

# Utjecaj infekcije humanim papiloma virusom i izražajnosti epidermalnog čimbenika rasta (EGF-a) na pločasti karcinom grkljana

---

**Kontić, Mirko**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2015**

*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:171:479508>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-29**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Mirko Kontić**

**UTJECAJ INFEKCIJE HUMANIM PAPILOMA  
VIRUSOM I IZRAŽAJNOSTI EPIDERMALNOG  
ČIMBENIKA RASTA (EGF-a)  
NA PLOČASTI KARCINOM GRKLJANA**

**Doktorska disertacija**

**Split, ožujak 2015.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Mirko Kontić**

**UTJECAJ INFEKCIJE HUMANIM PAPILOMA  
VIRUSOM I IZRAŽAJNOSTI EPIDERMALNOG  
ČIMBENIKA RASTA (EGF-a)  
NA PLOČASTI KARCINOM GRKLJANA**

**Doktorska disertacija**

**Split, ožujak 2015.**

Doktorska disertacija izrađena je u  
Klinici za bolesti uha, grla i nosa i kirurgiju glave i vrata KBC-a Split te u  
Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC-a Split.

Mentorica: prof. dr. sc. Valdi Pešutić - Pisac, dr. med.

Zahvaljujem:

Prof. dr. Valdi Pešutić - Pisac, mojoj mentorici, na stručnoj pomoći u svim stupnjevima nastajanja ovog rada, od ideje do obrane, te na riječima ohrabrenja koje su mi u nekim trenucima puno značile.

Prof. dr. Anti Rozgi, na iznimnoj stručnoj pomoći u izradi i dovršetku ovog istraživanja.

Prof. dr. Snježani Tomić, na stručnoj pomoći, korisnim savjetima i nadasve prijateljskoj potpori.

Kolegama i osoblju Klinike za bolesti uha, grla, nosa i kirurgiju glave i vrata splitskoga KBC-a na pomoći tijekom izrade ove disertacije.

Mojem prijatelju Ivici Čoviću, na nesebičnoj prijateljskoj potpori, od početka do kraja projekta, koja mi je puno značila.

Mojoj obitelji, supruzi Aniti, djeci Luciani i Antoniju, kojima sam morao ukrasti puno slobodnog vremena koje je njima pripadalo.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1. 1. GRKLJAN.....	1
1. 1. 1. Embriologija grkljana.....	1
1. 1. 2. Anatomija i histologija grkljana.....	2
1. 2. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA KARCINOMA GRKLJANA.....	3
1. 3. DIJAGNOSTIKA I TERAPIJA KARCINOMA GRKLJANA .....	5
1. 4. PLOČASTI KARCINOM GRKLJANA .....	6
1. 5. PROGNOСТИČKI ČIMBENICI KARCINOMA GRKLJANA.....	7
1. 5. 1. Standardni prognostički čimbenici karcinoma grkljana.....	8
1. 5. 2. Suvremeni prognostički čimbenici karcinoma grkljana.....	16
1. 6. INFEKCIJA HUMANIM PAPILOMA VIRUSOM (HPV) .....	18
1. 7. EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR (EGFR) .....	25
<b>2. CILJEVI I HIPOTEZE</b> .....	31
2. 1. CILJEVI .....	31
2. 2. HIPOTEZE.....	31
<b>3. METODE I ISPITANICI</b> .....	33
3. 1. ISPITANICI .....	33
3. 2. METODE .....	35
3. 2. 1. Imunohistokemijski postupci .....	37
3. 2. 2. Statistička obrada podataka.....	42
<b>4. REZULTATI</b> .....	43
4. 1. PRIKAZ RASPODJELE ISPITANIKA PREMA KLINIČKIM I PATOHIŠTOLOŠKIM OSOBINAMA .....	43
4. 2. PRIKAZ ODNOSA KLINIČKIH I PATOHIŠTOLOŠKIH OSOBINA.....	50
4. 3. PRIKAZ UTJECAJA HPV INFEKCIJE I IZRAŽAJNOSTI EGFR-A NA KLINIČKE I PATOHIŠTOLOŠKE OSOBINE KARCINOMA .....	55
4. 3. 1. Prikaz odnosa HPV pozitivnih karcinoma i kliničkih te patohistoloških osobina.....	55

4. 3. 2. Kategorijski prikaz odnosa HPV pozitivnih visokorizičnih karcinoma i ostalih karcinoma prema patohistološkim osobinama .....	58
4. 3. 3. Prikaz odnosa izražajnosti EGFR-a i kliničkih te patohistoloških osobina.....	64
4. 4. PRIKAZ ODNOSA HPV POZITIVNIH KARCINOMA I IZRAŽAJNOSTI EGFR-a	70
4. 4. 1. Prikaz značenja kliničkih i patohistoloških osobina te izražajnosti EGFR-a u HPV pozitivnih karcinoma za preživljenje ispitanika.....	73
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>79</b>
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>87</b>
<b>7. SAŽETAK.....</b>	<b>89</b>
<b>8. SUMMARY.....</b>	<b>90</b>
<b>9. LITERATURA .....</b>	<b>90</b>
<b>10. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>102</b>

## Popis oznaka i kratica

AJCC – Američko društvo za rak (engl. *American Joint Committee on cancer*)

bcl-1 – (PRAD1), regulatorna bjelančevina, kodira ciklin D1

bcl-2/bax – regulatorna bjelančevina apoptoze

c-erbB-2/neu – (HER 2) gen prigušivač tumora

C-faktor – engl. *certainty factor* (čimbenik sigurnosti)

Ciklin D1 (CCND1) protein-regulator staničnog ciklusa

CT – kompjuterizirana tomografija

DAB – diamino-benzidin

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

E-cadherin – epitelni *cadherin*

EGF – epidermalni čimbenik rasta

EGFR – receptor za epidermalni čimbenik rasta

HE – hemalaun eozin

HPV – humani papiloma virus

UICC – Međunarodna udruga za borbu protiv raka

Ki-67 – proliferacijski marker

MRI – magnetska rezonancija

nm23 – tumor-supresorski gen

PCNA – antigen jezgara proliferirajućih stanica

PCR – engl. *polymerase chain reaction* (lančana reakcija polimeraze)

PDGF – engl. *platelet-derived growth factor* (trombocitni čimbenik rasta)

p53 – tumor-supresorski gen (gen prigušivač tumora)

pRb – tumor-supresorski gen (gen prigušivač tumora)

R – rezidualni tumor

RET – gen, kodira receptor čimbenika rasta

RNA – ribonukleinska kiselina

TGF $\alpha$  - transformirajući čimbenik rasta-alfa

TNF  $\alpha$  – engl. *tumor necrosis factor alpha* (čimbenik tumorske nekroze)

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

UZV – ultrazvuk

VEGF – vaskularno endotelni čimbenik rasta



## **1. UVOD**

### **1. 1. GRKLJAN**

Grkljan se nalazi u prednjem gornjem dijelu vrata između trećega i šestoga vratnog kralješka (1). Skelet grkljana čine hrskavice spojene sindezmozama i zglobovima s mnogo elastičnih vlakana (2). Mišići grkljana, koji se dijele na vanjske i unutarnje, svojom kontrakcijom reguliraju odnose unutar hrskavično-membranoznog okvira, omogućujući njegove složene funkcije: respiraciju, fonaciju i deglutaciju (2, 3).

Primarne i vitalne funkcije grkljana su dišna i zaštitna funkcija (1). Pokretima laringealnih mišića regulira se veličina otvora glotisa, a kontrakcijom vanjskih mišića grkljan se u inspiriju spušta povećavajući negativan tlak u prsištu te tako pospješuje disanje (1). Zaštitna, odnosno degluticijska funkcija grkljana temelji se na mehanizmu sfinktera, koji se tijekom evolucije razvio u svrhu zaštite donjih dišnih putova od aspiracije (1). U grkljanu se nalaze tri sfinktera. Prvi čine epiglotis, ariepiglotski nabori i aritenoidi koji tijekom gutanja sprječavaju ulazak hrane i tekućine u donje dišne putove. Drugi sfinkter čine ventrikularni nabori koji dodatno pojačavaju djelovanje prvog sfinktera, uz povećavanje intratorakalnog tlaka. Treći sfinkter čine glasnice, koje također mehanički pojačavaju djelovanje proksimalnih sfinktera, ne dopuštajući ulazak ili izlazak zraka iz traheobronhalnog debla (1).

Fonacija se, kao sekundarna funkcija grkljana, razvila iz refleksogenog zatvaranja grkljana razvojem središnjega živčanog sustava i boljom diferencijacijom perifernih organa (1).

#### **1. 1. 1. Embriologija grkljana**

Osnova grkljana nastaje u četvrtom tjednu embrionalnog razvoja na ventralnoj strani kaudalnog dijela škržnog crijeva u obliku divertikuloidnog izbočenja (4). Izduženjem tog izbočenja u kaudalnom smjeru najprije nastaje laringotrahealna udubina ili brazda, koja se brzo pretvori u cijev pokrivenu endodermom iz koje se kasnije razvije respiracijski epitel (4). Od kranijalnog dijela laringotrahealne cijevi razvijaju se grkljan i dušnik, a od kaudalnog dijela, kad se on podijeli na dvije grane, nastaju bronhi i pluća (3, 4).

## 1. 1. 2. Anatomija i histologija grkljana

Skelet grkljana održava postojanost lumena dišnog puta, a njega čine čvrste, neparne, hijaline hrskavice, štitna (tireoidna) i krikoidna, te parne aritenoidne hrskavice (1, 2). Neparna epiglотиčna hrskavica je fibrokartilaginoznog podrijetla, što je čini elastičnom (1, 2). Ostale dvije male, elastične hrskavice (rožasta i štapičasta) nemaju veće značenje u funkciji grkljana (1, 2). Hijaline hrskavice kod muškaraca osificiraju (ovapnjuju) već u trećem desetljeću, a kod žena u četvrtom desetljeću života (2, 5). Dijelovi grkljana kojima nedostaje perihondrij (područje prednje komisure s Broyleovim ligamentom, spoj prednje četvrtine i tri stražnje četvrtine lamine tireoida, spoj krikotireoidne i krikotrahealne membrane te krikoaritenoidni zglob) jako su podložni karcinomskoj invaziji (5). Kombinacija nedostatka perihondrija i progresivne osifikacije hijalinih hrskavica može biti predilekcijski čimbenik širenja i invazije karcinoma (5). Šupljina grkljana anatomski se dijeli na tri razine: supraglotis, glotis i subglotis (1, 5, 6). Supraglotis uključuje suprahoidni i infraoidni epiglotis, laringealnu površinu ariepiglotskih nabora, aritenoide, ventrikularne nabore i Morgagnijev ventrikul (5, 6). Embriološki gledano, supraglotis nastaje kao derivat trećega škržnog luka, a glotis i subglotis nastaju kao derivati četvrtoga i petog škržnog luka (5). Prema tome, odrasli larinks sastoji se od dvije onkološki različite regije, čija granica prolazi kroz lateralni zid Morgagnijeva ventrikula. Zbog toga se po pravilu supraglottički tumori u svojem početnom stadiju ne šire ispod te granične linije (Alonso, 1954.g.) (7). Preepiglotski prostor koji je prvi opisao Boyer, nalazi se ispred epiglotis. Odozgo je omeđen hioepiglotskim ligamentom, odozdo infraoidnim epiglotisom, a prednje omeđenje čine hioid, tireoidna membrana i tireoidna hrskavica (5-7). Paraglotski prostor lateralno je omeđen tireoidnom hrskavicom, krikotireoidnom membranom i krikoidnom hrskavicom, a medijalno je omeđen kvadrangularnom membranom, ventrikulom i elastičnim konusom. Taj je prostor iznimno značajan u određivanju širenja karcinoma unutar larinksa. Invazija paraglotskog prostora bitno povećava stadij tumora i zahtijeva radikalniji kirurški pristup (5-7).

Glotis čine glasnice, tj. vokalni nabori, prednja i stražnja komisura. Donju granicu označava vodoravna ravnina smještena jedan centimetar ispod apeksa Morgagnijeva ventrikula (6). Subglotis je regija koja se prostire od donje granice glotisa do donjeg ruba krikoidne hrskavice (6). Višeslojni pločasti epitel pokriva glasnice i gornji dio vestibula grkljana, a višeredni cilindrični epitel s trepetljikama prekriva svu ostalu šupljinu grkljana (1, 6). Inervaciju grkljana osigurava *n. vagus* preko svojih ogranaka: *n. laryngeus inferior ili*

*reccurens* svojim motornim vlaknima inervira sve unutarnje mišiće grkljana. *N. laryngeus superior* dijeli se na dvije grane: vanjska grana je motorička i inervira krikotireoidni mišić, dok je unutarnja grana senzorička i inervira sluznicu grkljana iznad glotisa (1-3, 6). Vaskularizacijsku irigaciju grkljana opskrbljuju dvije arterije. Veći dio opskrbljuje *a. laryngea superior et media* iz *a. thyreoideae superior*, a manji dio *a. laryngica inferior* od *a. thyreoideae inferior* (2, 3). Limfna drenaža grkljana podijeljena je rubovima glasnica na dva dijela (6). Supraglotični dio ima bogatu submukoznu limfatičnu mrežu koja prelazi medijalnu liniju i nalazi se iznad glasnica, a limfne žile dreniraju se u preepiglotičke i gornje duboke cervikalne limfne čvorove vrata obostrano (2, 3, 6, 7). Glasnice gotovo nemaju limfne žilice tako da glotički dio ima vrlo slabu mrežu limfne drenaže, zbog čega se maligni tumori glotisa sporije šire i sporije metastaziraju (2, 6). Subglotis se drenira obostrano u prelaringealne, pretrahealne i donje duboke cervikalne limfne čvorove, te u gornji medijastinum (2, 3, 6, 7).

## **1. 2. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA KARCINOMA GRKLJANA**

Karcinomi grkljana najčešći su maligni tumori glave i vrata i obuhvaćaju 2-5 % svih zloćudnih tumora. Od svih tumora glave i vrata u RH rak grkljana prisutan je u 23 % slučajeva (8). Kad je riječ o dišnom sustavu, karcinom grkljana je prema zastupljenosti odmah iza karcinoma pluća. Stopa incidencije raka grkljana prema spolu, dobi i primarnom sijelu za godinu 2008. u RH iznosi 7,3 %, a ukupan broj novooboljelih prema istim parametrima iznosi 323 novootkrivena slučaja (8). Incidencija bolesti u trenutku dijagnosticiranja najveća je u životnoj dobi između petog i sedmog desetljeća za oba spola. U SAD-u je godine 1995. bilo približno oko 11.600 novootkrivenih slučajeva karcinoma grkljana, što je tada iznosilo nešto manje od 1 % od 1,252.000 novodijagnosticirana karcinoma općenito, isključujući malignome kože. Najviše pacijenata (79 %) s rakom grkljana su muškarci. Iste godine u SAD-u je bilo 4090 posljedičnih smrtnih ishoda bolesnika s karcinomima grkljana (9).

Zbog raširenije navike pušenja i konzumacije alkoholnih pića dominacija pojavnosti raka grkljana je na strani muške populacije i ona kod nas prema podacima iz godine 2008. iznosi 10:1. U svijetu je taj omjer spolne zastupljenosti u rasponu od 5:1 do 20:1 (8). Kad je u pitanju lokalizacija malignog procesa, u SAD-u je glotički karcinom nadmoćno iznad supraglotičkog karcinoma, u omjeru 2:1. Isti omjer nalazimo i u Francuskoj, gdje na dva dijagnosticirana slučaja karcinoma glotisa dolazi jedan slučaj karcinoma supraglotisa (10).

Gledajući u postotcima prema lokalizaciji karcinoma grkljana, 64 % čine glotički, 35 % supraglotički, a 1 % subglotički tumori (8).

Planocelularni (pločasti) karcinom glave i vrata najčešća je vrsta tumora sluznice gornjega respiratornog i probavnog sustava.

Etiologija pločastog karcinoma grkljana izrazito je složena i ovisi o velikom broju egzogenih čimbenika okoline (navika pušenja, konzumiranje alkoholnih pića, oštećenja sluznice grkljana kemijskim, termičkim i mehaničkim agensima, ionizirajuće zračenje, inhalacije čestica karcinogenih materija u svakodnevnom i profesionalnom životu i dr.). Pušenje i konzumacija alkoholnih pića združenim djelovanjem višestruko povećavaju rizik pojave bolesti (11). Rizik nastanka glotičkog karcinoma grkljana povećan je i za teške pušače koji ne konzumiraju alkohol, dok alkohol ima veće etiološko značenje u nastanku supraglotičkog karcinoma (12). Ostali čimbenici koji pridonose nastanku i razvoju bolesti uključuju kroničnu laringealnu iritaciju laringofaringealnim refluksom i virusne infekcije. Navedeni čimbenici dovode do multiplih molekularnih promjena stanica i nastanka tumora.

Na molekularnoj razini kod planocelularnih karcinoma glave i vrata dolazi do aktivacije onkogena i inaktivacije tumor supresorskih gena (13). Te dvije skupine gena u normalnim okolnostima imaju veoma značajne uloge u reguliranju staničnog ciklusa i diferencijaciji stanica. Promjena strukture i/ili funkcije tih gena naziva se aktivacijom. Poznata su tri mehanizma aktivacije onkogena: mutacija, translokacija i amplifikacija. Tumor supresorski geni kodiraju proteine koji inhibiraju stanični ciklus i sudjeluju u nadzoru popravka oštećenja DNA. Funkcija i/ili struktura tih gena vrlo je često promijenjena u stanicama raka. Proteinski produkti supresorskih gena inhibiraju staničnu proliferaciju, a gubitak njihove izražajnosti u stanicama tumora vodi k pojačanoj staničnoj proliferaciji, što ubrzava razvoj zloćudnog tumora (14). Kod pločastog karcinoma glave i vrata često je prisutna nestabilnost genoma, citogenetske aberacije, neravnoteža alela - gubitak heterozigotnosti i nestabilnost mikrosatelita, što govori u prilog neodgovarajućem sustavu popravka oštećenja DNA (13, 15, 16). Gen *p53* koji se smatra čuvarom genoma omogućuje apoptozu stanice s oštećenom DNA i time osigurava popravak oštećenja DNA (17, 18). Gubitak funkcije zbog mutacije *p53* gena uzrokuje rezistenciju na apoptozu. Osim gena *p 53* i drugi geni kao na primjer *Bcl-2* također sudjeluju u regulaciji apoptoze te tako i u patogenezi karcinoma (19-21).

Amplifikacija ili prekomjerna aktivnost gena čest je mehanizam aktivacije onkogeno kao što su *ras*, *myc*, *RET*, *Bcl-1*, *Bcl-2*, *erb-B2* i dr. Prospektivna studija Rodriga i sur. uspoređivala je genetske alteracije tri različita sjela tumora glave i vrata (larinks, orofarinks i hipofarinks). Pronađena je nešto veća frekvencija amplifikacije u hipofaringealnih karcinoma (19 %). Onkogen *myc* amplificiran je u 4-15 % karcinoma glave i vrata, a onkogen *erb-B1* koji kodira receptor epidermalnog čimbenika rasta (EGFR) nađen je amplificiran u 7-25 % karcinoma glave i vrata. Hipofaringealni karcinomi pokazali su čak i veću amplifikaciju (29 %). Mogući rezultat ovakve distribucije leži u činjenici da se tumori koji proizlaze iz različitih sjela glave i vrata različito klinički ponašaju (22).

Sve veći broj eksperimentalnih i *in vitro* dokaza upućuje na to da barem neki dio karcinoma gornjeg aerodigestivnog trakta (GADT) nosi relativno velik broj kopija DNA HPV-a. U ovim tumorima otkriva se transkripcija proteina E6/E7 i klonalna veza s HPV-om. Kombinirane studije koje su dobro dizajnirane s pouzdanim i neinvazivnim detekcijama virusa u konačnici će pomoći istraživačima da rasvijetle ulogu HPV-a u razvoju tumora gornjeg aerodigestivnog trakta. U te studije će se morati obvezno uvrstiti i egzogeni čimbenici rizika kao što su pušenje, alkohol i konzumacija betela (indijskog oraščića). Oni svakako predstavljaju čimbenike s jakim utjecajem na razvoj karcinoma GADT-a (23).

### **1. 3. DIJAGNOSTIKA I TERAPIJA KARCINOMA GRKLJANA**

Klinička podjela zloćudnih tumora larinksa naročito je opravdana zbog evidentnih simptomatoloških, prognostičkih i terapijskih razlika i pristupa. Najznačajniji i često najraniji simptomi su promuklost i/ili poteškoće s gutanjem, ovisno o lokalizaciji tumora (1, 5). Ostali simptomi kao što su respiracijska insuficijencija, dispneja, stridor, disfagija i odinofagija sreću se kod uznapredovalih karcinoma (5). U dijagnostički algoritam karcinoma grkljana ubrajamo: anamnezu, otorinolaringološki pregled, indirektnu laringoskopiju, rigidnu endovideo laringoskopiju, fiberendoskopiju grkljana, indirektnu laringomikro-stroboskopiju, digitalnu endovideo-stroboskopiju, akustičku i kompjutorsku analizu glasa, UZV vrata, citološku obradu i analizu punktata, CT grkljana i vrata, MRI grkljana i vrata, laringomikroskopiju i probatornu biopsiju uz patohistološku analizu (5).

Liječenje karcinoma grkljana zahtijeva multidiscipliniran pristup, kako zbog kompleksnosti građe i funkcije grkljana, tako i zbog različitosti u ponašanju i agresiji tumora, ovisno o

njegovoj lokalizaciji. Ono može biti zasebno kirurško ili onkološko, ali i u kombinacijama. Terapija ranih karcinoma grkljana može biti kirurška (LASER CO2 endoskopska kirurgija, otvorena parcijalna-prezervacijska kirurgija) i onkološka (radioterapija) (5).

Liječenje uznapredovalih karcinoma grkljana može biti također kirurško (LASER CO2 endoskopska kirurgija, otvorene parcijalne laringektomije koje opet mogu biti okomite, vodoravne i kombinacijske, otvorene parcijalne laringofaringektomije, totalne laringektomije, totalne faringolaringektomije) i onkološko, koje uključuje radioterapiju, kemoterapiju, kemoradioterapiju. U kombinacijama kirurškog i onkološkog liječenja svakako treba koristiti multidisciplinarnan pristup (5).

#### **1. 4. PLOČASTI KARCINOM GRKLJANA**

Pločasti (planocelularni) karcinom glave i vrata najčešća je vrsta tumora sluznice gornjeg respiratornog i probavnog sustava. U literaturi se navodi da je 90 % pa i više tumora tipa pločastog karcinoma, a ostalih 10 % čine adenokarcinomi, nediferencirani karcinomi, mukoepidermoidni karcinomi i drugi rijetki maligni tumori. Planocelularni karcinom nastaje iz mnogoslojnog pločastog epitela ili iz cilindričnog epitela nakon njegove pločaste metaplazije. Preciznije rečeno, on nastaje kao posljedica brojnih molekularnih promjena induciranih čimbenicima okoline (pušenje, konzumacija alkohola i dr.), ponekad virusima uz genetsku predispoziciju (15, 24). Genetska predispozicija očituje se kao nemogućnost metaboliziranja karcinogena ili prokarcinogena, te neučinkovitosti sustava popravka oštećenja DNA (15, 24, 25). Gornji respiratorni i probavni sustav prekriven je sluznicom koja je najvećim dijelom građena od mnogoslojnog pločastog epitela, osim dijelova sluznice larinksa koji su građeni od višerednog cilindričnog epitela. Tumori koji nastaju na sluznici građenoj od mnogoslojnog pločastog epitela imaju jedinstvenu histološku sliku pločastog karcinoma. Njegova značajka je pločasta diferencijacija tumorskih stanica i invazivni rast. Pločasta diferencijacija izražava se keratinizacijom s formiranjem „perli“. Invazivni rast očituje se probijanjem bazalne membrane, infiltracijom podležećeg tkiva te infiltracijom krvnih žila i živaca (26). Planocelularni karcinom može biti i nekeratinizirajući (27). Ovi se tumori mogu podijeliti u dobro diferencirane, srednje diferencirane i slabo diferencirane.

## 1. 5. PROGNOŠTIČKI ČIMBENICI KARCINOMA GRKLJANA

Prognoštički čimbenici koji se uobičajeno koriste u odabiru liječenja su veličina i lokalizacija primarnog tumora, prisutnost metastaza u regionalnim limfnim čvorovima te prisutnost udaljenih metastaza. Općenito, prognoštičke čimbenike dijelimo u tri glavne i međusobno povezane podskupine: prognoštičke čimbenike vezane za bolesnika (starost, spol, genetika, rasa), čimbenike vezane za tumor (patohistološke značajke tumora, histološki gradus, pojava, lokalizacija i širenje metastaza, izražajnost biokemijskih, hormonskih i tumorskih biljega i dr.) te prognoštičke čimbenike, vezane za tip primijenjene terapije (operativna terapija, primarna ili adjuvantna radioterapija, kemoterapija, ili njihove kombinacije).

Stadij bolesti u trenutku postavljanja dijagnoze planocelularnog karcinoma glave i vrata najvažniji je prognoštički čimbenik (28). U stadiju bolesti prema klasifikaciji AJCC objedinjeni su veličina tumora, status limfnih čvorova vrata i prisutnost udaljenih metastaza (TNM status) (28). Navedeni parametri smatraju se standardnim prognoštičkim čimbenicima.

