pointreau Y, Rolland F, Alfonsi M, Baudoux A, Sire C, et al. Induction chemotherapy followed by either chemoradiotherapy or bioradiotherapy for larynx preservation: the TREMPLIN randomized phase II study. *J Clin Oncol* 2013;31:853–9. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.42.3988>.
- [144] Blanchard P, Bourhis J, Lacas B, Posner MR, Vermorcken JB, Hernandez JJC, et al. Taxane-cisplatin-fluorouracil as induction chemotherapy in locally advanced head and neck cancers: an individual patient data meta-analysis of the meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer group. *J Clin Oncol* 2013;31:2854–60. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.47.7802>.
- [145] Geoffrois L, Martin L, De Raucourt D, Sun XS, Tao Y, Maingon P, et al. Induction Chemotherapy Followed by Cetuximab Radiotherapy Is Not Superior to Concurrent Chemoradiotherapy for Head and Neck Carcinomas: Results of the GORTEC 2007-02 Phase III Randomized Trial. *J Clin Oncol* 2018;36:3077–83. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.76.2591>.

- [146] Haddad R, O'Neill A, Rabinowits G, Tishler R, Khuri F, Adkins D, et al. Induction chemotherapy followed by concurrent chemoradiotherapy (sequential chemoradiotherapy) versus concurrent chemoradiotherapy alone in locally advanced head and neck cancer (PARADIGM): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2013;14:257–64. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70011-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70011-1).
- [147] Lacas B, Carmel A, Landais C, Wong SJ, Licitra L, Tobias JS, et al. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): An update on 107 randomized trials and 19,805 patients, on behalf of MACH-NC Group. *Radiother Oncol* 2021;156:281–93. <https://doi.org/10.1016/J.RADONC.2021.01.013>.
- [148] Machtay M, Moughan J, Trotti A, Garden AS, Weber RS, Cooper JS, et al. Factors associated with severe late toxicity after concurrent chemoradiation for locally advanced head and neck cancer: an RTOG analysis. *J Clin Oncol* 2008;26:3582–9. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.14.8841>.
- [149] Pignon JP, Maître A le, Maillard E, Bourhis J. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiother Oncol* 2009;92:4–14. <https://doi.org/10.1016/J.RADONC.2009.04.014>.
- [150] Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. *Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer*. *Lancet*. 2000 Mar 18;355(9208):949-55. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10768432/>
- [151] An open-label, noninferiority phase III RCT of weekly versus three weekly cisplatin and radical radiotherapy in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma (ConCERT trial). *J Clin Oncol* n.d. [https://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2022.40.16\\_suppl.6004](https://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2022.40.16_suppl.6004)
- [152] Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, et al. Radiotherapy plus Cetuximab for Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med*. 2006 Feb 9;354(6):567-78. doi: 10.1056/NEJMoa053422.
- [153] Mehanna H, Wong W-L, McConkey CC, Rahman JK, Robinson M, Hartley AGJ, et al. PET-CT Surveillance versus Neck Dissection in Advanced Head and Neck Cancer. *N Engl J Med* 2016;374:1444–54. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1514493>.
- [154] Adelstein DJ, Li Y, Adams GL, Wagner H, Kish JA, Ensley JF, et al. An intergroup phase III comparison of standard radiation therapy and two schedules of concurrent chemoradiotherapy in patients with unresectable squamous cell head and neck cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:92–8. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.01.008>.
- [155] Bourhis J, Sire C, Graff P, Grégoire V, Maingon P, Calais G, et al. Concomitant chemoradiotherapy versus acceleration of radiotherapy with or without concomitant chemotherapy in locally advanced head and neck carcinoma (GORTEC 99-02): an open-label phase 3 randomised trial. *Lancet Oncol* 2012;13:145–53. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70346-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70346-1).
- [156] Cohen EEW, Karrison TG, Kocherginsky M, Mueller J, Egan R, Huang CH, et al. Phase III randomized trial of induction chemotherapy in patients with N2 or N3 locally

- advanced head and neck cancer. *J Clin Oncol* 2014;32:2735–43. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.54.6309>.
- [157] Gibson MK, Li Y, Murphy B, Hussain MHA, DeConti RC, Ensley J, et al. Randomized phase III evaluation of cisplatin plus fluorouracil versus cisplatin plus paclitaxel in advanced head and neck cancer (E1395): an intergroup trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol* 2005;23:3562–7. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.01.057>.