Razvojem molekularne onkologije u posljednje se vrijeme kao suvremeni prognoštički čimbenici primjenjuju i proliferacijski biljezi (npr. PCNA, *Ki 67*), onkogeni (npr. *p53*, *pRb*, EGFR), regulatorne bjelančevine apoptoze (npr. *bcl-2/bax*), regulatori angiogeneze (npr. VEGF), regulatorne bjelančevine staničnog ciklusa (npr. ciklin D1) te razni tumorski biljezi (npr. CEA, CA 19-9, PSA i dr.).

## 1. 5. 1. Standardni prognostički čimbenici karcinoma grkljana

### 1. 5. 1. 1. TNM klasifikacija karcinoma grkljana

TNM sustav (tumor, nodus, metastaza) za određivanje proširenosti tumora od neprocjenjive je vrijednosti za planiranje liječenja i određivanje prognoze. Sustav za određivanje stadija raka polazi od načela da tumor počinje od jedne stanice, da se nakon rasta na ishodišnome mjestu najprije širi u okolna tkiva, potom u regionalne limfne čvorove, a nakon toga u udaljene dijelove tijela, gdje stvara udaljene metastaze. Stručnjaci UICC-a razradili su sustav za definiranje svake od triju komponenata širenja tumora: primarni tumor (T), regionalni limfni čvorovi (N) i udaljene metastaze (M) (29).

#### Primarni tumor (T)

**TX** Primarni tumor se ne može odrediti.

**T0** Nema znakova primarnog tumor.

**Tis** *Tumor in situ.*

#### *Supraglotis*

**T1** Tumor ograničen na jedno područje supraglotisa uz urednu pokretljivost glasnica.

**T2** Tumor zahvaća više od jednog područja supraglotisa, ili glotis, ili regiju izvan supraglotisa (sluznicu korijena jezika, valekule, medijalni zid piriformnog sinusa) uz urednu pokretljivost glasnica.

**T3** Tumor ograničen na područje grkljana s fiksacijom glasnica i/ili širenjem na postkrikoidno područje, preepiglotski prostor, paraglotski prostor, i/ili početna erozija tireoidne hrskavice grkljana (unutarnjeg korteksa).

**T4a** Tumor se širi kroz tireoidnu hrskavicu i/ili na druga tkiva izvan grkljana (npr. dušnik, meka tkiva vrata uključujući duboku ekstrinzičnu muskulaturu jezika, infrahioidne mišiće, štitnjaču ili jednjak).



**T4b** Tumor se širi na prevertebralni prostor, zahvaća karotidnu arteriju ili zahvaća medijastinalne strukture.

### *Glottis*

**T1** Tumor ograničen na glasnicu(e) – može uključivati prednju i stražnju komisuru s urednom pokretljivošću glasnice(a).

**T1a** Tumor ograničen na jednu glasnicu.

**T1b** Tumor zahvaća obje glasnice.

**T2** Tumor se širi na supraglotis i/ili subglotis, ili slabi pokretljivost glasnice(a).

**T3** Tumor ograničen na grkljan s fiksacijom glasnice(a), i/ili zahvaća paraglotski prostor, i/ili minimalno erodira tireoidnu hrskavicu grkljana (unutarnji korteks).

**T4a** Tumor se širi kroz tireoidnu hrskavicu i/ili zahvaća tkiva izvan grkljana (npr. dušnik, meka tkiva vrata uključujući duboku ekstrinzičnu muskulaturu jezika, infrahioidne mišiće, štitnjaču ili jednjak).

**T4b** Tumor se širi na prevertebralni prostor, zahvaća karotidnu arteriju ili zahvaća medijastinalne strukture.

### *Subglottis*

**T1** Tumor ograničen na subglotis.

**T2** Tumor se širi na jednu ili obje glasnice s normalnom ili poremećenom pokretljivošću.

**T3** Tumor ograničen na grkljan s fiksacijom glasnice(a).

**T4a** Tumor zahvaća krikoidnu ili tireoidnu hrskavicu i/ili druga tkiva izvan grkljana (npr. dušnik, meka tkiva vrata uključujući duboku ekstrinzičnu muskulaturu jezika, infrahioidne mišiće, štitnjaču ili jednjak).

**T4b** Tumor se širi na prevertebralni prostor, zahvaća karotidnu arteriju ili zahvaća mediastinalne strukture.

### **Regionalni limfni čvorovi (N)**

**NX** Regionalni limfni čvorovi ne mogu se odrediti.

**N0** Nema znakova zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova.

**N1** Metastaza u jednom ipsilateralalnom limfnom čvoru, u najvećem promjeru do 3 cm.

**N2** Metastaza u jednom ipsilateralalnom limfnom čvoru, većem od 3 cm, ali ne većem od 6 cm u najvećem promjeru, ili u multiplim ipsilateralalnim limfnim čvorovima, ne većima od 6 cm u najvećem promjeru, ili u bilateralnom ili kontralateralnom limfnom čvoru, ne većem od 6 cm u najvećem promjeru.

**N2a** Metastaza u jednom ipsilateralalnom limfnom čvoru, većem od 3 cm, ali ne većem od 6 cm u najvećem promjeru.

**N2b** Metastaze u multiplim ipsilateralalnim limfnim čvorovima, ne većima od 6 cm u najvećem promjeru.

**N2c** Metastaze u bilateralnim ili kontralateralnim limfnim čvorovima, ne većima od 6 cm u najvećem promjeru.

**N3** Metastaze u limfnim čvorovima, većima od 6 cm u najvećem promjeru.

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

**MX** Udaljene metastaze ne mogu se odrediti.

**M0** Nema udaljenih metastaza.

**M1** Udaljene metastaze prisutne.

## Stadiji bolesti

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

### **1. 5. 1. 2. Izborni deskriptori klasifikacije karcinoma grkljana**

Izborni deskriptori dodatno prikazuju osobine karcinoma grkljana (30).

#### **L - Limfna invazija**

**LX** Limfna invazija ne može se procijeniti.

**L0** Nema limfne invazije.

**L1** Limfna invazija.

#### **V - Venska invazija**

**VX** Venska invazija ne može se procijeniti.

**V0** Nema venske invazije.

**V1** Mikroskopska venska invazija.

**V2** Makroskopska venska invazija.

Napomena: Makroskopska infiltracija stijenke vene (bez tumora unutar vene) klasificirana je kao V2 (30).

#### **R - Rezidualni tumor**

Odsutnost ili prisutnost ostatnog tumora nakon tretmana opisao je simbol R (30).

TNM je opisao anatomsku proširenost tumora u cjelini bez uzimanja u obzir tretmana (30).

On se može dopuniti R-klasifikacijom, koja se bavi tumorskim statusom nakon tretmana (30).

To odražava učinke terapije, utječe na daljnje terapijske postupke i snažan je prediktor prognoze (30).

**RX** Prisutnost ostatnog tumora ne može se procijeniti.

**R0** Nema ostatnog tumora.

**R1** Mikroskopski ostatni tumor.

**R2** Makroskopski ostatni tumor.

## **C-FAKTOR**

C-faktor (engl. *certainty*) ili čimbenik sigurnosti odražava valjanost klasifikacije u skladu s dijagnostičkim metodama (30). Njegova uporaba nije obvezna (30).

C-faktor definicije su:

**C1** Dokazi iz standardnih dijagnostičkih sredstava (npr. inspekcija, palpacija, standardna radiografija, indirektolaringoskopski pregled, endovideostroboskopski pregled, endoskopija).

**C2** Dokazi pribavljeni posebnim dijagnostičkim sredstvima (npr. rendgenska snimanja u posebnim projekcijama, angiografija, scintigrafija, ultrazvuk (UZ), kompjuterizirana tomografija (CT), magnetska rezonancija (MR), laringomikroskopija).

**C3** Dokazi iz istraživanja, uključujući kirurške i citološke biopsije.

**C4** Dokaz o stupnju bolesti nakon konačne operacije i patološkog pregleda reseciranog uzorka.

**C5** Dokazi iz obdukcije.

TNM klinička podjela je dakle ekvivalent C1, C2, C3 na različitim stupnjevima sigurnosti, dok je pTNM jednaka C4 (30).

### **1. 5. 1. 3. Tipovi stanične diferencijacije (patohistološki gradus) karcinoma grkljana**

Pločasti karcinom grkljana klasificira se u tri patohistološka gradusa (12, 31).

#### **Gradus I. (dobro diferencirani pločasti karcinom)**

Karakteriziraju ga poligonalne stanice, dobro razvijeni intercelularni mostići i obilan broj keratiniziranih perli. Jezgre su hiperkromatske, nejednake veličine i oblika, sa smanjenom količinom citoplazme. Stroma tumora je oskudna.

#### **Gradus II. (umjereno diferencirani pločasti karcinom)**

Karakterizira ga oskudan broj keratiniziranih perli ili njihova odsutnost. Uočava se polimorfija jezgara, brojne (često atipične) mitoze, a mogu biti prisutne i multinuklearne stanice. Intercelularni mostići su rjeđi .

#### **Gradus III. (slabo diferencirani pločasti karcinom)**

Karakteriziraju ga malobrojne epitelne perle, gotovo da nema keratinizacije i intercelularnih mostića. Predominiraju nezrele stanice s brojnim atipičnim mitozama, uz izrazitu polimorfiju stanica i jezgara.

Iako je keratinizacija najčešće prisutna u dobro i umjereno diferenciranim pločastim karcinomima, to se ne bi trebalo smatrati važnim histološkim kriterijem u stupnjevanju stanične diferenciranosti pločastog karcinoma grkljana (32).

#### **1. 5. 1. 4. Značenje standardnih prognostičkih čimbenika karcinoma grkljana**

Dosadašnja istraživanja utvrdila su značenje sljedećih standardnih prognostičkih čimbenika:

1. Klinički stadij i lokalizacija međusobno su povezani čimbenici, a promatramo ih u odnosu na petogodišnje preživljenje: za glotičke karcinome 80 % (stadij I. 90 %; II. 85 %; III. 60 %; IV. < 5 %), za supraglotičke karcinome 65 % (stadij I. 85 %; II. 75 %; III. 45 %; IV. < 5 %), za subglotičke karcinome 40 % te za transglotičke karcinome 50 % (33, 34). Najvažniji prognostički čimbenik u trenutku postavljanja dijagnoze planocelularnog karcinoma glave i vrata pa tako i grkljana je stadij bolesti (28).
2. Veličina tumora također je značajan prognostički čimbenik. Veličina tumora proporcionalna je sklonosti povratu (recidivu) (35).
3. Patohistološki stupanj diferencijacije (gradus) tumorskih stanica neovisan je prognostički čimbenik (12). Razlikujemo sljedeće stupnjevanje: gradus I. - dobro diferencirani karcinom, gradus II. - srednje diferencirani karcinom, i gradus III. - slabo diferencirani karcinom (12). Patohistološki gradus tumora ima ograničenu vrijednost u predviđanju tijeka bolesti (27). Dobro diferencirani tumori imaju bolju prognozu od slabo diferenciranih (12).
4. Zahvaćenost limfnih čvorova u trenutku dijagnoze također ima prognostičko značenje (28). Za tumore grkljana postoji izravna korelacija između veličine tumora i postojanja metastaza na vratu. Prognoza ovisi o broju zahvaćenih čvorova, njihovoj veličini i eventualnoj ektranodalnoj invaziji. Najvažniji pojedinačni prognostički čimbenik pločastog karcinoma glave i vrata pa tako i grkljana je zahvaćenost limfnih čvorova vrata (13, 28). Bolesnici sa zahvaćenim limfnim čvorovima imaju 50 % manju vjerojatnost

petogodišnjeg preživljenja u usporedbi s bolesnicima s tumorom ograničenim na primarnu lokalizaciju, bez obzira na primijenjeno liječenje (28).

5. DNA ploidiya ima također prognostičko značenje, dokazano je da aneuploidni tumori imaju lošiju prognozu od diploidnih tumora (36). Postotak aneuploidnih tumora u Rodrigovoj studiji iznosio je 58 %. Većina laringealnih karcinoma bili su diploidni, dok su faringealni statistički značajno ( $p = 0.03$ ) češće bili aneuploidni. Time se može objasniti veća agresivnost faringealnih tumora jer se lošija prognoza može očekivati kod aneuploidnih tumora (22).

U značajne prediktore ukupnog preživljenja spadaju i opće stanje bolesnika te komorbiditet. Iako je prognostička vrijednost navedenih standardnih čimbenika već odavno dokazana, za evaluaciju planiranja liječenja i predviđanja ponašanja planocelularnih karcinoma glave i vrata i dalje postoje tendencije prema istraživanju novih prognostičkih prediktora.

### **1. 5. 2. Suvremeni prognostički čimbenici karcinoma grkljana**

Značajke malignih tumora koje se ne mogu dobiti rutinskom patohistološkom obradom i analizom, mogu se tražiti obradom i analizom suvremenih prognostičkih čimbenika. Obično se izvode testovi proliferacijske aktivnosti i genske amplifikacije (37, 38).

Najčešća istraživanja u karcinogenezi karcinoma grkljana obuhvaćaju onkogene kao što su *p53*, *p16* i ciklin D1, proliferacijske biljege tipa EGFR, *Ki-67*, PCNA (37, 38), i sve prisutniju dijagnostiku HPV karcinogena.

Kod pločastog raka glave i vrata često je prisutan neodgovarajući sustav popravka oštećenja DNA (13, 15, 16). Mehanizam popravka oštećenja DNA ovisi o kontroli staničnog ciklusa i kapacitetu popravka DNA, pri čemu važnu ulogu imaju čimbenici kao što su inaktivacija tumor supresorskog gena *p53* i *p16* i amplifikacija onkogeno *Bcl-1* koji kodira ciklin D1 (15). Poremećaj funkcije produkta *p53* dovodi do nestabilnosti genoma (17). Mutacije gena *p53* nalaze se u otprilike 60 % planocelularnih karcinoma glave i vrata (13, 18, 39), a povezanost s prognozom različita je u različitim studijama. Mnoge mutacije *p53* gena stabiliziraju protein, čineći ga pogodnim za imunohistokemijsku detekciju, dok u normalnim stanicama divlji tip proteina nije moguće detektirati (21). S druge strane, izražajnost mutiranog *p53* gena



zamijećena je u preinvazivnim lezijama gornjeg probavnog i dišnog sustava, navodeći na zaključak kako su abnormalnosti *p53* gena uobičajen rani događaj u razvoju planocelularnog karcinoma glave i vrata (21).

Amplifikacija ciklina D1 (CCND 1) i prekomjerna izražajnost ciklina D1 otkrivene su i u tumorima glave i vrata, posebice u pločastom karcinomu grkljana (20 %), a povezuju se sa lošijom prognozom. One su proučavane u isto vrijeme u pacijenata s pločastim karcinomom grkljana u tumorskim i peritumorskim tkivima. Kad se otkrije amplifikacija CCND1, ciklin D1 uvijek je prekomjerno izražen, s time da prekomjerna izražajnost ciklina ne implicira odmah i gensku amplifikaciju (40). Amplifikacija ciklina D1 može se smatrati nezavisnim negativnim prognostičkim biljekom, kao što je izražajnost EGFR i alteracije gena *p53* u pločastim karcinomima glave i vrata (40). Povećana izražajnost ciklina D1 povezana je s tumorskom biološkom agresivnošću, slabom diferencijacijom, povećanom stopom proliferacije i inhibicije diferencijacije u staničnim kulturama (40).

Amplifikacija kromosoma *11q13* opisana je u 20-50 % karcinoma glave i vrata kao najčešća onkogeno alteracija. Veći postotak amplifikacije nađen je u hipofaringealnih karcinoma i to bi moglo objasniti veću agresivnost tih tumora, znajući da je amplifikacija kromosoma *11q13* u više studija povezana s nodalnim metastazama, povećanom lokalnom agresivnošću i višom incidencijom povrata tumora (22, 40).

Izražajnost proliferacijskog biljega EGFR-a smatra se najpouzdanijim prognostičkim molekularnim biljekom za procjenu preživljenja bez povrata bolesti i bez metastaza (41, 42). Pojačana izražajnost gena za EGFR prisutna je u više od 65 % tumora. Njegove povećane izražajnosti u normalnom epitelu, premalignim lezijama i planocelularnom karcinomu (18, 39, 43, 44) također se povezuju s lošijom prognozom (13, 18, 44, 45). Osim navedenih, kao suvremeni prognostički biljezi u tumorskim stanicama mogu se detektirati učinci metaloproteinaze, hijaluronidaze, katepsina D i *E-cadherina*, a to su produkti odgovorni za degradaciju ekstracelularnog matriksa (46). U posljednjih dvadesetak godina povećalo se zanimanje za HPV-e zbog njihove potencijalne uloge u patogenezi malignih tumora. Povezanost između virusne infekcije i nastanka tumora dokazivana je u nekoliko objavljenih studija, ali u različitim istraživanjima prisutnost HPV-a ima varijabilan udio u ukupnom broju karcinoma. HPV DNA sojevi 16 i 18 otkriveni su u uzorcima pločastih karcinoma glave i

vrata s promjenjivom incidencijom (10-54 %) (47-50). Prava uloga HPV-a u karcinogenezi tumora glave i vrata do sada nije u potpunosti razjašnjena (12, 17, 39).

## 1. 6. INFEKCIJA HUMANIM PAPILOMA VIRUSOM (HPV)

Papiloma virusi su DNA virusi koji pripadaju obitelji *Papoviridae*. Humani papiloma virusi pokazuju značajnu pluralnost različitih genotipova. Do danas je identificirano i potpuno sekvencionirano gotovo 200 tipova virusa od kojih neki mogu uzrokovati nastanak dobroćudnih i zloćudnih promjena kože i sluznica. Svi poznati HPV tipovi svrstani su na osnovi sličnosti njihova genoma unutar pet rodova ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\nu$ ) i 33 vrste. Približno 40 HPV tipova roda  $\alpha$  inficira sluznički epitel, a 12 tipova se povezuje sa lezijama iz kojih nastaje karcinom (51). HPV tipovi tradicionalno su podijeljeni u tri klase rizika: visoko rizični (tipovi 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 56, itd.), srednje rizični (tipovi 31, 33, 35, 39, 51, 52, 58, 61, itd.) i nisko rizični (tipovi 6, 11, 30, 42, 43, 44, 53, 54, 55, itd.) (52). Takva klasifikacija načinjena je na osnovi karcinogeneze raka grlića maternice, koji je prvi povezan sa HPV infekcijom. Međunarodna agencija za istraživanje raka definira sojeve 16 i 18 kao sigurne karcinogene u ljudi, a HPV 31 i 33 kao vjerojatne karcinogene. Vezu između papiloma virusa, epitelnih, displastičnih i neoplastičnih lezija u raznim tkivima vrlo je teško pronaći zbog velikog broja sojeva HPV-a s različitim genetičkim i onkogenim svojstvima. Tip HPV-a koji inficira genitalni sustav odgovara onom koji inficira laringealnu sluznicu (53, 54). Grkljan i grlić maternice imaju histološke sličnosti, oboje sadrže prijelazna područja epitela i nose slične HPV-om povezane benigne lezije, pa je opravdano razmišljati da dijele i zajedničku etiologiju. Veoma indikativna činjenica je da žene koje su imale karcinom grlića maternice imaju dva do četiri puta veći rizik za razvoj karcinoma grkljana ili usne šupljine (55).

Prevalencija HPV DNA kod karcinoma grkljana u literaturi se kreće u rasponu od 0 % do 100 %. Te razlike u rezultatima dijelom se mogu objasniti korištenjem različitih metoda detekcije, jer se većina studija nije služila osjetljivijim metodama detekcije virusa. Izravna detekcija ISH (*in situ hibridisatio*), koja je češće opisivana, manje je osjetljiva od tehnika PCR (*polymerase chain reaction*) (56, 57). Genom HPV tip 16 dokazan je u svim slučajevima, a virusna infekcija uvijek prethodi neoplastičnoj transformaciji. Ipak, HPV se smatra sučimbenikom, ali ne i glavnim uzrokom nastanka karcinoma grkljana, što ga bitno razlikuje od genitalnog tipa gdje je HPV visokog rizika pronađen u 100 % obrađenih uzoraka (57). Drugi onkogeni HPV

sojevi otkriveni u karcinomu grlića maternice (HPV 31, 33, 35, 45, 56, 58, 59) rijetko su otkriveni u karcinomima glave i vrata. Niskorizični soj HPV 6 prisutan je u velikom broju pločastih karcinoma glave i vrata odmah iza najzastupljenijih sojeva HPV-a, 16 i 18 (53, 54). Smatra se da prolongirana HPV infekcija omogućuje akumulaciju genskih oštećenja zbog interakcije virusnih onkoproteina s genomom domaćina, a to rezultira postupnom progresijom prema malignoj konverziji. Stoga ulogu HPV-a u karcinogenezi grkljana objašnjavamo viralnom integracijom u genom stanice domaćina (58, 59). Kao i u karcinogenezi grlića maternice, u tumorima glave i vrata, a posebice u laringealnim tumorima, HPV integriran u genom stanice stječe „transformirajuću“ moć (59). Transformirajuće genomske regije HPV-a vjerojatno uključuju onkoproteine E6 i E7, a njihova moć ovisi primarno o njihovim mogućnostima da vežu proteine kao što su *p53* i *pRB* uključene u DNA popravak i regulaciju staničnog ciklusa (20, 40, 60). Gen *p53* smatra se čuvarom genoma, jer omogućuje apoptozu stanice oštećene DNA i time osigurava popravak oštećenja DNA (17, 18). Gubitak funkcije *p53* uzrokuje rezistenciju na apoptozu (19). Protein E6 HPV tipa 16 i 18 mijenja strukturu proteina *p53*, a protein E7 ostvaruje čvrstu vezu sa *pRB*, koji je glavni inhibitor regulacije staničnog ciklusa (20, 40, 60). Prema rezultatima nekih studija virusni karcinogeni E6 i E7 HPV 16 su u mogućnosti „zaštititi“ karcinomske stanice od apoptoze (19). Studije koje su proveli Du sa suradnicima i Hoffmann sa sur. došle su do zaključka da su stanice laringealnog karcinoma pozitivne na virusne onkoproteine E6 ili E7 HPV-a 16 manje osjetljive na apoptozu od onih koje nisu pozitivne na HPV 16 (19, 20). Druga Duova studija nije u potpunosti razjasnila interakciju onkoproteina HPV 16 i nekih čimbenika rasta (npr. NFkB), premda je dokazala njihovu pojačanu izražajnost u jezgrama stanica laringealnog karcinoma (61). Interakcije između onkoproteina E6 i E7 te staničnih proteina potrebne su virusima za povećavanje stope proliferacije zaraženih stanica, smanjujući ovisnost o apoptotičnim čimbenicima rasta i staničnoj osjetljivosti (40). Postotak ugradnje virusnog karcinogena E6 HPV 16 u Rodrigovoj studiji otkriven je u 24 % slučajeva i nije ovisio o sijelu (22). Protein HPV E5 također bi mogao igrati ulogu u karcinogenezi, osobito u prvim stadijima prema transformaciji, inducirajući povećani odgovor na endogene čimbenike rasta i pojačanu izražajnost EGFR-a (40). Ne smiju se zanemariti ni egzogeni rizični čimbenici dovedeni u vezu s HPV-om, čime se povezuje djelovanje nikotina i/ili alkohola s virusnom integracijom (58), a zanimljiv je podatak dokazane visoke učestalosti HPV-a kod ljudi koji žvaču oraščiće betela (*betel quide chewers*) (23, 60).

Virusna transmisija u djece je i dalje kontroverzna (perinatalna transmisija, auto i hetero inokulacija, seksualno iskorištavanje i dr.). Još uvijek je nejasno koliko često perinatalna infekcija rezultira genitalnom, laringealnom ili oralnom lezijom. Teorija izloženosti novorođenčadi cervikalnoj HPV infekciji majke smatra se najrealnijom (62). Način transmisije *inutero* je nepoznat, premda bi virus teoretski mogao onamo dospjeti hematogeno, spermom ili kao ascedentna infekcija. Uvijek treba misliti na mogućnost nastanka HPV infekcije ranije u životu, putem oralne ili respiratorne sluzničke transmisije (62). Osim navedenih, poznata je i transfuzijska virusna transmisija. Szladek i sur. opisali su koinfekciju HPV-a i genogroup 1 TTV (*transfusiontransmitted virus*). TTV DNA pronađen je u orofaringealnoj sluznici i žlijezdama slinovnicama, a povezuje se s lošijom prognozom bolesti (56).

Što se tiče uloge HPV-a u nastajanju i razvoju karcinoma glave i vrata, neka epidemiološka istraživanja potvrdila su HPV kao nezavisni čimbenik rizika za nastanak karcinoma usne šupljine. Studije koje su obrađivale uzorke karcinoma usne šupljine, dokazale su prisutnost HPV DNA u rasponu od 20 do 50 %, s najvećom prevalencijom HPV-a kod karcinoma tonzila. Zastupljenost HPV-a kod karcinoma tonzila od 51 % među najvišim je od bilo kojeg malignog ekstragenitalnog tumora (53). HPV sojevi 16 i 18 dominantno su dokazivani u planocelularnim karcinomima usne šupljine, tonzila, ždrijela i čeljusnih sinusa (20, 53, 63), a HPV soj 16 pronađen je u 20-90 % slučajeva karcinoma orofarinksa (54, 55) i 25 % slučajeva karcinoma grkljana (53, 54). Razlike u postotcima djelomično se mogu objasniti tehnikama uzorkovanja i različitim metodama detekcije virusa (54). Zanimljivim se čini podatak da su onkološki bolesnici pozitivni na HPV soj 16 imali bolji tijek bolesti i veću stopu preživljenja od onih u kojih nije nađena prisutnost HPV DNA (53). Veći broj studija objavilo je da se HPV pozitivni pločasti karcinomi sa specifičnim patohistološkim osobinama javljaju na određenim predilekcijskim mjestima kao što je limfno-epitelno tkivo tonzila, tj. Waldeyerov prsten (54, 64).

Karcinomi pločastih stanica glave i vrata obično se dovode u vezu s bolesnicima starijim od šezdeset godina i s dužim alkoholno-duhanskim abuzusom, a rijetko u mlađih osoba, bez obzira na poznate čimbenike rizika. Nekoliko studija prikazalo je visoku učestalost HPV DNA i kod mlađih bolesnika (< 60 god.) oboljelih od planocelularnog karcinoma glave i vrata (65). Ove studije nisu dokazale koji je od navedenih DNA virusa integriran u genomu domaćina. El-Moftyjeva skupina autora proučavala je trideset i tri slučaja karcinoma pločastih

stanica nekoliko regija glave i vrata kod pacijenata mlađih od 40 godina. HPV DNA otkriven je PCR metodom u deset tonzilarnih i dva laringealna karcinoma. U jedanaest detektiranih slučajeva potvrđen je HPV soj 16, a kod jednog soj 31 HPV-a (64).

Nekoliko studija koje obrađuju utjecaj HPV-a na nastanak prekanceroznih lezija sluznice usne šupljine spominje HPV kao mogući uzrok nastanka leukoplakije, a u manjoj mjeri eritroplakije. Od 32 slučaja eritroplakije kod devet je dokazan HPV DNA soj 16, a dvije eritroplakije i jedna verukozna leukoplakija prerasle su u invazivni karcinom (53).

HPV DNA 18 drugi je najčešći soj koji se dokazuje kod HPV pozitivnih karcinoma glave i vrata (54). HPV prevalencija kod oralnih pločastih karcinoma u Aziji bila je razmjerno veća u usporedbi s drugim zemljopisnim lokacijama. HPV prevalencija značajno je bila veća kod orofaringealnih pločastih karcinoma u Sjevernoj Americi i Aziji negoli u Europi. Takva razlika u distribuciji s obzirom na geografsko područje djelomično može biti objašnjena različitom distribucijom čimbenika rizika. Činjenica da su sojevi 16 i 18 HPV-a pronađeni u biopsijama planocelularnoga karcinoma glave i vrata, sugerira tezu da bi uloga najnovije profilakse imunizacijom protiv karcinoma grlića maternice trebala biti jednako značajna i za pločasti karcinom glave i vrata (54).

Rezultati retrospektivne seroepidemiološke studije u analizi povezanosti infekcije HPV-om soj 16 s pločastim karcinomima orofarinksa, jednjaka, penisa i vagine, verificirali su serološki dokaz povezanosti infekcije HPV soja 16 s karcinomom orofarinksa i penisa. Nije dokazana povezanost između prisutnosti antitijela protiv HPV soja 16 i planocelularnog karcinoma jednjaka, a ti rezultati slični su rezultatima studije iz Nizozemske u kojoj je korištena HPV DNA identifikacija (66).

Syrjanen i sur. u svojoj studiji opisuju i verukozni (Ackermanov) karcinom. Ovaj tumor je varijanta planocelularnoga karcinoma; nalazimo ga na usnama, u usnoj šupljini, larinksu, na spolovilima, češći je u muškaraca starijih od 60 godina, a ima osobinu lokalne invazivnosti bez metastaziranja. Od 159 uzoraka ovog karcinoma, njih 38 % bili su HPV DNA pozitivni (53). Rezimirajući rezultate svih navedenih studija, slično anogenitalnim infekcijama, HPV sojevi 6 i 11 najčešće su udruženi s benignim lezijama glave i vrata, a HPV 16 i 18 udruženi su s nastankom premalignih lezija i planocelularnoga karcinoma (53).

Neka su istraživanja pokazala kako infekcija HPV-om ne igra samo etiološku ulogu u nastanku anogenitalnih karcinoma, već može utjecati i na klinički ishod. To je navelo Pintosa i suradnike da se krajem 90-ih godina prošlog stoljeća, na završetku svojeg istraživanja, zapitaju može li detekcija HPV DNA u planocelularnim karcinomima gornjeg dišnog sustava služiti kao prognostički čimbenik. Većina dotadašnjih studija dokazala je lošiju prognozu HPV DNA negativnih tumora u odnosu na tumore s dokazanim bilo kojim visokorizičnim HPV DNA sojem. Rezultati istraživanja pokazali su graničnu signifikantnost kod HPV detektiranih tumora bez metastaza, češću detekciju HPV DNA u karcinomima ždrijela u odnosu na karcinome grkljana i usne šupljine te veći postotak HPV DNA kod mlađih pacijenata i u dobro diferenciranih tumora. Isto je tako utvrđeno da su nemetastatski tumori češće bili HPV pozitivni (21,4 %) u odnosu na metastatske tumore (6,5 %). Dokazan je sličan postotak smrtnosti u pacijenata s HPV pozitivnim i HPV negativnim tumorima, premda je detekcija HPV DNA bila nešto viša u lokalnih negoli u regionalno proširenih tumora. Rezultati ove studije sugeriraju malu vjerojatnost značenja uloge detekcije HPV DNA u prognozi pacijenata s planocelularnim karcinomom gornjega dišnog sustava (67).

Grkljan je najznačajnija negenitalna anatomska regija koja se povezuje s infekcijom HPV-om, a da povezanost između laringealne i genitalne HPV infekcije i danas nije u potpunosti razjašnjena (68). Poznato je da se genitalna HPV infekcija prenosi seksualnim kontaktom. Pedesetih godina prošlog stoljeća postavljena je sumnja u povezanost genitalnog kondiloma i laringealnog papiloma. Kondilomi su dokazani u više od 30 % roditelja koje su rodile djecu s naknadno izraženom juvenilnom laringealnom papilomatozom. Bolest se češće javljala u prvorodne djece porođene vaginalnim putem, a rjeđe u djece porođene carskim rezom. HPV DNA nije otkriven u amnionskoj tekućini, a ukupan rizik pojave laringealne papilomatoze je 1:32. Pojava laringealne papilomatoze u odraslih češće se povezuje sa orogenitalnim kontaktom. Dokazano je da su odrasli pacijenti s laringealnom papilomatozom imali više seksualnih partnera u životu i veću frekvenciju orogenitalnih kontakata od kontrolne skupine bez laringealne papilomatoze. Teza o pojavnosti bolesti u odraslih i širenju orogenitalnim kontaktom temelji se na činjenici da laringealne papilomatoze i genitalni kondilomi sadržavaju iste HPV sojeve 6 i 11, s dominacijom soja 6 HPV-a. Spojna područja cilindričnoga i pločastog epitela u grkljanu i grliću maternice mogu pogodovati prisutnosti HPV infekcije, uz pretpostavku da prolazna količina HPV-a u slini lakše inficira laringelani

negoli oralni epitel. Metodom PCR-a dokazan je pozitivan nalaz HPV-a u oralnoj sluznici kod 23 % pacijentica s genitalnom HPV infekcijom (55).

Laringealni epitelni papilom i rekurentna respiratorna papilomatoza (RRP) novotvorine su čiji je nastanak induciran HPV-om. Gotovo 80-postotna prevalencija HPV-a u RRP spada među najveće, gledajući bilo koju lokalizaciju čak i uspoređujući je s genitalnim kondilomima i rakom grlića maternice. Laringealna papilomatoza može se pojaviti prije pete godine života ili između 20. i 30. godine života. Time se može objasniti infestacija prolaskom kroz HPV-om zaražene rodnice i transmisiju seksualnim kontaktom. Takve papilomatoze mogu rijetko maligno alterirati kod bolesnika s kroničnim bolestima, onih na radioterapiji i kod kroničnih pušača. Većina tih tumora pozitivni su na soj 6 ili 11 HPV-a (68). Maligna alteracija laringealnog papiloma u karcinom, nakon koinfekcije HPV-a soja 11 sa HPV-om 16, bila je razmatrana u studiji u kojoj se devetogodišnjim promatranjem pratio prijelaz (transformacija) papiloma u karcinom. Rane promjene na tkivu epitela grkljana sadržavale su HPV DNA soj 11, a kako je bolest napredovala, u kasnim stadijima otkriven je dominantno soj 16 HPV DNA (69).

Kod odraslih RRP-a dokazana je poveznica koinfekcije s *herpes simplex* virusom i CMV-om dok kod juvenilne RRP-e nije pronađena poveznica (68, 70). Gerein i sur. analizirali su rezultate uporabe interferona  $\alpha$  (IFN  $\alpha$ ) kod pacijenata sa RRP te korelaciju i usporedbu rezultata kod različitih sojeva HPV-a (71). Opisani su odlični rezultati u liječenju laringealne papilomatoze adjuvantnom terapijom IFN  $\alpha$  s potpunom regresijom kod 70 % pacijenata (72). Negativna iskustva liječenja IFN  $\alpha$  odnose se na visoku cijenu lijeka, nuspojave i dužinu liječenja u trajanju od 6 do 12 mjeseci (55). Dakle, terapija benigne laringealne papilomatoze uzrokovane sojevima 6 i 11 HPV-a uz kiruršku može biti medikamentna i kombinacijska. Medikamentna terapija uz IFN  $\alpha$  uključuje i davanje nukleotidnog analoga s antivirusnim svojstvima (*Cidofovir*) za viruse herpesa, koji je pokazao djelotvornost da inducira apoptozu HPV pozitivnih stanica (73, 74).

Vežu između infekcije HPV-om i nekih patoloških značajki prekanceroznih lezija grkljana istraživali su Azzimonti i suradnici te zaključili kako postoji velika vjerojatnost da je HPV kofaktor u malignoj progresiji ovih lezija. Tu vjerojatnost potkrepljuju činjenicom da je tri četvrtine pacijenata koji su razvili karcinom unutar pedeset mjeseci bilo HPV pozitivno (75). Povezanost HPV infekcije s izražajnošću gena *p53* i određenim patološkim parametrima u

prekanceroznim lezijama larinksa bio je cilj istraživanja Foureta i suradnika, koji su temeljem dobivenih rezultata pokušavali predvidjeti vjerojatnost hoće li lezija *in situ* napredovati u invazivni karcinom (21).

Sličnu korelaciju istražuju u novijoj studiji Jacob i suradnici. Analizirali su učestalost HPV infekcije u raznim karcinomima i normalnom tkivu grkljana, te njihovu povezanost s izražajnošću *proliferirajućeg jezgrenog staničnog antigena* (PCNA), i tumor supresorskog gena *p53*. Studija je utvrdila korelaciju između tipa laringealne neoplazme i izražajnosti *p53*, prisutnosti HPV-a i izražajnosti *p53* te između izražajnosti *p53* i PCNA, a sve na razini signifikantnosti. Autori zaključuju da promjene u izražajnosti *p53* i PCNA mogu biti povezane s HPV infekcijom i imati značajnu ulogu u laringealnoj karcinogenezi (58). HPV pozitivni planocelularni karcinomi u El-Moftyjevoj studiji imali su izrazitu nekeratinizirajuću morfologiju, viši proliferirajući indeksovi *Ki-67* i niže vrijednosti *p53* (64).

Uloga HPV DNA u nastanku tumorskih presadnica analizirana je u studiji Umuduma i suradnika. HPV DNA status u metastatskim lezijama korelirao je s patološkim osobinama primarnih tumorskih lezija. Prema rezultatima studije HPV pozitivni tumori napreduju brže od HPV negativnih tumora, a preživljenje je ipak bolje kod HPV pozitivnih tumora. Autori zaključuju da HPV DNA osim značaja u nastanku primarnoga tumorskog procesa može imati važnu ulogu i u razvoju metastatske tumorske bolesti (76).

Porast receptora epidermalnog čimbenika rasta kod laringealnih papiloma uzrokovanih HPV-om opisali su Johnston i suradnici. U svom su radu ustvrdili da su receptori epidermalnog čimbenika rasta bili prekomjerno izraženi u papilomima grkljana, za razliku od normalnog epitela grkljana što je dokazano Scatchardovom i Westernblotovom analizom (77).

U studiji Almadorija i suradnika koja analizira izražajnost EGFR-a i HPV infekciju kod pločastog karcinoma grkljana, HPV DNA otkriven je u 35,7 % tumora. Gotovo isključivo pripadala je sojevima 16, 18, i 33 HPV-a. Razina EGFR-a bila je značajno viša u HPV pozitivnih nego u HPV negativnih slučajeva. Time se potvrđuje teza o povećanoj izražajnosti EGFR-a u stanicama laringealnog karcinoma nastalog posljedičnom infekcijom HPV-om. Kako je laringealni karcinom uvelike uzrokovan čimbenicima okoliša i u većini slučajeva je posljedica dugoročnog izlaganja konzumaciji duhana i alkohola, teza o ulozi infekcije HPV-om visokog rizika ipak još nije u potpunosti razjašnjena. Zaključak studije



postavlja tezu da virusni onkoproteini induciraju poremećaj signalizacije za rast i diferencijaciju (63).

## 1. 7. EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR (EGFR)

U nastanku karcinoma sudjeluju onkogeni i supresorski geni. Ove dvije skupine gena u normalnim okolnostima imaju veoma važne uloge u reguliranju staničnog ciklusa i diferencijaciji stanica. Aktivacijskom promjenom strukture i/ili funkcije tih gena nastaju onkogeni. Neki onkogeni kao što su *erb-B2* i *RET* kodiraju receptor čimbenika rasta (EGFR) (13, 15, 43, 77, 78). Epidermal growth factor receptor (EGFR) jedna je od čestih kinaza koja se stvara u stanicama karcinoma, gdje, u usporedbi s normalnim stanicama, tumorske stanice često stvaraju neobično puno kinaza koje podupiru diobu stanice kada bi one trebale mirovati (78). Ongeko i suradnici u svojoj su studiji, proučavajući izražajnost EGFR-a i nekih drugih čimbenika rasta (proliferacijskih biljega), (PDGFR, *C-kit*, *p-Akt*) u pločastim karcinomima glave i vrata različitih lokalizacija, dokazali visoko pojačanu izražajnost svih četiriju kinaza. Izražajnost kinaza otvara mogućnost terapije ovih tumora tirozin i serin-treonin kinaza inhibitorima (79). Prognoističku vrijednost izražajnosti EGFR-a kod ranoga glotičkoga karcinoma larinksa (stadiji T1-T2) razmatrao je Demiral, koji u svojoj studiji analizira pozitivan odnos između izražajnosti EGFR-a i radiorezistencije (45). Kao i velik broj drugih autora on zaključuje da izražajnost EGFR-a predstavlja značajan negativni prognoistički čimbenik u ranim pločastim karcinomima glotisa (13, 18, 44, 45).

Skupina autora istraživala je izražajnost EGFR-a i *p53* tumor supresorskog gena kod T1-T2 karcinoma glotisa, uključujući prednju i stražnju komisuru. Zaključak studije potvrđuje značajno veću učestalost izražajnosti EGFR-a u karcinoma stražnje komisure od karcinoma prednje komisure. Ovi rezultati i anatomija stražnje komisure mogu objasniti veću učestalost povrata T1-T2 karcinoma stražnje komisure od karcinoma prednje komisure istog stadija. Isto tako ovi rezultati mogu objasniti zašto radioterapija daje bolje rezultate kod glotičkog karcinoma prednje komisure istog stadija (80).

Istraživanje je uključivalo pacijente s poodmaklim tumorima grkljana otkrivenim u stadijima T3-T4, s ciljem vrednovanja izražajnosti proliferacijskog biljega EGFR-a i onkogeno *HER-2* kod progresije tumora, tehnikom TMA (*Tissue microarray analysis*) u 1385 bioptata. *HER-2* je bio povećan u 1,02 % slučajeva. Tako niska učestalost pojačane izražajnosti *HER-2*

onkogena u tumorima grkljana u većini slučajeva još uvijek ostaje nerazjašnjena. Povećana izražajnost EGFR-a pronađena je u 10,37 % slučajeva (81).

Veza između EGFR-a s metastaziranjem u limfne čvorove vrata bila je predmetom istraživanja Almadorija i skupine autora. Studija je uključivala 140 pacijenata s primarnim neoperiranim karcinomima grkljana koji su inicijalno dijagnosticirani i praćeni nakon provedene dijagnostike. U rezultatima studije autori navode da su razine EGFR-a bile u izravnoj vezi s rizikom metastaziranja karcinoma u limfne čvorove. Petogodišnje razdoblje bez metastaza zabilježeno je u 66 % pacijenata sa EGFR negativnim tumorima, dok je u pacijenata sa EGFR pozitivnim tumorima to razdoblje zabilježeno u 15 % slučajeva. Multivarijantnom analizom status EGFR-a bio je signifikantan neovisni prognostički čimbenik za pojavu vratnih metastaza. Rezultati ovog istraživanja potvrđuju tezu da status izražajnosti EGFR-a u vrijeme dijagnoze može identificirati pacijente s pločastim karcinomom larinksa i visokom vjerojatnošću pojave metastaza u limfnim čvorovima vrata (41).

Transformirajući čimbenik rasta *alfa* (TGF  $\alpha$ ) spada u površne stanične receptore i može aktivirati diobu u svakoj pojedinoj stanici kao i u stanici koja ga je stvorila te tako vršiti autokrinu stimulaciju (82). Uz pomoć kompjuterske analize slike koja kvantitativno obrađuje intenzitet imunohistokemijskog bojanja, utvrđena je signifikantno veća srednja optička gustoća (*mean optical density*, MOD) bojanja za TGF  $\alpha$  i EGFR u histološki normalnoj sluznici i pločastim karcinomima glave i vrata kod oboljelih pacijenata negoli u kontroliranoj normalnoj sluznici pacijenata bez raka. Obojani EGFR neznatan je u normalnoj sluznici kontrolne skupine pacijenata bez tumora i relativno se povećava u displastičnim i tkivu pločastog karcinoma glave i vrata (83).

Kreciciki i suradnici u svojem su istraživanju imunohistokemijskim metodama analizirali izražajnost EGFR-a i proliferirajućih staničnih biljega (PCNA i *Ki-67*) kod pacijenata s pločastim karcinomom grkljana te ih uspoređivali s uzorcima normalnoga hiperplastičnoga laringealnog epitela i uzorcima prekanceroznih lezija. Nađena je značajna razlika u izražajnosti EGFR-a i PCNA između laringealnog karcinoma i displastičnih lezija u odnosu na normalni i hiperplastični epitel. Dokazana je korelacija između izražajnosti EGFR-a i slabijeg preživljenja kod laringealnog karcinoma te značajna korelacija između izražajnosti PCNA i patohistološkoga gradusa tumora. Zapažanja dobivena u ovoj studiji ističu da se

imunohistokemijska bojanja na PCNA i *Ki-67* mogu iskoristiti kao mjerila stanične proliferativne aktivnosti u laringealnim epitelnim lezijama. Izražajnost EGFR, PCNA i *Ki-67* korelira s patohistologijom laringealnih lezija pa autori sugeriraju da bi se EGFR mogao iskoristiti kao biomarker stupnjevite karcinogeneze i kao prognostički pokazatelj kod displastičnih laringealnih lezija. Ovi rezultati potvrđuju zapažanja drugih autora o tome da je izražajnost EGFR-a značajno viša u laringealnih karcinoma negoli u normalnom epitelu (84).

Različiti prognostički čimbenici kod operabilnih laringealnih karcinoma bili su tema studije Vlachtsisa i suradnika. Izolirana RNA koristila se za testiranje izražajnosti *p53*, *bcl-2*, EGFR-a i VGFR-a metodom PCR analize, dok se DNA koristila za detekciju EBV-a i HPV sojeva 16 i 18 također metodom PCR-a. Bilježeni su svi podaci, kao što su povrat tumora i preživljenje. Univarijantna analiza za ukupno preživljenje pokazala je uobičajeno značenje za T stadij, TNM status i sijelo tumora. Univarijantna analiza za vrijeme do progresije bolesti pokazala je značenje za T stadij, N stadij, TNM status, sijelo tumora te tumore simultano pozitivne na EGFR i VGFR. Multivarijantna analiza podataka pokazala je da je TNM-klasifikacija jedina značajna za ukupno preživljenje, a da su TNM stadij, sijelo tumora i izražajnost EGFR-a bitni čimbenici za vrijeme progresije tumora. U zaključku stoji da molekularni biljezi, EGFR i VGFR, imaju prognostičko značenje kod laringealnih karcinoma zajedno s kliničkim prognostičkim čimbenicima kao što su stadij i sijelo tumora (85).

Zanimljiva je studija koju su radili Pivot i skupina autora, a koja je usmjerena na homogenu skupinu pacijenata s resektabilnim planocelularnim karcinomima grkljana koji spadaju u skupinu onih koji se mogu i konzervativno liječiti. Rađena je analiza prognostičkih čimbenika intervala bez bolesti (IBB) i sveopćeg preživljenja (SP) bolesnika s karcinomom grkljana i donjeg ždrijela tretiranih jednom od tri metode: 1. totalna laringektomija, 2. onkološka (konzervativna) metoda - induktivna kemoterapija pa naknadna radioterapija 3. induktivna kemoterapija pa totalna laringektomija. Prognostički čimbenici u ovoj studiji bili su: dob, spol, opće tjelesno stanje, primarna lokalizacija, T status, N status, volumen tumora i razina izražajnosti EGFR-a. Multivarijantna analiza pokazala je da su N status i volumen tumora signifikantni pokazatelji IBB-a i SP-a. Razina izražajnosti EGFR-a signifikantna je samo kod pacijenata liječenih induktivnom kemoterapijom pa naknadnom radioterapijom. Prema autorima laringektomija briše prognostičku vrijednost razine izražajnosti EGFR-a. Rezultati studije pokazuju da su mjerljive razine EGFR-a nađene u svim tumorima. Univarijantna analiza pokazala je da su opći status bolesnika, volumen tumora, T status i N status

prediktivni čimbenici odgovora na liječenje, a multivarijantna analiza da su prediktivni čimbenici T status i volumen tumora. Među pacijentima liječenim induktivnom kemoterapijom i dalje radioterapijom univarijantna i multivarijantna analiza pokazale su da je razina izražajnosti EGFR-a prediktivni čimbenik uspjeha liječenja. Multivarijantna analiza pokazala je N status kao najjači prognostički čimbenik u svim metodama liječenja, a T status pokazao se signifikantnim u svim metodama osim u laringektomiji. Analiza uspješnosti liječenja pacijenata kemoterapijom i radioterapijom pokazuje statistički značajnu povezanost s izražajnošću EGFR-a, te tako predstavlja prediktivni čimbenik uspjeha liječenja. Prognostička vrijednost ovog biljega nestaje u bolesnika liječenih inicijalnom ili dodatnom laringektomijom (86).

Do studije Kourelisa i suradnika nije bilo prikaza o razlikama s obzirom na različita sjela laringealnoga karcinoma na molekularnoj razini. Rezultati ove studije potvrđuju značajno višu zastupljenost EGFR-a među tumorima glotisa u odnosu na supraglotis. Supraglotički karcinomi rastu iz metaplastičnog epitela, a glotički iz nativnog pločastog epitela. Stoga razlika u izražajnosti između glotičkih i supraglotičkih tumora može odražavati različito porijeklo progenitorskih stanica, normalnih ili metaplastičnih. Prema nalazima ove studije, visoke razine RXR $\alpha$  (retinoid X receptor  $\alpha$ ) značajno su više kod glotičke lokalizacije karcinoma. Spomenuta razlika između dvaju tumorskih sjela može se smatrati tragom koji upućuje na prodromalne stanice, pločasta metaplazija prethodi supraglotičkoj karcinogenezi i ide uz pad RXR $\alpha$ . Štoviše, RXR $\alpha$  je prekomjerno izražen kod glotičkih karcinoma. Uz korištenje tih receptora mogao bi se ostvariti supresivni učinak retinoida u karcinogenezi. To bi bila molekularna osnova povoljnije prognoze kod glotičkih tumora uz dobro poznata klinička obilježja, ranu dijagnozu i oskudnu limfnu drenažu. Prekomjerna izražajnost EGFR i RXR $\alpha$  čini glotičke karcinome osjetljivima na inhibitore tirozin kinaze i omogućuje odabir ciljane individualne terapije (87).

Rekurentni respiratorni papilomi uzrokovani HPV infekcijom benigne su lezije kod kojih se može naći pretjerana izražajnost EGFR-a. Skupina autora evaluirala je izražajnost ciklooksigenaze 2 (COX-2) u papilomima, istražila ulogu EGFR signalizacije u izražajnosti COX-2 i determinirala značenje COX-2 aktivnosti u rastu stanica papiloma. Rezultati studije pokazuju da je razina COX-2 znakovito povišena u papilomima i da je pretjerana izražajnost reflektirala aktivaciju EGFR-fosfatidilinozitol 3 kinaze signalnog puta. Autori također

podupiru tezu kako se nesteroidni protuupalni lijekovi koji su COX inhibitori, mogu koristiti u liječenju papiloma respiratornog trakta (88).