- [158] Forastiere AA, Metch B, Schuller DE, Ensley JF, Hutchins LF, Triozzi P, et al. Randomized comparison of cisplatin plus fluorouracil and carboplatin plus fluorouracil versus methotrexate in advanced squamous-cell carcinoma of the head and neck: a Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1992;10:1245–51. <https://doi.org/10.1200/JCO.1992.10.8.1245>.
- [159] Clavel M, Vermorken JB, Cognetti F, Cappelaere P, Mulder PHM de, Schornagel JH, et al. Randomized comparison of cisplatin, methotrexate, bleomycin and vincristine (CABO) versus cisplatin and 5-fluorouracil (CF) versus cisplatin (C) in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. A phase III study of the EORTC Head and Neck Cancer Cooperative Group. *Ann Oncol* 1994;5:521–6. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.ANONC.A058906>.
- [160] Jacobs C, Lyman G, Velez-García E, Sridhar KS, Knight W, Hochster H, et al. A phase III randomized study comparing cisplatin and fluorouracil as single agents and in combination for advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* 1992;10:257–63. <https://doi.org/10.1200/JCO.1992.10.2.257>.
- [161] Argiris A, Li Y, Forastiere A. Prognostic factors and long-term survivorship in patients with recurrent or metastatic carcinoma of the head and neck. *Cancer* 2004;101:2222–9. <https://doi.org/10.1002/CNCR.20640>.
- [162] Fury MG, Pfister DG. Current recommendations for systemic therapy of recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell cancer. *J Natl Compr Canc Netw* 2011;9:681–90. <https://doi.org/10.6004/JNCCN.2011.0056>.
- [163] Price KAR, Cohen EE. Current treatment options for metastatic head and neck cancer. *Curr Treat Options Oncol* 2012;13:35–46. <https://doi.org/10.1007/S11864-011-0176-Y>.
- [164] Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kaweckki A, Rottey S, et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med* 2008;359:1116–27. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA0802656>.
- [165] Burtneess B, Harrington KJ, Greil R, Soulières D, Tahara M, de Castro G, et al. Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet* 2019;394:1915–28. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32591-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32591-7).
- [166] Harrington KJ, Burtneess B, Greil R, Soulières D, Tahara M, De Castro G, et al. Pembrolizumab With or Without Chemotherapy in Recurrent or Metastatic Head and

- Neck Squamous Cell Carcinoma: Updated Results of the Phase III KEYNOTE-048 Study. *J Clin Oncol* 2023;41:790–802. <https://doi.org/10.1200/JCO.21.02508>.
- [167] Sano D, Oridate N. Long-term efficacy of immune checkpoint inhibitors with or without chemotherapy in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: a commentary on the 4-year follow-up of the KEYNOTE-048 trial. *Transl Cancer Res* 2023;12:1363–7. <https://doi.org/10.21037/TCR-23-48/COIF>.
- [168] Ferris RL, Blumenschein G, Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, et al. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med* 2016;375:1856–67. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1602252>.
- [169] Cohen EEW, Soulières D, Le Tourneau C, Dinis J, Licitra L, Ahn MJ, et al. Pembrolizumab versus methotrexate, docetaxel, or cetuximab for recurrent or metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma (KEYNOTE-040): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet* 2019;393:156–67. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31999-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31999-8).
- [170] Janot F, De Raucourt D, Benhamou E, Ferron C, Dolivet G, Bensadoun RJ, et al. Randomized trial of postoperative reirradiation combined with chemotherapy after salvage surgery compared with salvage surgery alone in head and neck carcinoma. *J Clin Oncol* 2008;26:5518–23. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.0102>.
- [171] Takiar V, Garden AS, Ma D, Morrison WH, Edson M, Zafereo ME, et al. Reirradiation of Head and Neck Cancers With Intensity Modulated Radiation Therapy: Outcomes and Analyses. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2016;95:1117–31. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2016.03.015>.
- [172] Ward MC, Lee NY, Caudell JJ, Zajichek A, Awan MJ, Koyfman SA, et al. A competing risk nomogram to predict severe late toxicity after modern re-irradiation for squamous carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol* 2019;90:80–6. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2019.01.022>.
- [173] Wisdom AJ, Hong CS, Lin AJ, Xiang Y, Cooper DE, Zhang J, et al. Neutrophils promote tumor resistance to radiation therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019;116:18584–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1901562116>.
- [174] Karpathiou G, Dumollard JM, Peoc'h M. Laryngeal Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol* 2020;1296:79–101. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-59038-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-030-59038-3_5).
- [175] Rodrigo JP, Sánchez-Canteli M, López F, Wolf GT, Hernández-Prera JC, Williams MD, et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes in the Tumor Microenvironment of Laryngeal Squamous Cell Carcinoma: Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomedicines* 2021;9. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9050486>.
- [176] Shibata H, Saito S, Uppaluri R. Immunotherapy for Head and Neck Cancer: A Paradigm Shift From Induction Chemotherapy to Neoadjuvant Immunotherapy. *Front Oncol* 2021;11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.727433>.
- [177] Patel SP, Othus M, Chen Y, Wright GP, Yost KJ, Hynstrom JR, et al. Neoadjuvant-Adjuvant or Adjuvant-Only Pembrolizumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med* 2023;388:813–23. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA2211437>.

- [178] Cercek A, Lumish M, Sinopoli J, Weiss J, Shia J, Lamendola-Essel M, et al. PD-1 Blockade in Mismatch Repair-Deficient, Locally Advanced Rectal Cancer. *N Engl J Med* 2022;386:2363–76. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA2201445>.
- [179] Chalabi M, Fanchi LF, Dijkstra KK, Van den Berg JG, Aalbers AG, Sikorska K, et al. Neoadjuvant immunotherapy leads to pathological responses in MMR-proficient and MMR-deficient early-stage colon cancers. *Nat Med* 2020;26:566–76. <https://doi.org/10.1038/S41591-020-0805-8>.
- [180] Farlow JL, Brenner JC, Lei YL, Chinn SB. Immune deserts in head and neck squamous cell carcinoma: A review of challenges and opportunities for modulating the tumor immune microenvironment. *Oral Oncol* 2021;120:105420. <https://doi.org/10.1016/J.ORALONCOLOGY.2021.105420>.
- [181] Chen Q, Sun L, Chen ZJ. Regulation and function of the cGAS–STING pathway of cytosolic DNA sensing. *Nat Immunol* 2016 17:10 2016;17:1142–9. <https://doi.org/10.1038/ni.3558>.
- [182] Zhu C, Li J, Yao M, Fang C. Potential for treatment benefit of STING agonists plus immune checkpoint inhibitors in oral squamous cell carcinoma. *BMC Oral Health* 2021;21:1–8. <https://doi.org/10.1186/S12903-021-01813-8/FIGURES/5>.
- [183] Ou L, Zhang A, Cheng Y, Chen Y. The cGAS-STING Pathway: A Promising Immunotherapy Target. *Front Immunol* 2021;12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.795048>.
- [184] Samson N, Ablasser A. The cGAS-STING pathway and cancer. *Nat Cancer* 2022;3:1452–63. <https://doi.org/10.1038/S43018-022-00468-W>.
- [185] Sun Z, Hornung V. cGAS-STING signaling. *Curr Biol* 2022;32:R730–4. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2022.05.027>.
- [186] Kim Y, Cho NY, Jin L, Jin HY, Kang GH. Prognostic significance of STING expression in solid tumor: a systematic review and meta-analysis. *Front Oncol* 2023;13:1244962. <https://doi.org/10.3389/FONC.2023.1244962/FULL>.
- [187] Chon HJ, Kim H, Noh JH, Yang H, Lee WS, Kong SJ, et al. STING signaling is a potential immunotherapeutic target in colorectal cancer. *J Cancer* 2019;10:4932–8. <https://doi.org/10.7150/JCA.32806>.
- [188] Xia T, Konno H, Ahn J, Barber GN. Deregulation of STING Signaling in Colorectal Carcinoma Constrains DNA Damage Responses and Correlates With Tumorigenesis. *Cell Rep* 2016;14:282–97. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2015.12.029>.
- [189] Qi Z, Yan F, Chen D, Xing W, Li Q, Zeng W, et al. Identification of prognostic biomarkers and correlations with immune infiltrates among cGAS-STING in hepatocellular carcinoma. *Biosci Rep* 2020;40. <https://doi.org/10.1042/BSR20202603>.
- [190] Gammelgaard KR, Sandfeld-Paulsen B, Godsk SH, Demuth C, Meldgaard P, Sorensen BS, et al. cGAS-STING pathway expression as a prognostic tool in NSCLC. *Transl Lung Cancer Res* 2021;10:340–54. <https://doi.org/10.21037/TLCR-20-524>.



- [191] Kunac N, Degoricija M, Viculin J, Omerović J, Terzić J, Vilović K, et al. Activation of cGAS-STING Pathway Is Associated with MSI-H Stage IV Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)* 2022;15. <https://doi.org/10.3390/CANCERS15010221>.