Gale, Kambic i suradnici nastojali su izravno prikazati sekvencu genskih promjena što čine podlogu spektra epitelnih hiperplastičnih laringealnih lezija (EHLL) i laringealnog karcinoma koristeći se hibridizacijom *non-isotopic in situ* (ISH) za kromosome 7 i 17 u korelaciji s prekomjernom izražajnošću proteina *p53* i EGFR-a. Najznačajniji nalaz je statistički značajna razlika u broju kromosomskih kopija nađenih u izoliranoj atipičnoj hiperplaziji u odnosu na atipične hiperplazije povezane s pločastim karcinomom. Prekomjerna izražajnost EGFR-a i proteina *p53* izmjerena je u 61 % slučajeva s izoliranom atipičnom hiperplazijom te u 59 % slučajeva atipične hiperplazije povezane s pločastim karcinomom. Imunoreaktivnost za oba biljega rasla je s gradusom lezija, no ipak bojanje nije bilo toliko uniformno u izoliranim oblicima EHLL-a. S druge strane, imunoreaktivnost bila je postojanija u EHLL oblicima povezanim s pločastim karcinomom. Iz zaključka ove studije daje se iščitati da brojčane promjene kromosoma (polisomija) 7 i 17 mogu biti povezane s prekomjernom izražajnosti EGFR-a i gena *p53* te mogu pridonijeti kritičnim događanjima u onkogenezi karcinoma larinksa. U svakodnevnoj praksi citogenetske i imunohistokemijske analize mogle bi biti korisne u razlikovanju *low risk* od *high risk* epitela pacijenata s atipičnom hiperplazijom. Autori zaključuju da je akumulacija genskih lezija ključna u nastanku karcinoma te će one stanice koje nakupe kritičnu količinu ovih aberacija klonski ekspandirati i progredirati. Podatci dobiveni u ovoj studiji mogu se iskoristiti za daljnja istraživanja, pokazujući da se izolirana atipična hiperplazija s ekstremnom razinom kromosoma 7 i 17 može smatrati i visoko rizičnom za razvoj karcinoma (89).

Markus Hambek i skupina autora objavili su studiju sinergističnog antitumorskog učinka monoklonskih antitijela i proinflatarnog citokina TNF  $\alpha$ .

Poznato je da prekomjerna izražajnost EGFR-a na maligno transformiranim stanicama ima sposobnost indukcije proliferacije (77). Shodno tome, ovi receptori postali su terapijska meta za različita monoklonska protutijela u liječenju karcinoma. Kako bi se ostvarila učinkovita antitumorska aktivnost monoklonskih protutijela, poželjna je što veća izražajnost ovih receptora na tumorskim stanicama. Uzimajući u obzir ranije studije o antitumorskom učinku TNF  $\alpha$ , u istraživanje je uveden ovaj citokin kako bi se povećala učinkovitost protutijela u situacijama kada monoterapija protutijelima nije rezultirala maksimalnom tumorskom redukcijom. Već je dokazano da se može povećati izražajnost EGFR-a djelovanjem TNF  $\alpha$

nakon čega dolazi do povećanja permeabilnosti tumorski novonastalih krvnih žila u tumoru, a s tim i do poboljšanja penetracije tumorskih protutijela.

Poznato je da proinflammatorni citokini poput TNF  $\alpha$  mogu aktivirati programiranu smrt stanice ili apoptozu. Zaključno, čini se da postoji sinergistički učinak u interakciji između EGFR-a blokiranih monoklonskim protutijelima i TNF  $\alpha$ , što rezultira smanjenjem tumorske veličine. Pretpostavljeni mehanizam za ova zapažanja sastoji se u tome da TNF  $\alpha$  inducira povećanu izražajnost EGFR-a, što omogućuje povećano zauzimanje EGFR-a protutijelima. Dakle, zapaženi učinak protutijela na EGFR može reducirati tumorski rast i kod tumora s niskom izražajnosti EGFR-a, ali uz prisutnost citokina poput TNF  $\alpha$ . To može proširiti indikacije za liječenje EGFR protutijelima na širi spektar karcinoma i utjecati na protokole liječenja.

## **2. CILJEVI I HIPOTEZE**

### **2. 1. CILJEVI**

1. Utvrditi prisutnost infekcije humanim papiloma virusom (HPV) i njegovu moguću povezanost s histopatološkim i kliničkim značajkama pločastog karcinoma grkljana.
2. Utvrditi izražajnost receptora epidermalnog čimbenika rasta (EGFR) i njegovu povezanost s histopatološkim i kliničkim značajkama pločastog karcinoma grkljana.
3. Ispitati povezanost infekcije HPV-om i izražajnosti EGFR-a s dužinom preživljenja bez povratka bolesti (DSF) i ukupnim preživljenjem. (OS9)
4. Ispitati utjecaj EGFR-a u pacijenata s HPV pozitivnim pločastim karcinomom grkljana na prognozu bolesnika s pločastim karcinomom grkljana.

### **2. 2. HIPOTEZE**

1. Uvidom u literaturu zamijetili smo naznačenu varijabilnost u postotku HPV pozitivnih karcinoma grkljana u različitim studijama (10-54 %). Takva razlika u incidenciji HPV infekcije najvjerojatnije je posljedica neadekvatno standardizirane metode detekcije HPV DNA. Poznato je da HPV pozitivni karcinomi grkljana imaju benigniji tijek i bolji terapijski odgovor, što je jedan od osnovnih razloga zbog kojih se preporučuje uvođenje testiranja na HPV u redovitu kliničku praksu kod svih novootkrivenih karcinoma grkljana. Pretpostavljamo da će postotak HPV pozitivnih karcinoma u našoj studiji odgovarati postotku, tj. rezultatima iz pregledane literature.
2. Pojačana izražajnost EGFR-a vezana je s lošijom prognozom i slabijim odgovorom na terapiju. Do sada nije istraživana razlika u kliničkom ponašanju HPV pozitivnih karcinoma grkljana u odnosu na izražajnost EGFR-a. U ovom će se istraživanju prvi put procijeniti sljedeće:

- a. utječe li pojačana izražajnost EGFR-a na prognozu bolesnika u skupini prognostički povoljnih HPV pozitivnih karcinoma grkljana;
- b. može li ova analiza u podskupini bolesnika s očekivano benignijim kliničkim tijekom izdvojiti bolesnike kod kojih se očekuje agresivniji tijek bolesti.



### 3. METODE I ISPITANICI

#### 3. 1. ISPITANICI

U istraživanje je uključeno 196 ispitanika s pločastim karcinomom grkljana operiranih u Klinici za bolesti uha, nosa i grla s kirurgijom glave i vrata KBC-a Split u razdoblju od 1. siječnja 2000. do 31. prosinca 2009. godine.

Kliničke podatke prikupili smo iz povijesti bolesti pacijenata pohranjenih u pismohrani Klinike za bolesti uha, nosa i grla s kirurgijom glave i vrata KBC-a Split te iz histoloških nalaza pohranjenih u bazi podataka Kliničkog zavoda za patologiju, citologiju i sudsku medicinu KBC-a Split. Klinički i patološki podatci razvrstavani su prema ispitivanim kriterijima (spol, dob, podatak o pušenju i konzumaciji alkohola - da/ne), TNM statusu, histološkom gradusu tumora (G1, G2, G3), primijenjenoj terapiji (kirurško liječenje, kemoradioterapija ili kombinacije), povratu bolesti (da/ne i vrijeme do povrata), općem i specifičnom preživljenju.

U matičnim uredima dobili smo podatke o trenutačnom statusu ispitanika, provjeravajući podatke o preživljenju i eventualnim uzrocima smrti, zbog čega smo bolesnike podijelili u tri skupine: 1. bolesnik je umro od osnovne bolesti; 2. bolesnik je umro od druge bolesti; 3. bolesnik je živ.

Arhivirani histološki preparati ponovo su pregledavani, a potom su odabrani histološki rezovi imunohistokemijski bojani, nakon čega su PCR metodom identificirani HPV pozitivni karcinomi. Analizirani su i odijeljeni niskorizični i visokorizični tipovi HPV-a te stupanj izražajnosti EGFR-a.

Istraživanje je provedeno na deparafiniziranim rezovima operacijskog materijala pločastih karcinoma grkljana dijagnosticiranih i liječenih u KBC-u Split u razdoblju od 1. siječnja 2000. do 31. prosinca 2009. godine. Preparate su pregledavala dva patologa s usklađivanjem kvantifikacije (*Fleiss'kappa index* podudarnosti očitavanja  $> 95 \%$ ,  $\kappa = 0,95$ ).

Tablica 1. prikazuje raspodjelu ispitanika prema godinama dijagnosticiranja i liječenja. Najviše dijagnosticiranih karcinoma, 15,8 % (31), bilo je 2005. godine, a najmanje, 5,1 % (10), dijagnosticirano je 2008. godine.

**Tablica 1.** Raspodjela broja ispitanika u studiji prema godinama dijagnosticiranja i liječenja

	<b>Broj ispitanika</b>	<b>Postotak</b>
<b>2000.</b>	25	12,8
<b>2001.</b>	14	7,1
<b>2002.</b>	18	9,2
<b>2003.</b>	21	10,7
<b>2004.</b>	23	11,7
<b>2005.</b>	31	15,8
<b>2006.</b>	28	14,3
<b>2007.</b>	14	7,1
<b>2008.</b>	10	5,1
<b>2009.</b>	12	6,1
Ukupno	196	100,0

U Tablici 2. prikazana je raspodjela ispitanika prema dobi i spolu. Starosna dob ispitanika je između 37 i 88 godina, a prosječna starost iznosi 65 godina. U istoj tablici vidimo dominaciju muškog spola, koji je zastupljen u 96,4 % (189) slučajeva.

**Tablica 2.** Raspodjela bolesnika prema dobi i spolu

		<b>N</b>	<b>%</b>	<b>Kumulativni %</b>
<b>Spol</b>	Žene	7	3,6	
	Muški	189	96,4	
<b>Dob</b>	do 40	2	1,0	1,0
	41 do 60	68	34,7	35,7
	61 do 80	119	60,7	96,4
	81 i više	7	3,6	100,0
	Ukupno	196	100,0	

U Tablici 3. i Tablici 4. prikazana je raspodjela broja i postotka ispitanika prema čimbenicima rizika, pušenju i konzumiranju alkohola. Čak 192 (98 %) bolesnika su bili pušači, a 118 (60,2 %) pojačano su konzumirali alkohol. Na osnovi toga može se ustvrditi da pušenje i alkoholni abuzus čine veoma važne egzogene čimbenike nastanka karcinoma grkljana.

**Tablice 3. i 4.** Raspodjela broja i postotka ispitanika prema čimbenicima rizika (pušenju i alkoholu)

**Tablica 3.** Čimbenik rizika: pušenje

	<b>Broj ispitanika</b>	<b>Postotak</b>
<b>ne</b>	4	2,0
<b>da</b>	192	98,0
Ukupno	196	100,0

**Tablica 4.** Čimbenik rizika: alkohol

	<b>Broj ispitanika</b>	<b>Postotak</b>
<b>ne</b>	78	39,8
<b>da</b>	118	60,2
Ukupno	196	100,0

### 3. 2. METODE

Standardiziranom PCR metodom identifikacije i detekcije HPV DNA osigurali smo vjerodostojnost rezultata. Najprije smo odijelili HPV pozitivne i HPV negativne karcinome. U skupini pozitivnih odredili smo visokorizične i niskorizične tipove HPV-a, još jednom provjeravajući rezultat uz pozitivnu i negativnu kontrolu. Time su dobiveni rezultati dvostruko provjereni, kako bi se smanjila mogućnost pogreške.

Imunohistokemijskom metodom obojenja tumorskih stanica na EGFR odredili smo izražajnost EGFR-a u tumorskim stanicama. Analizom patohistološkog materijala u bolesnika s poznatim prognostičkim čimbenicima (stadij bolesti i gradus) i poznatim tijekom bolesti (podatak o povratu bolesti, diseminaciji, preživljenju) pokazali smo prisutnost infekcije humanim papiloma virusom (HPV) i izražajnost receptora epidermalnog čimbenika rasta (EGFR).

Kriteriji za uključivanje u istraživanje:

- patohistološka dijagnoza pločastog raka grkljana, R0, M0
- materijal dostupan za analizu iz baze podataka Kliničkog zavoda za patologiju KBC-a Split

- dostupan podatak o stadiju bolesti i patohistološkom gradusu u trenutku postavljanja dijagnoze ( C4 )
- poznat tijek bolesti
- podatak o datumu i uzroku smrti

Kriteriji isključivanja:

- patohistološka dijagnoza koja nije planocelularni karcinom grkljana, uključivo verukozni karcinom grkljana, R ( X, 1, 2 ), M 1
- nedostupan, neodgovarajući materijal za analizu iz baze podataka Kliničkog zavoda za patologiju KBC-a Split
- nedostupan podatak o stadiju bolesti i patohistološkom gradusu (C4)
- nepoznat tijek bolesti
- nepoznat podatak o datumu i uzroku smrti

Dobiveni rezultati PCR amplifikacije niskorizičnih i visokorizičnih genotipova HPV-a analizirani su na 3 % agaroznom gelu. Visokorizični genotipovi daju fragmente veličine 232-268 parova baza (*bp*), a niskorizični genotipovi daju fragment veličine 228 parova baza (*bp*). HPV negativni karcinomi i HPV pozitivni benigni (niskorizični) genotipovi označavani su sustavom mjerenja razine izražajnosti 0. HPV pozitivni karcinomi kod kojih su izolirani maligni (visokorizični) HPV genotipovi i kombinacija visokorizičnih i niskorizičnih genotipova označavani su sustavom mjerenja razine izražajnosti 1.

Stupnjevanje izražajnosti EGFR-a izrazili smo kao postotak obojenih tumorskih stanica u cjelokupnom materijalu, a odnosi se na membransku obojenost. Granična vrijednost pozitiviteta je 10 %. Korištena je standardna metoda imunohistokemijskog bojanja EGFR-a koja se izražavala sustavom mjerenja razine izražajnosti od 0 do 3, i to: 0 - odsutnost bojanja; 1 - blago bojanje u > 10 %; 2 - srednje jako bojanje u > 10 %; 3 – intenzivno bojanje u > 10 %. Zbog potreba analize, pozitivan EGFR smatran je 1,2 i 3 (90).

Metoda detekcije izražajnosti EGFR-a je semikvantitativna uz usklađivanje kvantifikacije od strane dvaju patologa (*Fleiss'kappa index* podudarnosti očitavanja > 95 %,  $\kappa = 0,95$ ).

### 3. 2. 1. Imunohistokemijski postupci

Tkivo za histološku analizu uzeto je iz operativnog materijala, fiksirano u 4 % pufiriranom formalinu 24 sata, uklapano u parafin te rezano u rezove debljine 3-5 mikrona, a potom obojeno standardnom metodom hemalaun eozin (HE). Odabirani su histološki preparati, njihove su parafinske kocke ponovno rezane te imunohistokemijski pripravljane. Za EGFR je odabrano monoklonsko antitijelo – *Monoclonal Mouse Anti-Human EGFR, clone E30, DAKO Glostrup*, Danska, M7239. Sve je analizirano mikroskopom *Olympus BX 46*.

#### EGFR – postupnik imunohistokemijskog bojanja

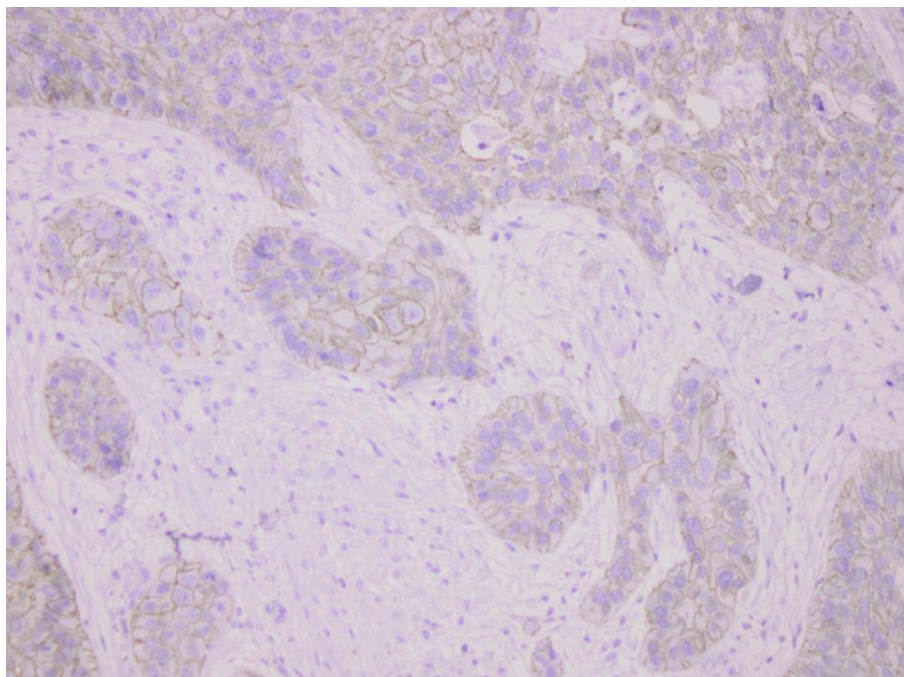
- rezanje parafinske kocke na rezove debljine 3 mikrona
- sušenje u termostatu 30 min
- deparafiniranje u ksilolu 3 x 15 minuta
- ispiranje u alkoholu 100 % pa 96 %
- ispiranje u destiliranoj H<sub>2</sub>O
- 35 vodikov peroksid 30 min
- ispiranje u destiliranoj H<sub>2</sub>O
- Proteaza 15 min/37° C
- hlađenje preparata na sobnoj temperaturi
- ispiranje u destiliranoj H<sub>2</sub>O
- ispiranje u PBS 2 x 3 min
- kapanje primarnog antitijela EGFR 30 min, razrjeđenje 1 : 50 u diluensu
- ispiranje u PBS 2 x 5 min
- kapanje sekundarnog antitijela – *mouse* 30 min
- ispiranje u PBS 2 x 5 min
- kapanje DABA 10 min

- ispiranje 2 puta u destiliranoj H<sub>2</sub>O
- bojanje u hematoksilinu 1 min
- ispiranje u vrućoj tekućoj H<sub>2</sub>O 1 min
- ispiranje u alkoholu 100 % pa 96 %
- ispiranje u ksilolu
- pokrivanje kanadskim balzomom

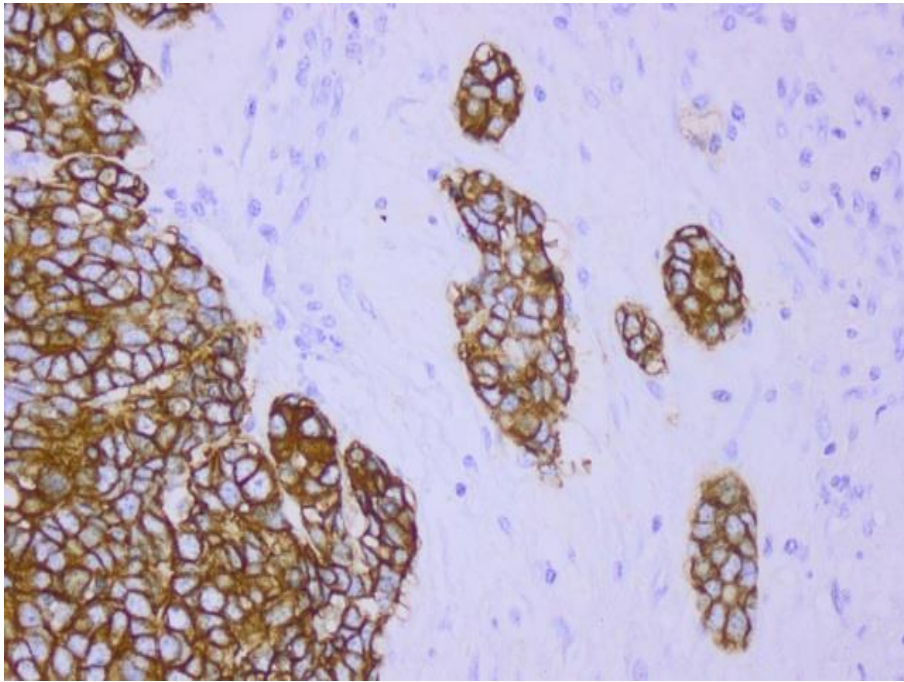
Stupnjevanje EGFR-a odnosi se na citoplazmatsku i membransku obojenost (90):

- 0 - odsutnost bojanja
- 1 - blago bojanje u više od 10 % tumorskih stanica
- 2 - srednje jako bojanje u više od 10 % tumorskih stanica
- 3 - intenzivno bojanje u više od 10 % tumorskih stanica

Pozitivna kontrola je tkivo dojke (preporuka proizvođača).



**Slika 1.** Blago bojanje EGFR-a, u >10 %



**Slika 2.** Intenzivno bojanje EGFR-a, u >10 %

### **HPV-izolacija DNA iz tkiva uklopljenog u parafin**

DNA je izolirana iz tkiva uklopljenog u parafin korištenjem kita *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche Diagnostics, Njemačka), prema uputama proizvođača, uz prethodnu deparafinaciju rezova, kako slijedi.

#### ***Deparafinacija parafinskih rezova***

1. Staviti tkivne rezove (6 x 30  $\mu$ m ) u tube od 1,5 ml. Provesti i negativnu kontrolu kroz postupak izolacije.
2. Dodati približno 1 ml ksilola, zatvoriti tubu i vorteksirati. Ostaviti je na temperaturi od 56°C 10 minuta. Protresti tubu nekoliko puta kako bi se omogućio bolji kontakt tkiva i ksilola.
3. Odvojiti tkivo od ostataka parafina centrifugiranjem, 3-5 min pri najvećoj brzini.

4. Odstraniti ksilol iz uzorka (vrlo stara ili krhka tkiva često se mrve pri odstranjivanju parafina pa to treba pomno obaviti kako ne bi došlo do gubitka tkiva).
5. Ponoviti postupke 2, 3 i 4.
6. Dodati približno 1 ml apsolutnog alkohola. Zatvoriti tubu i promiješati laganim okretanjem.
7. Odvojiti tkivo centrifugiranjem, 3-5 min pri najvećoj brzini.
8. Odstraniti alkohol.
9. Ponoviti postupke 6, 7 i 8.
10. Osušiti uzorak u sušioniku do potpunog isparenja alkohola.

Kvaliteta izolirane DNA provjerena je na 1,5-postotnom agaroznom gelu. Količina DNA procijenjena je na uređaju *Nanodrop 1000* (*Fischer Scientific, SAD*).

#### **Detekcija niskorizičnih i visokorizičnih genotipova HPV-a**

Detekcija visokorizičnih i niskorizičnih genotipova provedena je korištenjem standardnih reagensa *PCR Human Papilloma Virus Typing Set* (*TaKaRa, Shiga, Japan*), u dvije odvojene reakcije, po uvjetima kako je navedeno:

a) *PCR amplifikacija za detekciju visokorizičnih HPV DNA tipova:*

10X PCR pufer	5 µl
dNTP mix	4 µl
HPVpU-1M (primer 1)	0,5 µl
HPVpU-2R (primer 2)	0,5 µl
polimeraza	0,25 µl
uzorak DNA	1 µg
Sterilizirana H <sub>2</sub> O	ad 50 µl



b) *PCR amplifikacija za detekciju niskorizičnih HPV DNA tipova:*

10X PCR pufer	5 $\mu$ l
dNTP mix	4 $\mu$ l
HPVpU-31B (primer 1)	0,5 $\mu$ l
HPVpU-2R (primer 2)	0,5 $\mu$ l
Taq polimeraza	0,25 $\mu$ l
uzorak DNA	1 $\mu$ g
Sterilizirana H <sub>2</sub> O	ad 50 $\mu$ l

*Uvjeti PCR:*

94° C, 5 min

94° C, 0,5 min

55° C, 2 min                      30 ciklusa

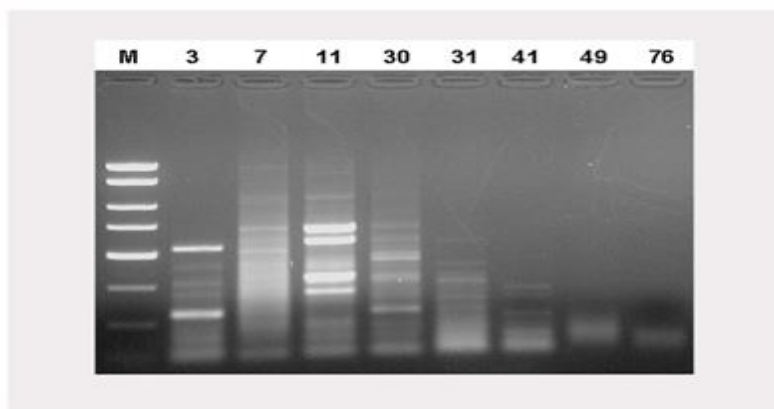
72° C, 2 min

72° C, 10 min

**Detekcija rezultata:**

Dobiveni rezultati PCR amplifikacije HPV DNA tipova analizirani su na 3 % agaroznom gelu (Slika 3):

- visokorizični genotipovi daju fragmente veličine 232-268 parova baza (*bp*).
- niskorizični genotipovi daju fragment veličine 228 parova baza (*bp*).