- [192] Hayman TJ, Baro M, MacNeil T, Phoomak C, Aung TN, Cui W, et al. STING enhances cell death through regulation of reactive oxygen species and DNA damage. *Nat Commun.* 2021;12. <https://doi.org/10.1038/S41467-021-22572-8>.
- [193] Wallington DG, Contessa JN, Hayman TJ. STING Agonists in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer J.* 2022;28:401–6. <https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000620>.
- [194] Pu F, Chen F, Liu J, Zhang Z, Shao Z. Immune Regulation of the cGAS-STING Signaling Pathway in the Tumor Microenvironment and Its Clinical Application. *Onco Targets Ther* 2021;14:1501. <https://doi.org/10.2147/OTT.S298958>.
- [195] Huang R, Ning Q, Zhao J, Zhao X, Zeng L, Yi Y, et al. Targeting STING for cancer immunotherapy: From mechanisms to translation. *Int Immunopharmacol* 2022;113. <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2022.109304>.
- [196] Guo J, Huang L. Nanodelivery of cGAS-STING activators for tumor immunotherapy. *Trends Pharmacol Sci* 2022;43:957–72. <https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2022.08.006>.
- [197] Botticelli A, Cirillo A, Strigari L, Valentini F, Cerbelli B, Scagnoli S, et al. Anti-PD-1 and Anti-PD-L1 in Head and Neck Cancer: A Network Meta-Analysis. *Front Immunol* 2021;12. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.705096>.
- [198] Bortnik V, Wu M, Julcher B, Salinas A, Nikolic I, Simpson KJ, et al. Loss of HPV type 16 E7 restores cGAS-STING responses in human papilloma virus-positive oropharyngeal squamous cell carcinomas cells. *J Microbiol Immunol Infect* 2021;54:733–9. <https://doi.org/10.1016/J.JMII.2020.07.010>.
- [199] Barsouk A, Aluru JS, Rawla P, Saginala K, Barsouk A. Epidemiology, Risk Factors, and Prevention of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Med Sci (Basel)* 2023;11:42. <https://doi.org/10.3390/MEDSCI11020042>.
- [200] Wang JY, Zhang QW, Wen K, Wang C, Ji X, Zhang L. Temporal trends in incidence and mortality rates of laryngeal cancer at the global, regional and national levels, 1990-2017. *BMJ Open* 2021;11. <https://doi.org/10.1136/BMJOPEN-2021-050387>.
- [201] Steuer CE, El-Deiry M, Parks JR, Higgins KA, Saba NF. An update on larynx cancer. *CA Cancer J Clin* 2017;67:31–50. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21386>.
- [202] Shen Y, Qi Y, Wang C, Wu C, Zhan X. Predicting specific mortality from laryngeal cancer based on competing risk model: a retrospective analysis based on the SEER database. *Ann Transl Med* 2023;11:179–179. <https://doi.org/10.21037/ATM-23-400>.
- [203] Znaor T, Vucemilo L, Kulis T, Znaor A. Incidence and mortality trends of head and neck cancer in Croatia in the period 1988-2008. *Acta Otolaryngol* 2013;133:305–12. <https://doi.org/10.3109/00016489.2012.743031>.
- [204] EU Country Cancer Profile: Croatia 2023. OECD; 2023. <https://doi.org/10.1787/372db8b8-en>.

- [205] Sitaru AM, Flondor D, Dinu Ș, Horhat ID, Iftode OA, Poenaru M, et al. Laryngeal malignancies – epidemiological data and particularities of the cases diagnosed in Western Romania (October 2016–July 2020). *Romanian Journal of Morphology and Embryology* 2022;63:153. <https://doi.org/10.47162/RJME.63.1.16>.
- [206] Ciolofan MS, Vlăescu AN, Mogoantă C-A, Ioniță E, Ioniță I, Căpitănescu A-N, et al. Clinical, Histological and Immunohistochemical Evaluation of Larynx Cancer. *Curr Health Sci J* 2017;43:367–75. <https://doi.org/10.12865/CHSJ.43.04.14>.
- [207] Markou K, Christoforidou A, Karasmanis I, Tsiropoulos G, Triaridis S, Constantinidis I, et al. Laryngeal cancer: epidemiological data from Northern Greece and review of the literature. *Hippokratia* 2013;17:313.
- [208] Allegra E, Bianco MR, Ralli M, Greco A, Angeletti D, de Vincentiis M. Role of Clinical-Demographic Data in Survival Rates of Advanced Laryngeal Cancer. *Medicina (B Aires)* 2021;57. <https://doi.org/10.3390/MEDICINA57030267>.