**Slika 3.** Rezultati PCR amplifikacije

### 3. 2. 2. Statistička obrada podataka

Dobivene rezultate studije prikazali smo tablicama i grafikonima s postojećim pokazateljima opisne statistike (učestalosti i udjeli za kategorijske varijable te rasponi i mjere centralne tendencije za kvantitativne varijable).

U obradi i analizi podataka koristili smo *Excel 2010* (MS Office 2010, Microsoft, SAD) i *SPSS-18* (IBM, SAD). Povezanost pretpostavljenih prediktora/varijabli (varijable kliničkih osobina, patohistoloških osobitosti s HPV pozitivnim i HPV negativnim karcinomima i stupnjem izražajnosti epidermalnog čimbenika rasta - EGFR-a) istražili smo testom  $\chi^2$ . Isto tako, sve druge analize s kvalitativnim, tj. kategorijskim varijablama s učestalostima analizirali smo istovjetnim testovima ( $\chi^2$ test). Prediktivnu vrijednost ispitivanih potencijalnih prediktora na ishod i preživljenje prikazali smo analizom preživljenja (krivulja Kaplan-Meier). Značajnosti pojedinih testova procjenjivali smo na razini od 95 % ( $p < 0,05$ ).

## 4. REZULTATI

U našem je istraživanju ukupno sudjelovalo 196 ispitanika liječenih u Klinici za bolesti uha, grla i nosa i kirurgiju glave i vrata KBC-a Split. Većina ispitanika u studiji (96,4 %; n = 189) bila je muškog, a manjina (3,6 %; n = 7) ženskog spola. Valja istaknuti visok postotak pušača 98 % (n = 192) i čak 60,2 % (n = 118) onih koji su pojačano konzumirali alkohol.

Sukladno postavljenim ciljevima i hipotezama, rezultate ove studije prikazujemo u četiri odjeljka:

1. Prikaz raspodjele ispitanika prema kliničkim i patohistološkim osobinama.
2. Prikaz odnosa kliničkih i patohistoloških osobina.
3. Prikaz utjecaja prisutnosti HPV infekcije i izražajnosti EGFR-a u odnosu na kliničke i patohistološke osobine karcinoma.
4. Prikaz značenja kliničkih i patohistoloških osobina te izražajnosti EGFR-a u HPV pozitivnih karcinoma za prognozu i preživljenje ispitanika.

### 4. 1. PRIKAZ RASPODJELE ISPITANIKA PREMA KLINIČKIM I PATOHISTOLOŠKIM OSOBINAMA

U Tablici 5. prikazali smo raspodjelu ispitanika prema lokalizaciji karcinoma grkljana. Kod 78 (39,8 %) ispitanika tumor je smješten u predjelu glotisa, u 60 (30,6 %) ispitanika tumor je smješten supraglotično, u 3 (1,5 %) ispitanika subglotično, a u 55 (28,1 %) ispitanika tumor je smješten transglotično .

**Tablica 5.** Raspodjela bolesnika prema lokalizaciji karcinoma grkljana

	<b>Broj ispitanika</b>	<b>Postotak</b>
<b>glotis</b>	78	39,8
<b>supraglotis</b>	60	30,6
<b>subglotis</b>	3	1,5
<b>transglotis</b>	55	28,1
Ukupno	196	100,0

U Tablici 6. prikazali smo raspodjelu ispitanika prema patohistološkom gradusu tumora: 77 (39,3 %) bolesnika je s tumorom patohistološkog gradusa I., 93 bolesnika (47,4 %) je s tumorom patohistološkoga gradusa II., a 26 (13,3 %) bolesnika je s patohistološkim gradusom III.

**Tablica 6.** Raspodjela bolesnika prema patohistološkom gradusu tumora

PH gradus	Broj ispitanika	Postotak
<b>I.</b>	77	39,3
<b>II.</b>	93	47,4
<b>III.</b>	26	13,3
Ukupno	196	100,0

U sljedećoj tablici (Tablica 7.) prikazana je raspodjela ispitanika prema stadiju (*stage*) bolesti: 58 (29,6 %) bolesnika bilo je u stadiju I., 19 (9,7 %) u stadiju II., 83 (42,3 %) u stadiju III., a 36 (18,4 %) bolesnika bilo je u stadiju IV. bolesti.

**Tablica 7.** Raspodjela ispitanika prema stadiju bolesti

Stadij	Broj ispitanika	Postotak
<b>I.</b>	58	29,6
<b>II.</b>	19	9,7
<b>III.</b>	83	42,3
<b>IV.</b>	36	18,4
Ukupno	196	100,0

Raspodjelu ispitanika u odnosu na pojavu lokoregionalnih metastaza prikazali smo u Tablici 8. Od ukupnog broja bolesnika 137 (69,9 %) njih nije imalo metastaza, 48 (24,5 %) ih je imalo jednostrane (unilateralne) regionalne metastaze, a 11 (5,6 %) obostrane (bilateralne) regionalne metastaze.

**Tablica 8.** Raspodjela ispitanika u odnosu na pojavu lokoregionalnih metastaza

Metastaze	Broj ispitanika	Postotak %
<b>Bez metastaza</b>	137	69,9
<b>Jednostrane metastaze</b>	48	24,5
<b>Obostrane metastaze</b>	11	5,6
Ukupno	196	100,0

Tablica 9. prikazuje raspodjelu bolesnika prema načinu liječenja. Najveći broj bolesnika, 144 (73,5 %), liječen je kombinacijom operacije i radioterapije, 23 (11,7 %) bolesnika liječena su samo kirurški, a 29 (14,8 %) bolesnika liječeno je primarnom radioterapijom i/ili kemoradioterapijom.

**Tablica 9.** Raspodjela ispitanika prema tipu primijenjene terapije

Terapija	Broj ispitanika	Postotak %
<b>operacija</b>	23	11,7
<b>operacija + radioterapija</b>	144	73,5
<b>radioterapija i/ili kemoradioterapija</b>	29	14,8
Ukupno	196	100,0

U pogledu uspješnosti liječenja, uvidom u pojavu povrata (recidiva) bolesti, 127 (64,8 %) bolesnika nije imalo povrat bolesti, dok ih je 69 (35,2 %) imalo povrat bolesti (Tablica 10.).

**Tablica 10.** Raspodjela bolesnika prema pojavi povrata (recidiva) bolesti

Recidiv	Broj ispitanika	Postotak
<b>Bez recidiva</b>	127	64,8
<b>S recidivom</b>	69	35,2
Ukupno	196	100,0

Od ukupnog broja ispitanika (n = 196) živih bolesnika je 89 (45,4 %), umrlih od osnovne bolesti 67 (34,2), a umrlih od drugih bolesti 40 (20,4 %) (Tablica 11.).

**Tablica 11.** Raspodjela bolesnika prema statusu

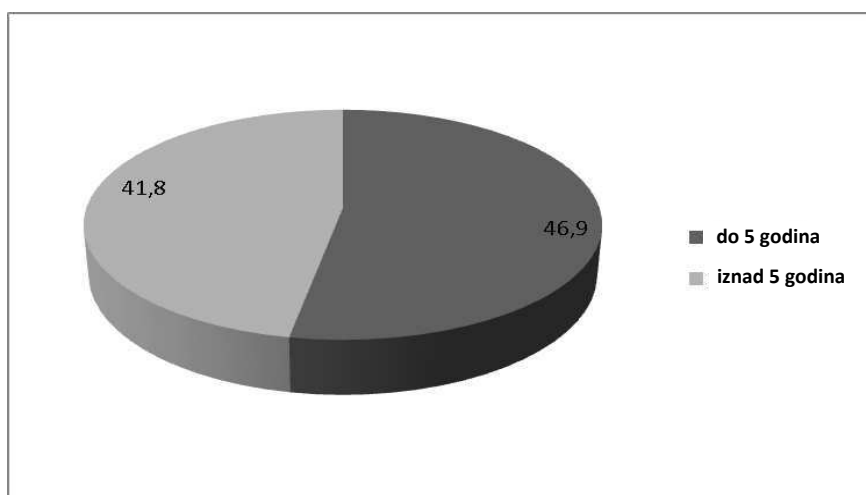
Status	Broj ispitanika	Postotak
<b>Umrli od osnovne bolesti</b>	67	34,2
<b>Umrli od druge bolesti</b>	40	20,4
<b>Živi</b>	89	45,4
Ukupno	196	100,0

Tablica 12. i Slika 4. prikazuju raspodjelu bolesnika prema petogodišnjem preživljenju. Od ukupnog broja ispitanika (n = 196) za 174 bolesnika mogli smo prikazati petogodišnje preživljenje jer za ispitanike u zadnje tri godine studije (2007., 2008. i 2009.) ne možemo predvidjeti preživljenje iznad pet godina. Do pet godina preživjela su 92 bolesnika (46,9 %), a iznad pet godina 82 (41,8 %) bolesnika.

**Tablica 12.** Raspodjela bolesnika prema petogodišnjem preživljenju

Preživljenje	Broj ispitanika	Postotak s nedostajućim podacima	Postotak bez nedostajućih podataka
<b>Do 5 godina</b>	92	46,9	52,9
<b>Iznad 5 godina</b>	82	41,8	47,1
Ukupno	174	88,8	100,0
<b>Nedostajući podatci</b>	22	11,2	
Ukupno	196	100,0	

**Slika 4.** Raspodjela bolesnika prema petogodišnjem preživljenju



Tablica 13. prikazuje raspodjelu bolesnika prema HPV DNA statusu. Primjećujemo da je od ukupnog broja ispitanika ( $n = 196$ ) njih 36 (18,4 %) bilo HPV DNA pozitivno. Od tog broja ( $n = 36$ ) kod 11 (30,6 %) dokazano je postojanje niskorizičnih (benignih) HPV sojeva, a kod njih 25 (69,4 %) postojanje visokorizičnih (malignih) sojeva HPV-a. Dakle, u odnosu na ukupan broja ispitanika ( $n = 196$ ), bolesnika s visokorizičnim HPV DNA bilo je 25 (12,8 %).

**Tablica 13.** Raspodjela HPV DNA pozitivnih ispitanika

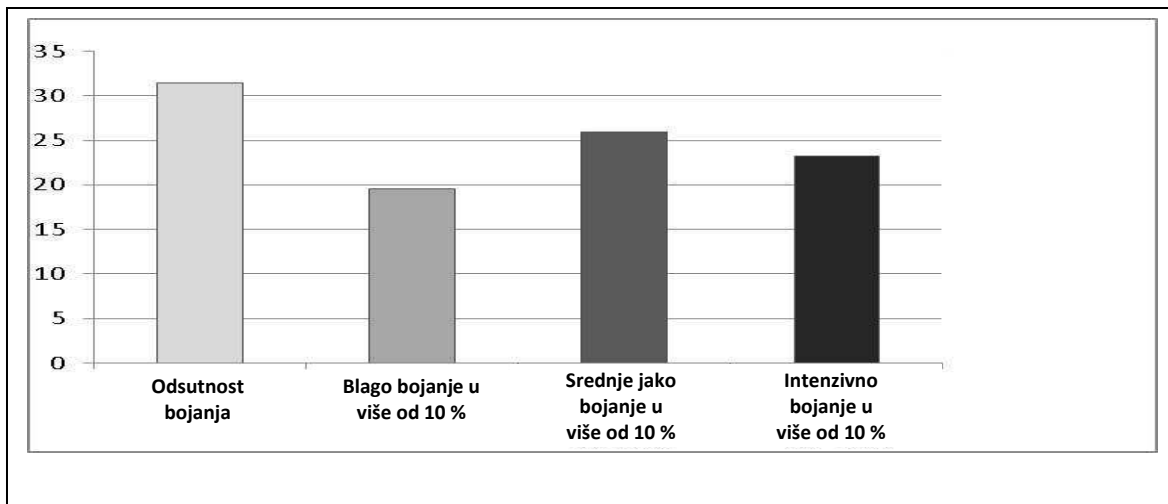
HPV DNA status	Broj ispitanika	Postotak s nedostajućim podacima	Postotak bez nedostajućih podataka
<b>0</b>	11	5,6	30,6
<b>1</b>	25	12,8	69,4
Ukupno	36	18,4	100,0
<b>Nedostajući podatci</b>	160	81,6	
Sveukupno	196	100,0	

Tablica 14. i slika 5. prikazuju raspodjelu ispitanika prema stupnju izražajnosti receptora epidermalnog čimbenika rasta (EGFR-a). Od ukupnog broja ispitanika (n = 196) zbog nedostajućih podataka 11 bolesnika isključili smo iz ovog dijela studije. Dakle, od ukupno 185 bolesnika negativnu izražajnost EGFR-a, stupnja 0, utvrdili smo kod 58 (31,4 %) bolesnika, izražajnost EGFR-a stupnja 1 u 36 (19,5 %), stupnja 2 u 48 (25,9 %) i stupnja 3 u 43 (23,2 %) bolesnika (Tablica 14., Slika 5.).

**Tablica 14.** Raspodjela bolesnika prema stupnju izražajnosti EGFR-a

Stupanj izražajnosti EGFR-a	Broj ispitanika	Postotak s nedostajućim podacima	Postotak bez nedostajućih podataka
<b>0</b>	58	29,6	31,4
<b>1</b>	36	18,4	19,5
<b>2</b>	48	24,5	25,9
<b>3</b>	43	21,9	23,2
Ukupno	185	94,4	100,0
<b>Nedostajući podatci</b>	11	5,6	
Sveukupno	196	100,0	





**Slika 5.** Stupanj izražajnosti EGFR-a u 185/196 bolesnika s planocelularnim karcinomom

## 4. 2. PRIKAZ ODNOSA KLINIČKIH I PATOHISTOLOŠKIH OSOBINA

U Tablici 15. prikazan je odnos između patohistološkoga gradusa i stadija bolesti. Primjećujemo da je 56,9 % bolesnika patohistološkoga gradusa I. je u stadiju bolesti I., a čak 77,7 % bolesnika patohistološkoga gradusa II. i III. u stadiju bolesti IV. Povezanost između stadija bolesti i patohistološkoga gradusa statistički je značajna ( $\chi^2 = 19,698$ ;  $df = 6$ ;  $p = 0,003$ ).

**Tablica 15.** Odnos između patohistološkoga gradusa i stadija bolesti

		Patohistološki gradus				
			I	II	III	Total
Stadij bolesti	I	Ukupno	33	23	2	58
		% stadij	56,9 %	39,7 %	3,4 %	100,0 %
	II	Ukupno	10	8	1	19
		% stadij	52,6 %	42,1 %	5,3 %	100,0 %
	III	Ukupno	26	41	16	83
		% stadij	31,3 %	49,4 %	19,3 %	100,0 %
	IV	Ukupno	8	21	7	36
		% stadij	22,2 %	58,3 %	19,4 %	100,0 %
	Total	Ukupno	77	93	26	196
		% stadij	39,3 %	47,4 %	13,3 %	100,0 %

Isto tako primjećujemo da je sklonost povratu bolesti upravo proporcionalna patohistološkom gradusu. Podatci iz Tablice 16. pokazuju da je čak 85,5 % bolesnika patohistološkoga gradusa II. i III., svojstvenih umjerenim i slabo diferenciranim karcinomima, imalo povrat bolesti. Isto tako 52,8 % bolesnika patohistološkoga gradusa I., svojstvenog dobro diferenciranom karcinomu, nije imalo povrat bolesti. Dakle dokazana je statistička značajnost povezanosti patohistološkoga gradusa i recidiva ( $\chi^2 = 49,492$ ;  $df = 2$ ;  $p < 0,001$ ).

**Tablica 16.** Prikaz odnosa patohistološkoga gradusa i sklonosti recidivu, tj. povratu bolesti

		Patohistološki gradus			Total	
		I	II	III		
<b>Sklonost recidivu</b>	<b>Bez recidiva</b>	Ukupno	67	57	3	127
		% recidiv	52,8 %	44,9 %	2,4 %	100,0 %
	<b>Recidiv</b>	Ukupno	10	36	23	69
		% recidiv	14,5 %	52,2 %	33,3 %	100,0 %
	<b>Total</b>	Ukupno	77	93	26	196
		% recidiv	39,3 %	47,4 %	13,3 %	100,0 %

U analizi odnosa preživljenja i patohistološkoga gradusa (Tablica 17.) dobili smo rezultate koji sugeriraju da viši gradus uvjetuje i veći postotak smrtnosti. Podatci o 76,1 % umrlih ispitanika unutar prvih pet godina s dokazano većim gradusom (gradus II. i III.) imaju također statističku značajnost i povezanost ( $\chi^2 = 19,104$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$ ).

Iz prikaza odnosa između petogodišnjeg preživljenja i sklonosti lokoregionalnom metastaziranju u Tablici 18. može se zaključiti da je unutar prvih pet godina umrlo 56,6 % ispitanika s dokazanim jednostranim ili obostranim metastazama u trenutku postavljanja dijagnoze. Suprotno tome, čak 95,1 % bolesnika koji su preživjeli pet godina nije imalo lokoregionalne metastaze. Ta povezanost je također statistički značajna ( $\chi^2 = 53,230$ ;  $df = 2$ ;  $p < 0,001$ ).

**Tablica 17.** Odnos preživljenja bolesnika i patohistološkoga gradusa tumora

			Patohistološki gradus			Total
			I	II	III	
Preživljenje	Do 5 godina	Ukupno	22	48	22	92
		% preživljenje	23,9 %	52,2 %	23,9 %	100,0 %
	Iznad 5 godina	Ukupno	41	37	4	82
		% preživljenje	50,0 %	45,1 %	4,9%	100,0 %
	Total	Ukupno	63	85	26	174
		% preživljenje	36,2 %	48,9 %	14,9%	100,0 %

**Tablica 18.** Prikaz odnosa preživljenja i sklonosti lokoregionalnom metastaziranju

			Metastaze			Total
			Bez metastaza	Jednostrane metastaze	Obostrane metastaze	
Preživljenje	Do 5 godina	Ukupno	40	42	10	92
		% preživljenja	43,5 %	45,7 %	10,9 %	100,0 %
	Iznad 5 godina	Ukupno	78	4	0	82
		% preživljenja	95,1 %	4,9 %	0 %	100,0 %
	Total	Ukupno	118	46	10	174
		% preživljenja	67,8 %	26,4 %	5,7 %	100,0 %

Tablica 19. prikazuje jasnu povezanost između postotka preživljenja i stadija bolesti. Unutar prvih pet godina u III. i IV. stadiju bolesti umrlo je čak 83,7 % bolesnika. I ovdje je dokazana povezanost između preživljenja i stadija bolesti s razinom statističke značajnosti ( $\chi^2 = 53,404$ ;  $df = 3$ ;  $p < 0,001$ ).

**Tablica 19.** Prikaz odnosa preživljenja bolesnika i stadija bolesti

		Stadij				Total	
		I	II	III	IV		
Preživljenje	Do 5 godina	Ukupno	5	10	47	30	92
		% preživljenje	5,4 %	10,9 %	51,1 %	32,6 %	100,0 %
	Iznad 5 godina	Ukupno	42	7	29	4	82
		% preživljenje	51,2 %	8,5 %	35,4 %	4,9 %	100,0 %
	Total	Ukupno	47	17	76	34	174
		% preživljenje	27,0 %	9,8 %	43,7 %	19,5 %	100,0 %

Podatci navedeni u Tablici 20. prikazuju povezanost između povrata bolesti i preživljenja. Povrat bolesti nije imalo 95,1 % bolesnika i oni su preživjeli pet godina, a 70,7 % bolesnika umrlih unutar pet godina imalo je povrat bolesti. Povezanost između povrata bolesti i preživljenja statistički je značajna ( $\chi^2 = 78,383$ ;  $df = 1$ ;  $p < 0,001$ ).

**Tablica 20.** Odnos preživljenja bolesnika i sklonosti povratu (recidivu) bolesti

		Recidiv		Total	
		Bez recidiva	S recidivom		
<b>Preživljenje</b>	<b>Do 5 godina</b>	Ukupno	27	65	92
		% preživljenje	29,3 %	70,7 %	100,0 %
	<b>Preko 5 godina</b>	Ukupno	78	4	82
		% preživljenje	95,1 %	4,9 %	100,0 %
	Total	Ukupno	105	69	174
		% preživljenje	60,3 %	39,7 %	100,0 %

### 4. 3. PRIKAZ UTJECAJA HPV INFEKCIJE I IZRAŽAJNOSTI EGFR-A NA KLINIČKE I PATOHISTOLOŠKE OSOBINE KARCINOMA

#### 4. 3. 1. Prikaz odnosa HPV pozitivnih karcinoma i kliničkih te patohistoloških osobina

U Tablici 21. prikazana je povezanost HPV pozitivnih karcinoma s patohistološkim gradusom, iz koje je razvidno da HPV pozitivni karcinomi imaju dominantno niži gradus. Promatrajući HPV pozitivne visokorizične karcinome (HPV 1), primjećujemo da u patohistološkom gradusu III. nalazimo 4 % ispitanika, dok je 96 % bolesnika s gradusima I. i II. Taj odnos nije statistički značajan ( $\chi^2 = 0,733$ ;  $df = 2$ ;  $p = 0,693$ ).

**Tablica 21.** Prikaz odnosa povezanosti HPV pozitivnih karcinoma i patohistološkoga gradusa

		Patohistološki gradus				
			I	II	III	Total
HPV	0	Ukupno	4	7	0	11
		% HPV	36,4 %	63,6 %	,0 %	100,0 %
	1	Ukupno	11	13	1	25
		% HPV	44,0 %	52,0 %	4,0 %	100,0 %
Total		Ukupno	15	20	1	36
		% HPV	41,7 %	55,6 %	2,8 %	100,0 %

Promotre li se rezultati odnosa HPV pozitivnih karcinoma i sklonosti lokoregionalnom metastaziranju, razvidno je da je bez metastaza kod HPV pozitivnih visokorizičnih karcinoma (HPV 1) bilo 76 % ispitanika, dok je s metastazama bilo ukupno 24 % bolesnika. Ovi podatci nemaju statističku značajnost i prikazani su u Tablici 22. ( $\chi^2 = 1,718$ ;  $df = 2$ ;  $p = 0,424$ ).

Odnos HPV pozitivnih karcinoma i stadija bolesti prikazan je rezultatima u Tablici 23. Karcinomi pozitivni na niskorizične DNA tipove HPV-a (HPV 0) imaju u većem postotku više stadije bolesti tako da u III. i IV. stadiju nalazimo 90 % bolesnika. Kod visokorizičnih HPV DNA tipova (HPV 1) u stadiju IV. nalazimo 12 % ispitanika, a sveukupno u stadijima III. i IV. 52 % ispitanika. Navedeni odnosi na granici su statističke značajnosti ( $\chi^2 = 7,170$ ;  $df = 3$ ;  $p = 0,067$ ).

**Tablica 22.** Prikaz odnosa HPV pozitivnih karcinoma i sklonosti regionalnom metastaziranju

		Metastaze				
			Bez metastaza	Jednostrane metastaze	Obostrane metastaze	Total
HPV	0	Ukupno	6	3	2	11
		% HPV	54,5 %	27,3 %	18,2 %	100,0 %
	1	Ukupno	19	4	2	25
		% HPV	76,0 %	16,0 %	8,0 %	100,0 %
Total		Ukupno	25	7	4	36
		% HPV	69,4 %	19,4 %	11,1 %	100,0 %

**Tablica 23.** Prikaz odnosa HPV pozitivnih karcinoma i stadija bolesti

		Stadij					
			I	II	III	IV	Total
HPV	0	Ukupno	1	0	5	5	11
		% HPV	9,0 %	0,0 %	45,5 %	45,5 %	100,0 %
	1	Ukupno	10	2	10	3	25
		% HPV	40,0 %	8,0 %	40,0 %	12,0 %	100,0 %
Total		Ukupno	11	2	15	8	36
		% HPV	30,6 %	5,6 %	41,7 %	22,2 %	100,0 %

U Tablici 24. prikazan je odnos između HPV pozitivnih karcinoma i sklonosti povratu bolesti. Veći postotak povrata bolesti nalazimo u skupini bolesnika koji su pozitivni na niskorizične HPV DNA tipove (HPV 0) (45,5 %), a manji postotak (20 %) u skupini ispitanika s karcinomima pozitivnim na visokorizične sojeve HPV-a (HPV 1). Bez povrata bolesti je 80 %



HPV 1 ispitanika, a 54,5 % HPV 0 ispitanika. Ovaj odnos nema statističku značajnost ( $\chi^2 = 2,467$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0,116$ ).

**Tablica 24.** Odnos HPV pozitivnih karcinoma i povrata (recidiva) bolesti

		<b>Recidiv</b>			
			<b>Bez recidiva</b>	<b>S recidivom</b>	Total
<b>HPV</b>	<b>0</b>	Ukupno	6	5	11
		% HPV	54,5 %	45,5 %	100,0 %
	<b>1</b>	Ukupno	20	5	25
		% HPV	80,0 %	20,0 %	100,0 %
Total	Ukupno	26	10	36	
	% HPV	72,2 %	27,8 %	100,0 %	

U Tablici 25. prikazan je odnos između HPV pozitivnih karcinoma i statusa bolesnika. Razvidno je da veći postotak umrlih od osnovne bolesti nalazimo u skupini bolesnika koji su pozitivni na niskorizične HPV DNA tipove. U skupini HPV 0 od osnovne je bolesti umrlo 45,5 % bolesnika, dok je u skupini HPV 1 od osnovne bolesti umrlo 20 % ispitanika. Suprotno tome, u skupini HPV 0 živih je ispitanika 36,4 %, dok je u skupini HPV 1 56 % živih bolesnika. Taj odnos nije statistički značajan ( $\chi^2 = 2,487$ ;  $df = 2$ ;  $p = 0,288$ ).

**Tablica 25.** Odnos HPV pozitivnih karcinoma i statusa bolesnika

		<b>Status</b>				
			<b>Umrli od osnovne bolesti</b>	<b>Umrli od druge bolesti</b>	<b>Živi</b>	Total
<b>HPV</b>	<b>0</b>	Ukupno	5	2	4	11
		% HPV	45,5 %	18,2 %	36,4 %	100,0 %
	<b>1</b>	Ukupno	5	6	14	25
		% HPV	20,0 %	24,0 %	56,0 %	100,0 %
Total	Ukupno	10	8	18	36	
	% HPV	27,8 %	22,2 %	50,0 %	100,0 %	

Iz rezultata prikazanih u Tablici 26. razvidan je veći postotak preživljenja u skupini bolesnika pozitivnih na visokorizične HPV DNA tipove. Tako u skupini HPV 1 iznad pet godina preživi 59,1 % bolesnika, a u skupini HPV 0 54,5 % bolesnika. Ti rezultati nemaju statističku značajnost ( $\chi^2 = 0,062$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0,803$ ).

**Tablica 26.** Prikaz odnosa HPV pozitivnih karcinoma i preživljenja

		Preživljenje			
			Do 5 godina	Preko 5 godina	Total
HPV	0	Ukupno	5	6	11
		% HPV	45,5 %	54,5 %	100,0 %
	1	Ukupno	9	13	22
		% HPV	40,9 %	59,1 %	100,0 %
Total	Ukupno	14	19	33	
	% HPV	42,4 %	57,6 %	100,0 %	

#### 4. 3. 2. Kategorijski prikaz odnosa HPV pozitivnih visokorizičnih karcinoma i ostalih karcinoma prema patohistološkim osobinama

Raspodjelu bolesnika prema HPV DNA statusu prikazali smo u odjeljku 4.1. (Tablica 13.). Prema navedenim rezultatima od ukupnog broja ispitanika ( $n = 196$ ) onih s visokorizičnim sojevima HPV DNA bilo je 25 (12,8 %). U ovom odjeljku izneseni su rezultati kategorijskog prikaza odnosa patohistoloških osobina bolesnika s HPV pozitivnim visokorizičnim karcinomima (HPV 1) prema svim ostalim bolesnicima koje ćemo svrstati u skupinu HPV „nultih“ karcinoma (HPV „0“), u koje smo uvrstili bolesnike s HPV negativnim karcinomima i HPV pozitivnim niskorizičnim karcinomima.

Rezultatima u Tablici 27. prikazali smo povezanost HPV pozitivnih visokorizičnih karcinoma i patohistološkoga gradusa. Evidentno je da veće patohistološke graduse nalazimo u skupini HPV „nultih“ karcinoma. Tako u patohistološkom gradusu III. nalazimo čak 96,2 % bolesnika s HPV „nultim“ karcinomima (HPV „0“), dok je u istom patohistološkom gradusu tek 3,8 %

bolesnika pozitivnih na HPV visokorizične sojeve (HPV 1). Taj odnos nije statistički značajan ( $\chi^2 = 2,142$ ;  $df = 2$ ;  $p = 0,343$ ), ali ima medicinsku značajnost.

**Tablica 27.** Prikaz odnosa povezanosti HPV „nultih“ i HPV pozitivnih visokorizičnih karcinoma s patohistološkim gradusom

Patohistološki gradus			HPV		Total
			„0“	1	
Gradus	I	Ukupno	66	11	77
		% gradus	85,7 %	14,3 %	100,0%
	II	Ukupno	80	13	93
		% gradus	86,0 %	14,0 %	100,0%
	III	Ukupno	25	1	26
		% gradus	96,2 %	3,8 %	100,0%
Total		Ukupno	171	25	196
		% gradus	87,2 %	12,8 %	100,0%

U Tablici 28. prikazani su rezultati odnosa HPV „nultih“ te HPV pozitivnih visokorizičnih karcinoma i sklonosti regionalnom metastaziranju. Dokazane jednostrane i obostrane metastaze u značajno većem postotku nalazimo kod bolesnika s HPV „nultim“ karcinomima. Razvidno je da u skupini bolesnika sa statusom HPV „0“, 92 % njih ima jednostrane, a 82 % obostrane metastaze. Ti rezultati nemaju statističku značajnost ( $\chi^2 = 1,287$ ;  $df = 2$ ;  $p = 0,525$ ), ali su također medicinski značajni.

**Tablica 28.** Prikaz odnosa HPV „nultih“ te HPV pozitivnih visokorizičnih karcinoma i sklonosti regionalnom metastaziranju

Metastaze			HPV		Total
			„0“	1	
	Bez metastaza	Ukupno	118	19	137
		% metastaze	86,1 %	13,9 %	100,0%
	Jednostrane metastaze	Ukupno	44	4	48
		% metastaze	91,7 %	8,3 %	100,0%
	Obostrane metastaze	Ukupno	9	2	11
		% metastaze	81,8 %	18,2 %	100,0%
Total		Ukupno	171	25	196
		% metastaze	87,2 %	12,8 %	100,0%

Promatrajući rezultate odnosa između HPV „nultih“ te HPV pozitivnih visokorizičnih karcinoma i stadija bolesti, zaključujemo da bolesnici s HPV „nultim“ karcinomima imaju u znatno većem postotku više stadije bolesti (tablica 29). Tako u III. i IV. stadiju bolesti nalazimo 88 % i 92 % HPV „0“ bolesnika. U istim stadijima bolesti kod visokorizičnih HPV DNA tipova (HPV 1) u stadiju IV. nalazimo 8,3 % ispitanika, a u stadiju III. 12 % ispitanika. Navedeni odnosi nisu statistički značajni ( $\chi^2 = 1,804$ ;  $df = 3$ ;  $p = 0,614$ ), ali su izrazito medicinski značajni.

**Tablica 29.** Prikaz odnosa HPV „nultih“ (HPV „0“) te HPV pozitivnih visokorizičnih karcinoma (HPV 1) i stadija bolesti

Stadij		HPV		Total	
		„0“	1		
	I.	Ukupno	48	10	58
		% stadij	82,8 %	17,2 %	100,0%
	II.	Ukupno	17	2	19
		% stadij	89,5 %	10,5 %	100,0%
	III.	Ukupno	73	10	83
		% stadij	88,0 %	12,0 %	100,0%
	IV.	Ukupno	33	3	36
		% stadij	91,7%	8,3%	100,0%
Total		Ukupno	171	25	196
		% stadij	87,2 %	12,8 %	100,0%

U Tablici 30. prikazan je odnos statusa bolesnika kod HPV „nultih“ i HPV pozitivnih visokorizičnih karcinoma. Znatno veći postotak umrlih od osnovne bolesti nalazimo u skupini bolesnika s HPV „nultim“ karcinomima (HPV „0“). Tako je u skupini HPV „0“ od osnovne bolesti umrlo čak 92,5% bolesnika dok je u skupini HPV 1 od osnovne bolesti umrlo 7,5 % bolesnika. Taj odnos nije statistički značajan ( $\chi^2 = 2,562$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0,109$ ), ali ima medicinsku značajnost.

**Tablica 30.** Prikaz odnosa HPV „nultih“ (HPV „0“) te HPV pozitivnih visokorizičnih karcinoma (HPV 1) i statusa bolesnika

Status		HPV		Total	
		„0“	1		
	Censori	Ukupno	109	20	129
		% censor	84,5 %	15,5 %	100,0%
	Umrli od osnovne bolesti	Ukupno	62	5	67
		% censor	92,5 %	7,5 %	100,0%
Total		Ukupno	171	25	196
		% censor	87,2 %	12,8 %	100,0%

Rezultati iz Tablice 31. sugeriraju da s porastom stupnja izražajnosti EGFR-a raste postotak bolesnika u skupini HPV „nultih“ karcinoma, i obrnuto, da u skupini bolesnika pozitivnih na visokorizične sojeve HPV-a taj postotak pada. Pri stupnju izražajnosti EGFR 3 u skupini HPV „0“ nalazimo gotovo 98 % ispitanika, dok pri istom stupnju izražajnosti EGFR-a u skupini HPV 1 nalazimo tek 2,3 % bolesnika. Rezultati u ovoj tablici na granici su statističke značajnosti ( $\chi^2 = 6,296$ ;  $df = 3$ ;  $p = 0,098$ ).

**Tablica 31.** Prikaz odnosa HPV „nultih“ (HPV „0“) te HPV pozitivnih visokorizičnih karcinoma (HPV 1) i stupnja izražajnosti EGFR-a

EGFR		HPV		Total		
		„0“	1			
	0	Ukupno	49	9	58	
		% EGFR	84,5 %	15,5 %	100,0%	
	1	Ukupno	29	7	36	
		% EGFR	80,6 %	19,4 %	100,0%	
	2	Ukupno	40	8	48	
		% EGFR	83,3 %	16,7 %	100,0%	
	3	Ukupno	42	1	43	
		% EGFR	97,7 %	2,3 %	100,0 %	
	Total		Ukupno	160	25	185
			% EGFR	86,5 %	13,5 %	100,0%

### 4. 3. 3. Prikaz odnosa izražajnosti EGFR-a i kliničkih te patohistoloških osobina

Analizom podataka povezanosti gradusa tumora i izražajnosti EGFR-a možemo zaključiti: što je gradus tumora viši, prisutniji je viši stupanj izražajnosti EGFR-a, a kod manje izražajnosti EGFR-a veći broj pacijenata ima niži, dakle povoljniji patohistološki gradus. Taj je odnos statistički značajan ( $\chi^2 = 45,589$ ;  $df = 6$ ;  $p < 0,001$ ). Pri izražajnosti EGFR-a stupnja 0 u gradusu I. nalazimo 60,3 % bolesnika, a u gradusu III. samo 1,7 % bolesnika. Pri izražajnosti EGFR-a stupnja 3 nalazimo 90,7 % bolesnika u patohistološkim gradusima II. i III. (Tablica 32.).

**Tablica 32.** Prikaz odnosa izražajnosti EGFR-a i patohistološkoga gradusa

			Patohistološki gradus			Total
			I	II	III	
EGFR izražajnost	0	Ukupno	35	22	1	58
		% EGFR izražaja	60,3 %	37,9 %	1,7 %	100,0%
	1	Ukupno	19	15	2	36
		% EGFR izražaja	52,8 %	41,7 %	5,6 %	100,0%
	2	Ukupno	10	30	8	48
		% EGFR izražaja	20,8 %	62,5 %	16,7 %	100,0%
	3	Ukupno	4	26	13	43
		% EGFR izražaja	9,3 %	60,5 %	30,2 %	100,0%
	Total	Ukupno	68	93	24	185
		% EGFR izražaja	36,8 %	50,3 %	13,0 %	100,0%



Isti statistički odnos nalazimo kod varijable stadij bolesti (*stage*) koja je prikazana u Tablici 33. Veću izražajnost EGFR-a nalazimo u višim stadijima bolesti, dok je u nižim stadijima izražajnost EGFR-a snižena. Pri negativnoj izražajnosti EGFR-a (stupanj 0), niži stadij bolesti (I. i II.) nalazimo u 67,2 % bolesnika. U 3. stupnju izražajnosti EGFR-a 90,7 % bolesnika nalazimo u višim stadijima bolesti (III. i IV.). Povezanost povećane izražajnosti EGFR-a s nižim, a smanjene izražajnosti ili odsutnosti EGFR-a s nižim stadijima bolesti statistički je značajna ( $\chi^2 = 76,553$ ;  $df = 9$ ;  $p < 0,001$ ).

**Tablica 33.** Prikaz odnosa izražajnosti EGFR-a i stadija bolesti

			Stadij bolesti				Total
			I	II	III	IV	
EGFR izražajnost	0	Ukupno	33	6	16	3	58
		% EGFR izražajnosti	56,9 %	10,3 %	27,6 %	5,2 %	100,0 %
	1	Ukupno	12	7	15	2	36
		% EGFR izražajnosti	33,3 %	19,4 %	41,7 %	5,6 %	100,0 %
	2	Ukupno	7	1	31	9	48
		% EGFR izražajnosti	14,6 %	2,1 %	64,6 %	18,8 %	100,0 %
	3	Ukupno	2	2	17	22	43
		% EGFR izražajnosti	4,7 %	4,7 %	39,5 %	51,2 %	100,0 %
	Total	Ukupno	54	16	79	36	185
		% EGFR izražajnosti	29,2 %	8,6 %	42,7 %	19,5 %	100,0 %

Iz Tablice 34. razvidno je da pri porastu izražajnosti EGFR-a raste i sklonost lokoregionalnom metastaziranju. Pri izražajnosti EGFR-a stupnja 0, bez regionalnih metastaza bilo je 94,8 % bolesnika. Najveći stupanj izražajnosti EGFR-a (stupanj 3) nosi velik rizik pojave regionalnih metastaza. Jednostrane metastaze našli smo u 51,2 %, a obostrane u 18,6 % bolesnika, što je ukupno 69,8 %. Taj je odnos također statistički značajan ( $\chi^2 = 68,782$ ;  $df = 6$ ;  $p < 0,001$ ).

**Tablica 34.** Prikaz odnosa izražajnosti EGFR-a i sklonosti lokoregionalnom metastaziranju

			Metastaze			Total
			Bez metastaza	Jednostrane metastaze	Obostrane metastaze	
EGFR izražajnost	0	Ukupno	55	3	0	58
		% EGFR izražajnosti	94,8 %	5,2 %	,0%	100,0 %
	1	Ukupno	34	2	0	36
		% EGFR izražajnosti	94,4 %	5,6 %	,0%	100,0 %
	2	Ukupno	25	20	3	48
		% EGFR izražajnosti	52,1 %	41,7 %	6,3 %	100,0 %
	3	Ukupno	13	22	8	43
		% EGFR izražajnosti	30,2 %	51,2 %	18,6 %	100,0 %
	Total	Ukupno	127	47	11	185
		% EGFR izražajnosti	68,6 %	25,4 %	5,9 %	100,0 %

U Tablici 35. prikazana je povezanost stupnja izražajnosti EGFR-a i sklonosti povratu (recidivu) bolesti. S povećanjem izražajnost EGFR-a povećava se i sklonost povratu bolesti na razini statističke značajnosti ( $\chi^2 = 66,913$ ;  $df = 3$ ;  $p < 0,001$ ). U 3. stupnju izražajnosti EGFR-a povrat bolesti našli smo u 74,4 % bolesnika, dok je bez povrata bolesti u istome stupnju izražajnosti 25,6 % bolesnika. Analizirajući izražajnost EGFR-a stupnja 0, bez povrata bolesti bilo je 93,1 %, a s povratom 6,9 % bolesnika.

**Tablica 35.** Prikaz odnosa izražajnosti EGFR-a i sklonosti povratu (recidivu) bolesti

			Recidiv		Total
			Bez recidiva	S recidivom	
EGFR izražajnost	0	Ukupno	54	4	58
		% EGFR izražajnosti	93,1 %	6,9 %	100,0 %
	1	Ukupno	32	4	36
		% EGFR izražajnosti	88,9 %	11,1 %	100,0 %
	2	Ukupno	21	27	48
		% EGFR izražajnosti	43,8 %	56,3 %	100,0 %
	3	Ukupno	11	32	43
		% EGFR izražajnosti	25,6 %	74,4 %	100,0 %
	Total	Ukupno	118	67	185
		% EGFR izražajnosti	63,8 %	36,2 %	100,0 %

Tablica 36. prikazuje odnos izražajnosti EGFR-a i statusa ispitanika. Postotak umrlih od osnovne bolesti raste upravo proporcionalno s porastom izražajnosti EGFR-a. Tako pri nultom stupnju izražajnosti EGFR-a 6,9 % bolesnika umire od osnovne bolesti. U 3. stupnju izražajnosti od osnovne bolesti umire 74,4 % bolesnika. Suprotno ovome, pri nultom stupnju izražajnosti EGFR-a živih bolesnika je 67,2 %, a u 3. stupnju izražajnosti živih bolesnika je samo 14 %. Rezultati prikazani u ovoj tablici statistički su značajni ( $\chi^2 = 66,218$ ;  $df = 6$ ;  $p < 0,001$ ).

**Tablica 36.** Prikaz odnosa izražajnosti EGFR-a i statusa bolesnika

		Status				
		Umrli od osnovne bolesti	Umrli od druge bolesti	Živi	Total	
<b>EGFR izražajnost</b>	<b>0</b>	Ukupno	4	15	39	58
		% EGFR izražajnosti	6,9 %	25,9 %	67,2 %	100,0 %
	<b>1</b>	Ukupno	4	11	21	36
		% EGFR izražajnosti	11,1 %	30,6 %	58,3 %	100,0 %
	<b>2</b>	Ukupno	25	9	14	48
		% EGFR izražajnosti	52,1 %	18,8 %	29,2 %	100,0 %
	<b>3</b>	Ukupno	32	5	6	43
		% EGFR izražajnosti	74,4 %	11,6 %	14,0 %	100,0 %
Total	Ukupno	65	40	80	185	
	% EGFR izražajnosti	35,1 %	21,6 %	43,2 %	100,0 %	

U analizi odnosa izražajnosti EGFR-a i preživljenja primjećujemo da je postotak preživljenja obrnuto proporcionalan stupnju izražajnosti navedenog biljega (Tablica 37.). Pri višem stupnju izražajnosti EGFR-a postotak je preživljenja niži, i obrnuto. Iz tablice je razvidno da je u nultom stupnju izražajnosti EGFR-a 73,6 % bolesnika preživjelo iznad pet godina, a pri 3. stupnju izražajnosti EGFR-a samo 17,1 % ispitanika. Analizirani podaci također su statistički značajni ( $\chi^2 = 33,529$ ;  $df = 3$ ;  $p < 0,001$ ).

**Tablica 37.** Prikaz odnosa izražajnosti EGFR-a i preživljenja

			Preživljenje		Total
			Do 5 godina	Iznad 5 godina	
<b>EGFR izražajnost</b>	<b>0</b>	Ukupno	14	39	53
		% EGFR izražajnosti	26,4 %	73,6 %	100,0 %
	<b>1</b>	Ukupno	13	19	32
		% EGFR izražajnosti	40,6 %	59,4 %	100,0 %
	<b>2</b>	Ukupno	29	17	46
		% EGFR izražajnosti	63,0 %	37,0 %	100,0 %
	<b>3</b>	Ukupno	34	7	41
		% EGFR izražajnosti	82,9 %	17,1 %	100,0 %
	Total	Ukupno	90	82	172
		% EGFR izražajnosti	52,3 %	47,7 %	100,0 %

#### 4. 4. PRIKAZ ODNOSA HPV POZITIVNIH KARCINOMA I IZRAŽAJNOSTI EGFR-a

Promatrajući rezultate iz Tablice 38., zaključujemo da postotak bolesnika pozitivnih na niskorizične (benigne) HPV DNA tipove (HPV 0) raste s povećanjem stupnja izražajnosti EGFR-a, i obrnuto, da u skupini bolesnika pozitivnih na visokorizične (maligne) HPV DNA tipove (HPV 1) taj postotak opada. Tako u skupini HPV 0 18,2 % ispitanika ima izražajnost EGFR-a stupnja 0, a 45,5 % ispitanika izražajnost EGFR-a stupnja 3. U skupini bolesnika HPV 1, 36 % bolesnika ima izražajnost EGFR-a stupnja 0, a samo 4 % ispitanika izražajnost EGFR-a stupnja 3. Povezanost HPV infekcije i izražajnosti EGFR-a statistički je značajna ( $\chi^2 = 9,490$ ;  $df = 3$ ;  $p = 0,023$ ).

**Tablica 38.** Prikaz odnosa HPV pozitivnih karcinoma i izražajnosti EGFR-a

			EGFR izražajnost				Total
			0	1	2	3	
HPV	0	Ukupno	2	2	2	5	11
		% HPV	18,2 %	18,2 %	18,2 %	45,5 %	100,0 %
	1	Ukupno	9	7	8	1	25
		% HPV	36,0 %	28,0 %	32,0 %	4,0 %	100,0 %
Total	Ukupno	11	9	10	6	36	
	% HPV	30,6 %	25,0 %	27,8 %	16,7 %	100,0 %	

Tablicom 39. prikazali smo kategorijski odnos HPV pozitivnih niskorizičnih i visokorizičnih karcinoma (HPV 0, HPV 1) i stupnja izražajnosti EGFR-a (EGFR 0, EGFR 1) sa: stadijem bolesti, patohistološkim gradusom, sklonošću metastaziranju i preživljenjem. Rezultati ovih odnosa uglavnom nemaju statističke značajnosti ( $\chi^2 = 11,333$ ;  $df = 9$ ;  $p = 0,254$ ) ( $\chi^2 = 7,650$ ;  $df = 6$ ;  $p = 0,265$ ) ( $\chi^2 = 14,612$ ;  $df = 6$ ;  $p = 0,023$ ) ( $\chi^2 = 2,476$ ;  $df = 3$ ;  $p = 0,480$ ).

**Tablica 39.** Kategorijski prikaz odnosa HPV pozitivnih niskorizičnih i viskorizičnih karcinoma, stupnja izražajnosti EGFR-a i stadija bolesti, patohistološkog gradusa, sklonosti metastaziranju i preživljenja

Kategorije	Stadij bolesti						PH gradus				Metastaze				Preživljenje			
	I	II	III	IV	Total	I	II	III	Total	0 meta.	unill. meta.	bill. meta.	Total	≤5 g.	≥ 5 g.	Total		
	Count	%	Count	%	Count	%	Count	%	Count	%	Count	%	Count	%	Count	%	Count	
HPV 0 EGFR 0	1	25,0 %	0	0 %	2	50,0 %	1	25,0 %	4	100,0 %	3	75,0 %	1	25,0 %	3	75,0 %	4	100,0 %
	0	0 %	0	0 %	3	75,0 %	1	25,0 %	7	100,0 %	2	28,6 %	3	42,9 %	4	57,1 %	7	100,0 %
HPV 1 EGFR 0	8	50,0 %	1	6,3 %	6	37,5 %	1	6,3 %	16	100,0 %	8	50,0 %	8	50,0 %	5	31,2 %	13	81,2 %
	2	12,5 %	2	12,5 %	4	25,0 %	1	6,3 %	9	56,2 %	4	25,0 %	2	12,5 %	6	37,5 %	9	56,2 %
HPV 1 EGFR 1	2	22,2 %	1	11,1 %	4	44,4 %	2	22,2 %	9	100,0 %	3	33,3 %	2	22,2 %	5	55,6 %	9	100,0 %
	11	30,6 %	2	5,6 %	15	41,7 %	8	22,2 %	36	100,0 %	15	41,7 %	20	55,6 %	14	38,9 %	33	92,8 %
Total	11	30,6 %	2	5,6 %	15	41,7 %	8	22,2 %	36	100,0 %	15	41,7 %	20	55,6 %	14	38,9 %	33	92,8 %
$\chi$ test	$(\chi^2 = 11,333; df = 9; p = 0,254)$						$(\chi^2 = 7,650; df=6; p<0,265)$				$(\chi^2 = 14,612; df = 6; p = 0,023)$				$(\chi^2 = 2,476; df = 3; p = 0,480)$			

U Tablici 40. prikazan je utjecaj kategorija HPV/EGFR na povrat (recidiv) bolesti. Najveći postotak recidiva nalazimo u kategorijskoj skupini bolesnika HPV 0/EGFR 1 (71,4 %), dok je bez povrata najveći postotak u kategorijskoj skupini HPV 1/EGFR 0 (94 %). Rezultati u ovoj tablici statistički su značajni ( $\chi^2 = 13,129$ ;  $df = 3$ ;  $p = 0,004$ ).