- [209] Spector JG, Sessions DG, Haughey BH, Chao KSC, Simpson J, El Mofty S, et al. Delayed regional metastases, distant metastases, and second primary malignancies in squamous cell carcinomas of the larynx and hypopharynx. *Laryngoscope* 2001;111:1079–87. <https://doi.org/10.1097/00005537-200106000-00028>.
- [210] Marijić B, Tudor F, Janik S, Grasl S, Frommlet F, Maržić D, et al. Long-Term Care and Follow-Up in Laryngeal Cancer Patients: A Multicenter Retrospective Analysis. *J Pers Med* 2023;13:927. <https://doi.org/10.3390/JPM13060927/S1>.
- [211] Elmusrati A, Wang J, Wang CY. Tumor microenvironment and immune evasion in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Oral Sci* 2021;13. <https://doi.org/10.1038/S41368-021-00131-7>.
- [212] Mathieu M, Budhu S, Nepali PR, Russell J, Powell SN, Humm J, et al. Activation of Sting in Response to Partial-Tumor Radiation Exposure. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2023. <https://doi.org/10.1016/J.IJROBP.2023.05.032>.
- [213] Storozynsky Q, Hitt MM. The Impact of Radiation-Induced DNA Damage on cGAS-STING-Mediated Immune Responses to Cancer. *Int J Mol Sci* 2020;21:1–22. <https://doi.org/10.3390/IJMS21228877>.
- [214] Yang D, Liu J, Liu N, Yin C, Zhang H, Xu J. The prognostic value of tumor mutational burden related 6-gene-based Risk Score in laryngeal cancer patients. *BMC Oral Health* 2022;22:510. <https://doi.org/10.1186/S12903-022-02534-2>.
- [215] Jiang M, Jiang M, Chen P, Chen P, Wang L, Li W, et al. CGAS-STING, an important pathway in cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol* 2020;13:1–11. <https://doi.org/10.1186/S13045-020-00916-Z/FIGURES/4>.
- [216] Han X, Cheng X, Dai K, Bao W, Ding R, Wan Y. Identification of immunocell infiltrates and effective diagnostic biomarkers in laryngeal carcinoma. *Medicine (Baltimore)* 2023;102:E32548. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000032548>.

- [217] Marletta S, Calìo A, Bogina G, Rizzo M, Brunelli M, Pedron S, et al. STING is a prognostic factor related to tumor necrosis, sarcomatoid dedifferentiation, and distant metastasis in clear cell renal cell carcinoma. *Virchows Arch* 2023;483:87–96. <https://doi.org/10.1007/S00428-023-03549-Y>.
- [218] Sokač M, Ahrenfeldt J, Litchfield K, Watkins TBK, Knudsen M, Dyrskjøt L, et al. Classifying cGAS-STING Activity Links Chromosomal Instability with Immunotherapy Response in Metastatic Bladder Cancer. *Cancer Res Commun* 2022;2:762–71. <https://doi.org/10.1158/2767-9764.CRC-22-0047>.
- [219] Zhang J, Zhang J, Li H, Chen L, Yao D. Dual-target inhibitors of PARP1 in cancer therapy: A drug discovery perspective. *Drug Discov Today* 2023;28. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2023.103607>.
- [220] Shen J, Zhao W, Ju Z, Wang L, Peng Y, Labrie M, et al. PARPi Triggers the STING-Dependent Immune Response and Enhances the Therapeutic Efficacy of Immune Checkpoint Blockade Independent of BRCAness. *Cancer Res* 2019;79:311–9. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-1003>.
- [221] Pantelidou C, Sonzogni O, Taveira MDO, Mehta AK, Kothari A, Wang D, et al. PARP Inhibitor Efficacy Depends on CD8+ T-cell Recruitment via Intratumoral STING Pathway Activation in BRCA-Deficient Models of Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Discov* 2019;9:722–37. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-1218>.
- [222] Pantelidou C, Jadhav H, Kothari A, Liu R, Wulf GM, Guerriero JL, et al. STING agonism enhances anti-tumor immune responses and therapeutic efficacy of PARP inhibition in BRCA-associated breast cancer. *NPJ Breast Cancer* 2022;8. <https://doi.org/10.1038/S41523-022-00471-5>.
- [223] Ding L, Kim HJ, Wang Q, Kearns M, Jiang T, Ohlson CE, et al. PARP Inhibition Elicits STING-Dependent Antitumor Immunity in Brca1-Deficient Ovarian Cancer. *Cell Rep* 2018;25:2972-2980.e5. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2018.11.054>.