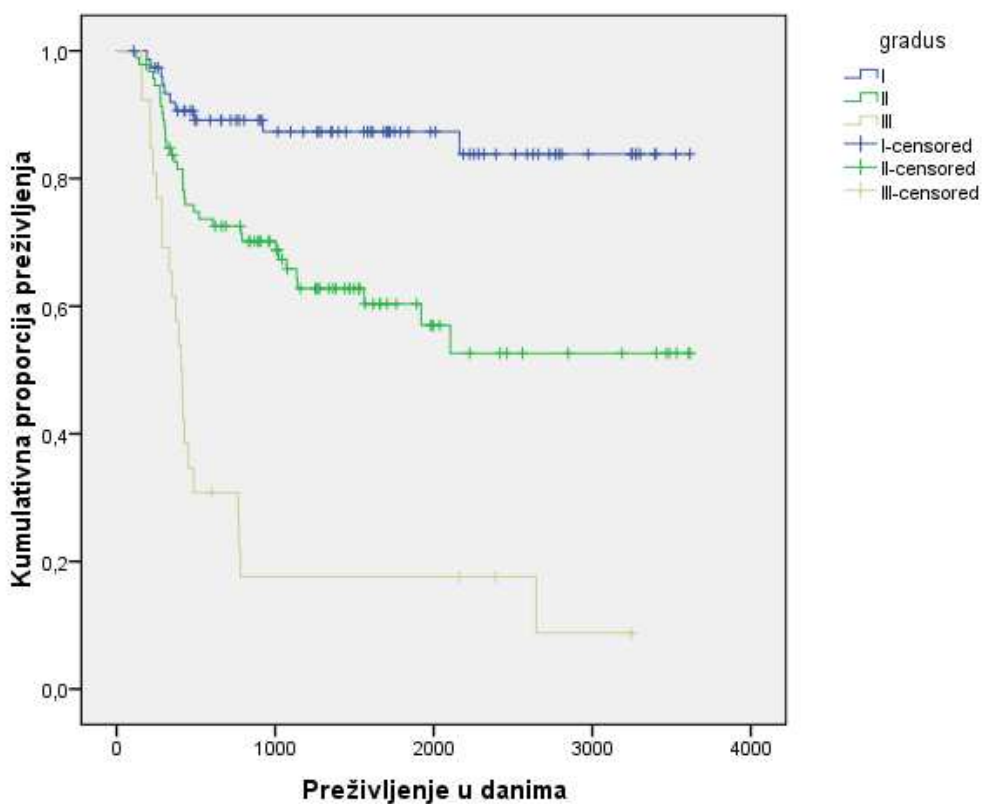
**Tablica 40.** Kategorijski prikaz odnosa HPV pozitivnih niskorizičnih i visokorizičnih karcinoma, stupnja izražajnosti EGFR-a i povrata (recidiva) bolesti

			Recidiv		Total
			Bez recidiva	S recidivom	
Kategorije	HPV 0 EGFR 0	Ukupno	4	0	4
		%	100,0 %	,0 %	100,0 %
	HPV 0 EGFR 1	Ukupno	2	5	7
		%	28,6 %	71,4 %	100,0 %
	HPV 1 EGFR 0	Ukupno	15	1	16
		%	93,8 %	6,3 %	100,0 %
	HPV 1 EGFR 1	Ukupno	5	4	9
		%	55,6 %	44,4 %	100,0 %
	Total	Ukupno	26	10	36
		%	72,2 %	27,8 %	100,0 %



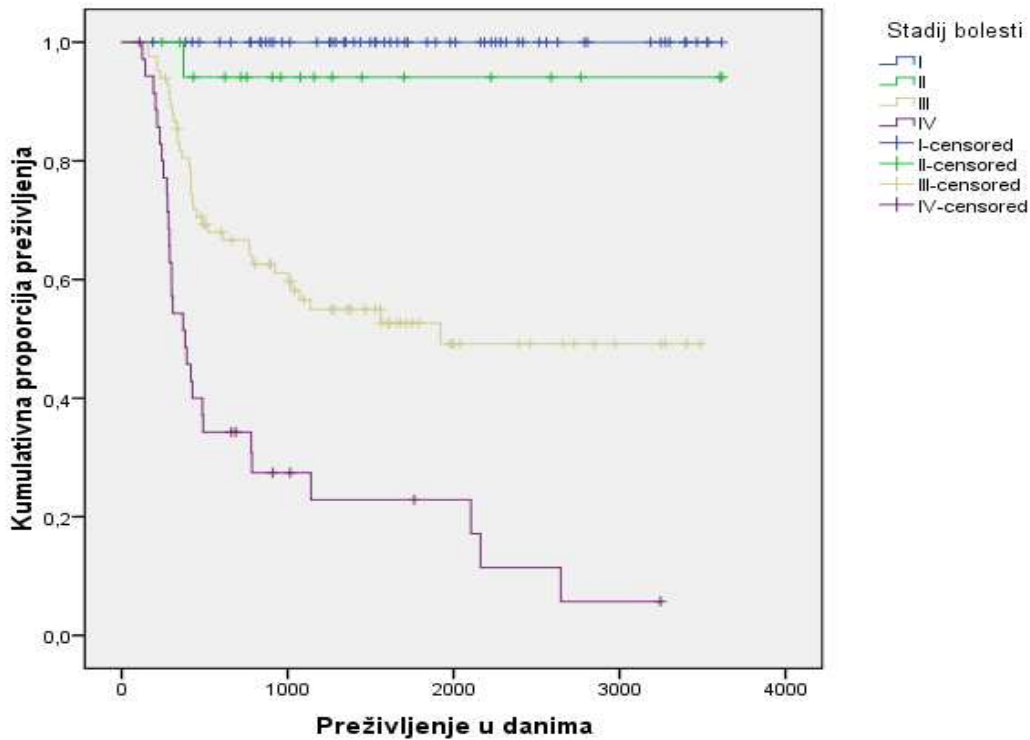
#### 4. 4. 1. Prikaz značenja kliničkih i patohistoloških osobina te izražajnosti EGFR-a u HPV pozitivnih karcinoma za preživljenje ispitanika

Na Slici 6. prikazana je Kaplan-Meierova krivulja preživljenja prema stupnju diferencijacije tumora (gradusu). Razvidno je da najkraće preživljenje nalazimo kod bolesnika s gradusom tumora III., a prikazana razlika u preživljenju statistički je značajna (*Log Rank test*,  $\chi^2 = 56,597$ ; *df* = 2; *p* < 0,001).



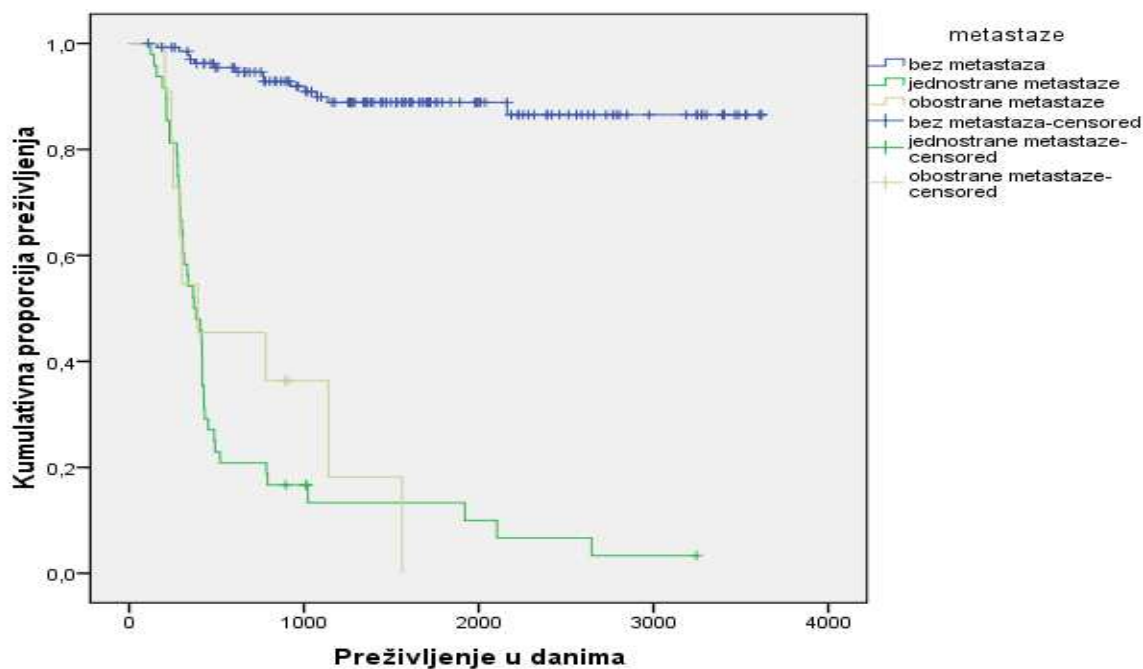
**Slika 6.** Krivulja preživljenja u danima prema gradusu tumora (G I. - plava boja, G II. - zelena boje, G III. - siva boja)

Jednako tako izrazito slabije preživljenje imaju bolesnici u stadiju bolesti IV., što je vidljivo iz Kaplan-Meierove krivulje preživljenja prikazane na Slici 7. Ta je razlika također statistički značajna (*Log Rank test*,  $\chi^2 = 93,408$ ; *df* = 3; *p* < 0,001).

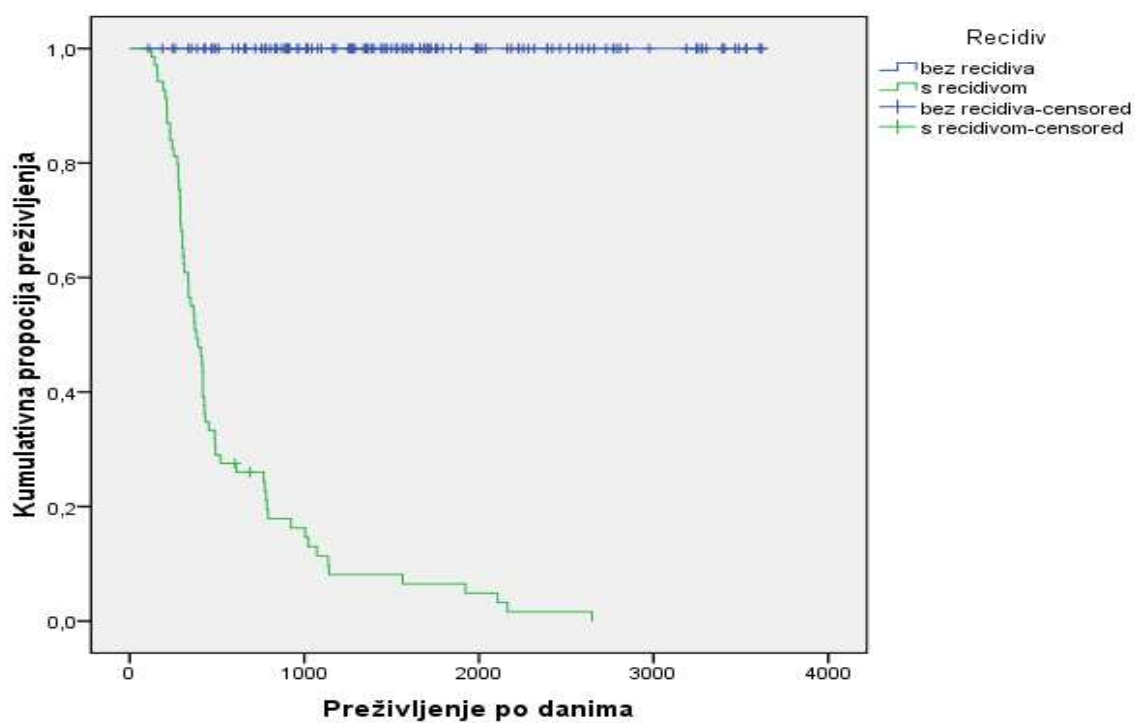


**Slika 7.** Krivulja preživljenja u danima prema stadiju bolesti (stadij I. - plava boja, stadij II. - zelena boja, stadij III. - siva boja, stadij IV. - ljubičasta boja)

Ove dvije prethodne varijable u skladu su s krivuljama odnosa između preživljenja i pojavnosti metastaza, odnosno povrata (recidiva) bolesti (Slika 8. i Slika 9.). U navedenim Kaplan-Meierovim krivuljama vide se značajna skraćenja preživljenja povezana s pojavom metastatske bolesti i recidiva, a razlike su također statistički značajne (za metastaze - *Log Rank test*,  $\chi^2 = 170,313$ ; *df* = 2; *p* < 0,001; za recidiv - *Log Rank test*,  $\chi^2 = 252,358$ ; *df* = 1; *p* < 0,001).

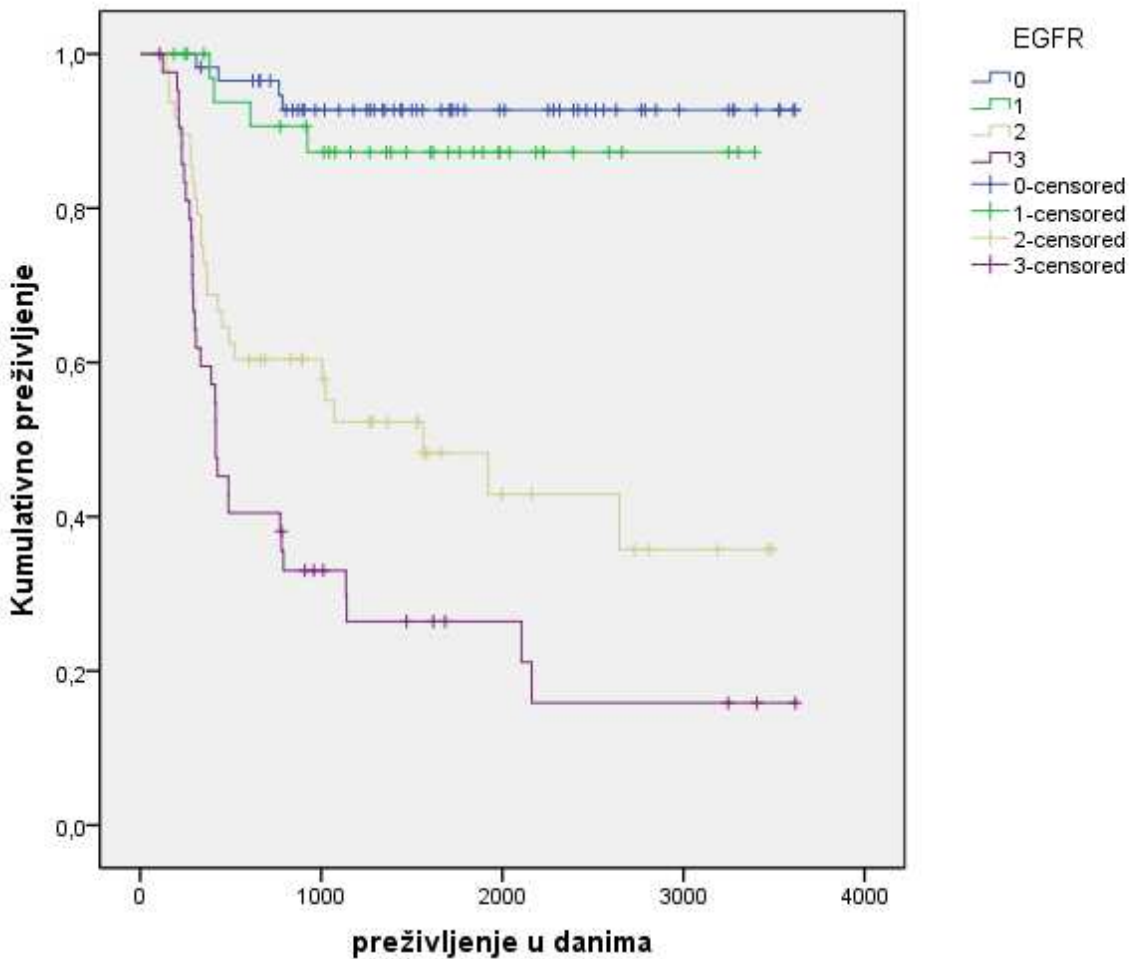


**Slika 8.** Krivulja preživljenja u danima prema pojavnosti metastaza (bez metastaza - plava boja, jednostrane metastaze - zelena boja, obostrane metastaze - siva boja)



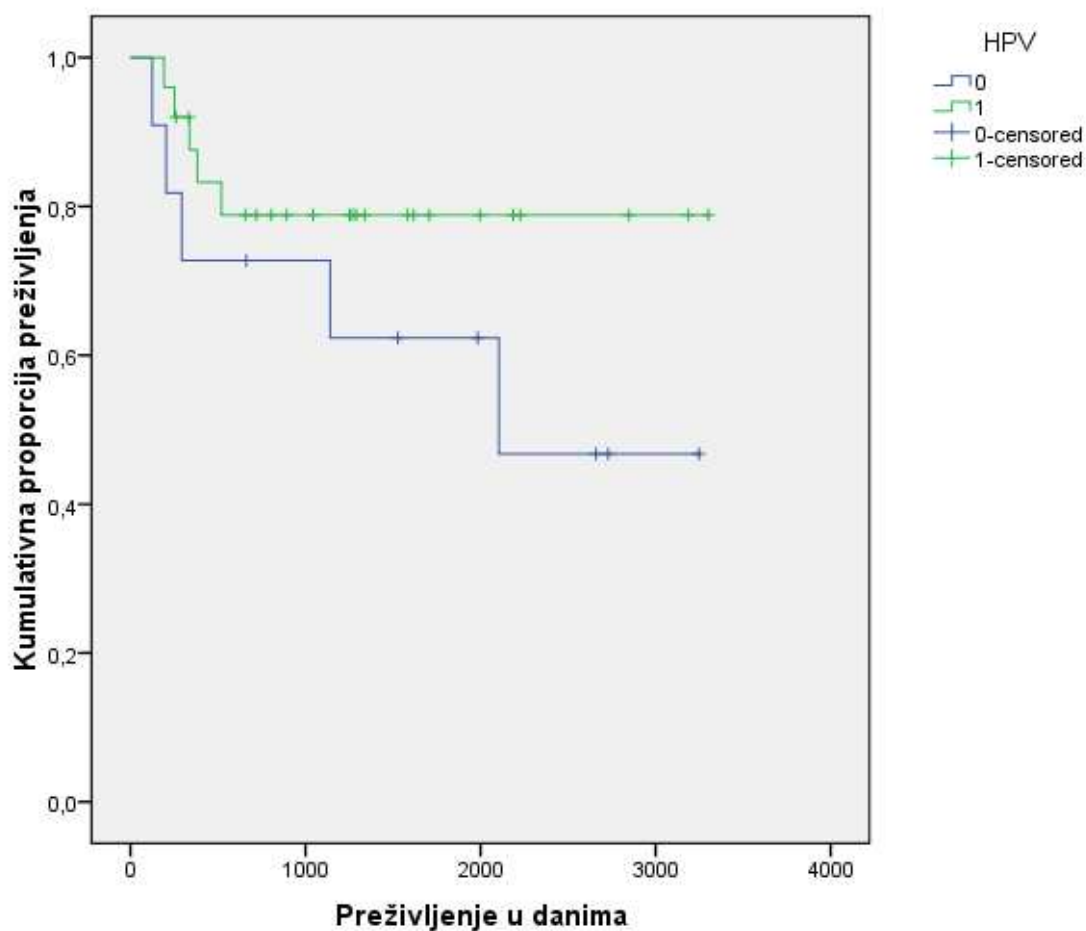
**Slika 9.** Krivulja preživljenja u danima prema pojavi recidiva bolesti (bez recidiva - plava boja, s recidivom - zelena boja)

Kaplan-Meierova krivulja preživljenja u odnosu na izražajnost EGFR-a pokazuje statistički značajnu razliku (*Log Rank test*,  $\chi^2 = 75,049$ ;  $df = 3$ ;  $p < 0,001$ ) u preživljenju između četiri skupine bolesnika koji imaju različit stupanj izražajnosti EGFR-a. Bolesnici s jačim stupnjem izražajnosti EGFR-a (stupanj 2 i 3) imaju lošiji ukupni postotak preživljenja, koji značajno pada s povećanjem stupnja izražajnosti navedenog biljega (slika 10).



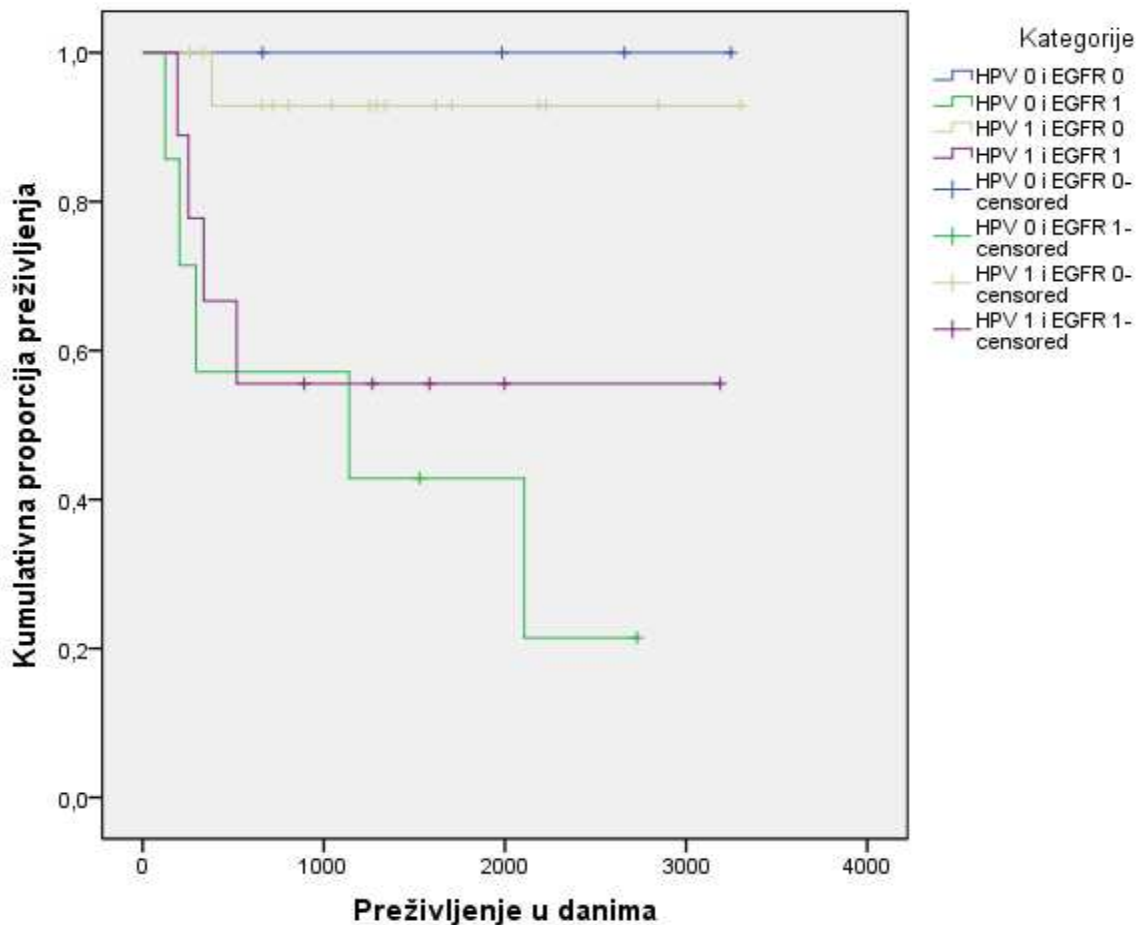
**Slika 10.** Krivulja preživljenja po danima u odnosu na stupanj izražajnosti EGFR-a (**0** odsutnost bojanja - plava boja; **1** blago bojanje u više od 10 % - zelena boja; **2** srednje jako bojanje u više od 10 % - siva boja; **3** intenzivno bojanje u više od 10 % - ljubičasta boja)

Za razliku od prethodne krivulje, Kaplan-Meierova krivulja preživljenja za bolesnike s HPV pozitivnim karcinomima koja ne pokazuje statistički značajnu razliku (*Log Rank test*,  $\chi^2 = 1,705$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0,192$ ) ipak pokazuje bolje preživljenje kod onih koji su bili pozitivni na visokorizične sojeve HPV-a (slika 11).



**Slika 11.** Krivulja preživljenja po danima u odnosu na HPV pozitivne karcinome (**0** - HPV 0 niskorizični sojevi - plava boja; **1** - HPV 1 visokorizični sojevi - zelena boja)

Ispitujući preživljenje bolesnika podijeljenih u kategorije različitog odnosa izražajnosti HPV/EGFR, razvidno je da dvije kategorije imaju kraće preživljenje. Izrazito slabije preživljenje zapaža se kod kategorije HPV0/EGFR1 te u kategoriji HPV1/EGFR1, koja je ipak prognostički nešto bolja (Slika 12.). Time se EGFR potvrđuje kao dominantna komponenta za određivanje prognoze, odnosno mogućeg preživljenja. Ovdje je dobivena statistički značajna razlika (*Log Rank test*,  $\chi^2 = 12,178$ ; *df* = 3; *p* = 0,007).



**Slika 12.** Krivulja preživljenja po danima u odnosu na kategorije HPV/EGFR (HPV 0/EGFR 0 - plava boja, HPV 0/EGFR 1 - zelena boja, HPV 1/EGFR 0 - siva boja, HPV 1/EGFR 1 - ljubičasta boja)

## 5. RASPRAVA

Pločasti karcinom grkljana, a poglavito njegov uznapredovali oblik, odavno je uvršten u skupinu tumora s lošom prognozom i s relativno niskim postotkom preživljenja. Imajući u vidu sveukupnu agresivnost ove skupine tumora, veoma je važna kvalitetna procjena proširenosti bolesti u trenutku postavljanja dijagnoze, pravilna evaluacija prihvaćenih prognostičkih čimbenika te multidisciplinarni pristup planiranju modaliteta liječenja.

Budućnost liječenja malignoma pa tako i pločastog karcinoma grkljana leži u boljem prepoznavanju značajki biološkog ponašanja tumora i definiranju promjena koje koleriraju s njihovim biološkim ponašanjem (13).

U našem istraživanju prosječna starosna dob ispitanika iznosila je 65 godina s dominacijom muškog spola (96,4 %), što se slaže s podacima u literaturi (8, 9). Raspodjelom broja i postotka ispitanika prema čimbenicima rizika, pušenju i konzumiranju alkohola dobili smo podatke koji također koleriraju s podacima iz literature. Od ukupnog broja ispitanika (n = 196), čak 192 (98 %) bili su pušači, a 118 (60,2 %) ih je prekomjerno konzumiralo alkohol. Može se zaključiti da pušenje i alkoholni abuzus svojim sinergističnim učinkom čine važne egzogene čimbenike rizika za nastanak karcinoma grkljana (11, 12). Glede smještaja tumora, kod 78 (39,8 %) ispitanika tumor nalazimo u predjelu glotisa, u 60 (30,6 %) ispitanika tumor je smješten supraglotično, kod 3 (1,5 %) subglotično, a tumore smještene transglotično našli smo u 55 (28,1 %) bolesnika te se ovi podatci slažu s podacima nacionalnog registra za rak (8). Rezultati raspodjele ispitanika prema stadiju bolesti u našoj studiji također odgovaraju podacima Hrvatskoga nacionalnog registra za rak; uznapredovali stadiji bolesti (stadiji III. i IV.) dijagnosticirani su u većem postotku slučajeva (60,7 %) (8).

Promatrajući status bolesnika u navedenom vremenskom razdoblju nalazimo da je 34,2 % bolesnika umrlo od osnovne bolesti, 20,4 % umrlo ih je od druge bolesti, dok je živih ispitanika 45,4 %. Analizom raspodjele ispitanika prema patohistološkom gradusu tumora utvrdili smo da je 77 (39,3 %) bolesnika s tumorom patohistološkoga gradusa I., 93 bolesnika (47,4 %) s gradusom II., a 26 (13,3 %) bolesnika s tumorom patohistološkoga gradusa III.

Razmatrajući odnos između patohistološkoga gradusa i stadija bolesti, primjećujemo da je 56,9 % bolesnika s patohistološkim gradusom I. u stadiju bolesti I., a čak 77,7 % bolesnika s

gradusom II. i III. u stadiju bolesti IV. Povezanost između stadija bolesti i patohistološkoga gradusa statistički je značajna ( $\chi^2 = 19,698$ ;  $df = 6$ ;  $p = 0,003$ ). Isto tako primjećujemo da je sklonost povratu (recidivu) bolesti upravo proporcionalna patohistološkome gradusu. Prema dobivenim rezultatima čak 85,5 % bolesnika s gradusom II. i III. imalo je povrat bolesti, dok 52,8 % bolesnika patohistološkoga gradusa I. povrat bolesti nije imalo. Razvidno je kako stupanj patohistološkoga gradusa i povrat bolesti pokazuju statistički značajnu povezanost ( $\chi^2 = 49,492$ ;  $df = 2$ ;  $p < 0,001$ ). U ispitivanom uzorku, 76,1 % bolesnika s višim patohistološkim gradusom (II. i III.) umrlo je unutar prvih pet godina. Stupanj patohistološkoga gradusa i preživljenje bolesnika pokazuju statistički značajnu povezanost ( $\chi^2 = 19,104$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$ ), a dobiveni rezultati podudaraju se s podacima iz literature (27). Promatrajući krivulju preživljenja između tri skupine bolesnika s različitim patohistološkim gradusima, nalazimo također statistički značajnu razliku (*Log Rank test*,  $\chi^2 = 56,597$ ;  $df = 2$ ;  $p < 0,001$ ), gdje je najkraće preživljenje kod bolesnika s najvećim tumorskim gradusom (III.) (27).

Čak je 56,6 % ispitanika koji su u trenutku postavljanja dijagnoze imali dokazane jednostrane ili obostrane metastaze umrlo unutar pet godina. Za razliku od toga, 95,1 % bolesnika koji su preživjeli pet godina nisu imali regionalnih metastaza te je ovaj odnos statistički značajan ( $\chi^2 = 53,230$ ;  $df = 2$ ;  $p < 0,001$ ). Gledajući krivulju preživljenja za skupine bolesnika s dokazanim metastazama i bez dokazanih metastaza, jasno uočavamo statistički značajno skraćenje preživljenja povezano s pojavom metastatske bolesti (*Log Rank test*,  $\chi^2 = 170,313$ ;  $df = 2$ ;  $p < 0,001$ ). Prema relevantnoj literaturi, zahvaćenost regionalnih limfnih čvorova kod karcinoma grkljana značajan je prognostički čimbenik (13, 28, 36).

Identične odnose dobili smo analizom rezultata povezanosti povrata (recidiva) bolesti s preživljenjem. Bolesnici koji su preživjeli pet godina u 95,1 % slučajeva nisu imali povrat bolesti, dok je 70,7 % bolesnika umrlih unutar pet godina imalo dokazan recidiv bolesti. Povezanost između povrata bolesti i preživljenja statistički je značajna ( $\chi^2 = 78,383$ ;  $df = 1$ ;  $p < 0,001$ ). U krivulji preživljenja za skupine ispitanika s povratom i bez povrata bolesti vidimo statistički značajno kraće preživljenje bolesnika s recidivom bolesti (*Log Rank test*,  $\chi^2 = 252,358$ ;  $df = 1$ ;  $p < 0,001$ ).

Rezultatima našeg istraživanja dokazana je statistički značajna povezanost između postotka preživljenja i stadija bolesti. Unutar prvih pet godina, u visokom III. i IV. stadiju bolesti umrlo je čak 83,7 % bolesnika ( $\chi^2 = 53,404$ ;  $df = 3$ ;  $p < 0,001$ ). Jednako tako postoji statistički



značajna razlika u krivulji preživljenja između četiri skupine bolesnika koji imaju različit stupanj stadija bolesti (*Log Rank test*,  $\chi^2 = 93,408$ ;  $df = 3$ ;  $p < 0,001$ ). Dobiveni rezultati potvrđuju činjenicu da je stadij bolesti u trenutku postavljanja dijagnoze planocelularnih karcinoma glave i vrata različitih sijela najvažniji prognostički čimbenik (28). U stadiju bolesti prema klasifikaciji AJCC objedinjeni su veličina tumora, status limfnih čvorova vrata i prisutnost udaljenih metastaza (TNM status) (28, 85).

Nepobitna je činjenica da su stadij bolesti i patohistološki stupanj diferencijacije tumora standardni prognostički čimbenici karcinoma glave i vrata pa tako i grkljana. No s razvojem molekularne patologije pojavljuje se sve više znanstvenih radova i studija koje se bave proučavanjem suvremenih prognostičkih čimbenika. Oni najčešće obuhvaćaju različite onkogene i proliferacijske biljege, kao što su EGFR, *Ki-67*, PCNA, *p53*, *p16* i ciklin D1 (37, 38), a u praksi je s obzirom na sijelo tumora sve više prisutna dijagnostika HPV pozitivnih karcinoma. Od prethodno navedenih biljega *epidermal growth factor receptor* (EGFR) jedna je od čestih kinaza koja se stvara u stanicama karcinoma područja glave i vrata. Izražajnost EGFR-a smatra se jednim od najpouzdanijih prognostičkih biljega za procjenu recidiva bolesti, metastaza i preživljenja bolesnika od karcinoma nastalih u području glave i vrata (41, 42). Njegova pojačana izražajnost povezana je s lošijom prognozom i slabijim odgovorom na terapiju. Istodobno s navedenim biljezima istraživala se značajnost HPV infekcije koja je u posljednjih desetak godina postala zanimljiva zbog potencijalne uloge u patogenezi malignih tumora glave i vrata. Povezanost između virusne infekcije i nastanka tumora je dokazana, ali u različitim istraživanjima prisutnost HPV-a ima varijabilan udio u ukupnom broju karcinoma. Poznato je da HPV pozitivni karcinomi grkljana imaju benigniji tijek i bolji terapijski odgovor, što je jedan od osnovnih razloga zbog kojeg neki autori kod svih novootkrivenih karcinoma grkljana u redovitu kliničku praksu preporučaju uvođenje testiranja na HPV (53, 54). S druge strane, pojačana izražajnost EGFR-a vezana je uz lošiju prognozu i slabiji odgovor na terapiju (13, 18, 44, 45). Ovo istraživanje analiziralo je značajnost izražajnosti EGFR-a i dokazane HPV infekcije na većoj skupini bolesnika oboljelih od pločastog karcinoma grkljana te procjenu razlike u kliničkom ponašanju HPV pozitivnih karcinoma grkljana u odnosu na izražajnost EGFR-a.

U našoj studiji od ukupnog broja ispitanika ( $n=196$ ), 36 (18,4 %) njih bilo je HPV DNA pozitivno. Kod 11 (30,6 %) bolesnika dokazano je postojanje niskorizičnih sojeva HPV-a, a kod njih 25 (69,4 %) postojanje visokorizičnih tipova HPV-a. Dakle, u odnosu na ukupan

broja ispitanika (n=196) bolesnika s visokorizičnim tipovima HPV DNA bilo je 25 (12,8 %) i ovi podaci slažu se s podacima u literaturi (53, 54).

Ovim smo istraživanjem dokazali - bez statističke značajnosti, ali uz očitu medicinsku značajnost - povezanost HPV infekcije s patohistološkim gradusom, sklonošću regionalnom metastaziranju, stadijem i recidivom bolesti te statusom i preživljenjem bolesnika. HPV pozitivni visokorizični karcinomi imaju dominantno niži patohistološki gradus i značajno manji postotak lokoregionalnih metastaza od HPV pozitivnih niskorizičnih karcinoma. Isto tako bolesnici s HPV pozitivnim niskorizičnim karcinomima imaju u znatno većem postotku više stadije bolesti (90 % u stadiju bolesti III. i IV.), kao što u istoj skupini ispitanika nalazimo i veći postotak recidiva bolesti. Promatrajući odnos HPV pozitivnih karcinoma sa statusom bolesnika, našli smo veći postotak umrlih od osnovne bolesti u skupini bolesnika pozitivnih na niskorizične HPV sojeve, dok je veći postotak sveukupnog preživljenja dokazan u skupini bolesnika pozitivnih na visokorizične sojeve HPV-a. Krivulja preživljenja za bolesnike s HPV pozitivnim karcinomima koja nije dala statističku značajnu razliku (*Log Rank test*,  $\chi^2 = 1,705$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0,192$ ), pokazala je značajno bolje preživljenje kod bolesnika koji su bili pozitivni na visokorizične sojeve HPV-a. Većina studija različitih autora dokazala je lošiju prognozu HPV DNA negativnih tumora u odnosu na tumore s dokazanim bilo kojim visokorizičnim tipom HPV DNA (20, 53, 67, 76).

Naša studija obradila je i rezultate prikaza odnosa patohistoloških osobina bolesnika s dokazanim HPV pozitivnim visokorizičnim sojevima (HPV pozitivni karcinomi) i svih ostalih bolesnika, u koje su uključeni HPV negativni bolesnici i bolesnici s HPV pozitivnim niskorizičnim sojevima (HPV „nulti“ karcinomi). Dobiveni rezultati identični su prethodnima, kojima smo dokazali povezanost HPV pozitivnih visokorizičnih karcinoma s patohistološkim gradusom, sklonošću regionalnom metastaziranju, stadijem bolesti i statusom bolesnika. Tako u skupini bolesnika s HPV „nultim“ karcinomima u znatno većem postotku nalazimo više patohistološke graduse, jednostrane ili obostrane metastaze, više stadije bolesti te veći postotak umrlih od osnovne bolesti. Ovi rezultati nemaju statističku značajnost, ali imaju izrazito medicinsko značenje, što se slaže sa Syrjanenovim podacima da su HPV DNA pozitivni onkološki bolesnici imali bolji tijek bolesti i veću stopu preživljenja od onih u kojih nije nađena prisutnost HPV DNA (53). Slični podaci o višoj stopi preživljenja kod HPV pozitivnih laringealnih karcinoma izneseni su u Umudumovoj studiji, uz zaključak da HPV DNA osim značenja u nastanku primarnoga tumorskog procesa može imati važnu ulogu i u

razvoju metastatske tumorske bolesti (76). Bolje preživljenje HPV pozitivnih od HPV negativnih tumora kod istog stupnja zahvaćenosti limfnih čvorova i bolja prognoza bolesti u HPV pozitivnih tumora s vratnim metastazama rezultati su istraživanja Hoffmanna i suradnika, a slažu se s rezultatima naše studije (20). Premda prema mišljenju mnogih autora prava uloga HPV-a u karcinogenezi tumora glave i vrata do sada nije u potpunosti razjašnjena (12, 17, 39), rezultati naše studije mogu pridonijeti odgovoru na pitanje može li detekcija HPV DNA kod planocelularnoga karcinoma grkljana poslužiti kao prognostički čimbenik u odabiru i planiranju načina liječenja.

Izražajnost EGFR-a ispitivali smo kod 185 bolesnika od ukupnog broja (n=196), jer je zbog nedostajućih podataka 11 bolesnika bilo isključeno iz ovog dijela studije. Pozitivnu izražajnost EGFR-a dokazali smo kod 127 (68,6 %) ispitanika, a slične rezultate izražajnosti EGFR-a u premalignim laringealnim lezijama i pločastom karcinomu grkljana dobili su u svojoj studiji Gale, Kambič i suradnici (89). Izražajnost EGFR-a prikazali smo kroz četiri stupnja. Izražajnost EGFR-a stupnja 0 utvrdili smo kod 58 (31,4 %) bolesnika, izražajnost EGFR-a stupnja 1 u 36 (19,5 %) bolesnika, stupnja 2 u 48 (25,9 %) i stupnja 3 u 43 (23,2 %) bolesnika.

U našoj studiji dokazali smo povezanost patohistološkoga gradusa, stadija bolesti, sklonosti metastaziranju, povratu (recidivu) bolesti, statusa i preživljenja bolesnika prema stupnju izražajnosti EGFR-a. Rezultati pokazuju statistički značajnu povezanost između navedenih varijabli ( $p < 0,001$ ). Što je gradus viši, prisutniji je viši stupanj izražajnosti EGFR-a, a kod manje izražajnosti EGFR-a veći broj pacijenata ima niži, dakle povoljniji patohistološki gradus. Tako pri izražajnosti EGFR-a stupnja 3 nalazimo 90,7 % (n = 39) bolesnika u patohistološkim gradusima II. i III. Istovjetne rezultate prikazuju Gale, Kambič i sur. u svojoj studiji, prikazavši sekvencu genskih promjena spektra epitelnih hiperplastičnih laringealnih lezija (EHLL) i laringealnog karcinoma, koristeći se ISH-om (*non-isotopic in situ hybridization*) za kromosome 7 i 17 u korelaciji s prekomjernom izražajnošću proteina *p53* i EGFR-a. Imunoreaktivnost za oba biljega rasla je s gradusom lezija (89). Dokazali smo statistički značajnu povezanost ( $p < 0,001$ ) između stupnja izražajnosti EGFR-a i patohistološkoga gradusa, po čemu se naši rezultati u potpunosti slažu s radom Gale i suradnika. Kod varijable metastaze, pri izražajnosti EGFR-a stupnja 0, bez regionalnih metastaza bilo je 94,8 % (n = 55) bolesnika. Najveći stupanj izražajnosti EGFR-a (stupanj 3) nosi veliki rizik pojave regionalnih metastaza. Jednostrane metastaze našli smo u 51,2 % (n =

22), a obostrane u 18,6 % (n = 8) bolesnika, što je ukupno 69,8 % bolesnika. Dokazali smo statističku povezanost izražajnosti EGFR-a ( $p < 0,001$ ) i sklonosti metastaziranju, a isti su rezultati utvrđeni u istraživanju Almadorija i skupine autora gdje je multivarijantnom analizom, status EGFR-a bio signifikantan neovisni prognostički čimbenik pojave vratnih metastaza (41). Uspoređujući varijablu recidiv u trećem stupnju izražajnosti EGFR-a uočavamo čak 74,4 % (n = 32) pacijenata s povratom bolesti, dok je bez recidiva u istom stupnju izražajnosti biljega 25,6 % (n = 11) bolesnika. Naši se rezultati u potpunosti slažu sa studijom Krecicikog i skupine autora u kojoj je dokazana statistički značajna povezanost izražajnosti EGFR-a s pojavom recidiva i slabijim preživljenjem kod pločastog karcinoma grkljana (84). Statistički značajan odnos nalazimo i za varijablu stadij bolesti: kod stadija bolesti II. 4,7 % (n = 2) bolesnika ima treći stupanj izražajnosti EGFR-a, a kod stadija IV. nalazimo znatno više, 51,2 % (n = 22) pacijenata s trećim stupnjem izražajnosti EGFR-a. Uspoređujući naše rezultate, utvrdili smo kako se oni slažu sa studijama autora kao što su Koynova i Vlachtsis (81, 85). Oni su utvrdili pojačanu izražajnost EGFR-a u T3 i T4 stadijima bolesti te su tu činjenicu povezali s utjecajem na tumorsku progresiju. U ovim navedenim studijama kao i u našoj studiji utvrđena je statistički značajna povezanost izražajnosti EGFR-a i stadija bolesti ( $p < 0,001$ ). Analizirajući varijablu status, konstatiramo da postotak umrlih bolesnika od osnovne bolesti raste upravo proporcionalno s porastom izražajnosti EGFR-a. Tako pri nultom stupnju izražajnosti EGFR-a, 6,9 % (n = 4) bolesnika umire od osnovne bolesti, a kod 3. stupnja izražajnosti od osnovne bolesti umire 74,4 % (n = 32) bolesnika. U analizi preživljenja, u trećem stupnju izražajnosti EGFR-a do 5 godina preživjelo je 82,9 % bolesnika (n = 34), a iznad 5 godina tek 17,1 % (n = 7) bolesnika. Krivulja preživljenja pokazuje statistički značajnu razliku (*Log Rank test*,  $\chi^2 = 75.049$ ;  $df = 3$ ;  $p < 0,001$ ) u preživljenju između četiri skupine bolesnika koji imaju različit stupanj izražajnosti EGFR-a. Bolesnici s najjačim stupnjem izražajnosti EGFR-a (stupanj 3) imaju najlošiji ukupni postotak preživljenja, koji značajno pada s povećanjem stupnja izražajnosti navedenog biljega. Preživljenje bolesnika iznad 5 godina u trećem stupnju izražajnosti iznosi samo 17,1 %. Izražajnost EGFR-a u našem istraživanju pokazala je potencijalnu prediktivnu vrijednost za pločaste karcinome grkljana. Imajući u vidu broj bolesnika uključenih u studiju, ovo istraživanje može dati značajan prinos prepoznavanju EGFR-a kao prognostičkoga biološkog biljega za procjenu agresivnosti pločastog karcinoma grkljana, a samim time i uvođenje ovog biljega u planiranje terapijskog postupka (13, 18, 44, 45, 85, 91).

U našem istraživanju analizirali smo izražajnost i međusobni utjecaj HPV infekcije i EGFR-a kod pločastog karcinoma grkljana. Dokazali smo da je povezanost HPV infekcije i izražajnosti EGFR-a statistički značajna ( $\chi^2 = 9,490$ ;  $df = 3$ ;  $p = 0,023$ ). Postotak bolesnika pozitivnih na niskorizične sojeve HPV-a raste s povećanjem stupnja izražajnosti EGFR-a, i obrnuto, pada u skupini bolesnika pozitivnih na visokorizične sojeve HPV-a. Dakle, u skupini bolesnika pozitivnih na niskorizične sojeve HPV-a, 18,2 % ispitanika ima izražajnost EGFR-a stupnja 0, a 45,5 % ispitanika izražajnost EGFR-a stupnja 3. U skupini bolesnika pozitivnih na visokorizične sojeve HPV-a 36 % bolesnika ima izražajnost EGFR-a stupnja 0, a samo 4 % ispitanika izražajnost EGFR-a stupnja 3. Iste odnose na granici statističke značajnosti ( $\chi^2 = 6,296$ ;  $df = 3$ ;  $p = 0,098$ ) prema izražajnosti EGFR-a dobili smo analizirajući bolesnike pozitivne na visokorizične sojeve HPV-a (HPV pozitivni karcinomi) i ostale bolesnike koji su HPV negativni ili pozitivni na niskorizične sojeve HPV-a (HPV „nulti“ karcinomi). S porastom stupnja izražajnosti EGFR-a raste postotak bolesnika u skupini HPV „nultih“ karcinoma, i obrnuto: u skupini HPV pozitivnih karcinoma taj postotak drastično pada. Tako pri izražajnosti EGFR-a stupnja 3, u skupini HPV „nultih“ karcinoma nalazimo 97,7 % ispitanika, dok pri istom stupnju izražajnosti EGFR-a u skupini HPV pozitivnih karcinoma nalazimo samo 2,3 % bolesnika.

Rezultate slične ovima opisao je Johnston sa suradnicima, a i u nekoliko objavljenih studija utvrđen je porast EGFR-a kod laringealnih papiloma uzrokovanih HPV-om (54, 55, 70, 77). Wu sa skupinom autora također zaključuje da rekurentni respiratorni papilomi uzrokovani HPV infekcijom predstavljaju benigne lezije kod kojih se može naći pretjerana izražajnost EGFR-a (88). Za razliku od ovih autora, Almadori je u svojoj studiji koja je analizirala izražajnost EGFR-a i HPV infekciju kod pločastog karcinoma grkljana, dobio rezultate suprotne od naših. HPV DNA otkriven je u 35,7 % tumora, isključivo je pripadao genotipovima 16, 18, i 33 HPV-a i razina EGFR-a bila je značajno viša u HPV pozitivnih negoli u HPV negativnih slučajeva. Zaključak studije potvrđuje tezu da virusni onkoproteini induciraju poremećaj signalizacije za rast i diferencijacijustanice te da uloga infekcije HPV-om visokog rizika u karcinogenezi grkljana ipak još nije sasvim jasna (63).

Analizom rezultata odnosa HPV pozitivnih niskorizičnih i visokorizičnih karcinoma i stupnja izražajnosti EGFR-a sa stadijem bolesti, patohistološkim gradusom, sklonošću metastaziranju i preživljenjem, nismo dobili statističku značajnost, dok je njihova povezanost na statističkoj razini utvrđena prema recidivu bolesti ( $\chi^2 = 13,129$ ;  $df = 3$ ;  $p = 0,004$ ). Najveći postotak

recidiva (71,4 %) nalazimo u kategorijskoj skupini bolesnika pozitivnih na niskorizične sojeve HPV-a uz pojačanu izražajnost EGFR-a, dok je bez recidiva najveći postotak (94 %) u kategorijskoj skupini pozitivnih na visokorizične sojeve HPV-a uz negativnu izražajnost EGFR-a.

Isto tako, analizirajući utjecaj promatranih kliničkih i patohistoloških značajki karcinoma s prisutnošću HPV infekcije i izražajnosti EGFR-a na preživljenje, dobili smo rezultate koji su u skladu sa studijama Vlachtsisa i sur. te Pivota i suradnika (85, 86). Kao i navedeni autori dokazali smo statistički značajnu povezanost preživljenja sa: stadijem bolesti ( $\chi^2 = 53,404$ ;  $df = 3$ ;  $p < 0,001$ ), sklonošću regionalnom metastaziranju ( $\chi^2 = 53,230$ ;  $df = 2$ ;  $p < 0,001$ ) i recidivom bolesti ( $\chi^2 = 78,383$ ;  $df = 1$ ;  $p < 0,001$ ). Navedene studije prepoznale su EGFR kao prihvatljiv biološki parametar s prognostičkim značenjem u laringealnim karcinomima uz već postojeće standardne prognostičke čimbenike, kao što su stadij i sjelo tumora.

Krivulja preživljenja bolesnika podijeljenih u četiri kategorije različitih odnosa izražajnosti HPV-a i EGFR-a pokazuje statistički značajnu razliku (*Log Rank test*,  $\chi^2 = 12,178$ ;  $df = 3$ ;  $p = 0,007$ ). Razvidno je da obje kategorije ispitanika kojima je dokazana pojačana izražajnost EGFR-a imaju kraće preživljenje. Izrazito slabije preživljenje zamjećuje se kod kategorije bolesnika pozitivnih na niskorizične sojeve HPV-a i prognostički nešto bolje u kategoriji bolesnika pozitivnih na visokorizične sojeve HPV-a. Time se EGFR potvrđuje kao dominantna komponenta za određivanje prognoze, odnosno mogućeg preživljenja.

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovi dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Utvrđena je povezanost patohistološkoga gradusa i stadija bolesti koja je statistički značajna ( $p = 0,003$ ); statistički je značajna povezanost gradusa sa sklonošću recidiviranju bolesti i preživljenjem bolesnika ( $p < 0,001$ ).
2. Statistički je značajna povezanost preživljenja bolesnika sa sklonošću lokoregionalnom metastaziranju, stadijem i recidivom bolesti ( $p < 0,001$ ).
3. Infekcija HPV-om povezana je sa stupnjem patohistološkoga gradusa, sklonošću regionalnom metastaziranju, stadijem i recidivom bolesti te statusom i preživljenjem bolesnika.
4. Stupanj izražajnosti EGFR-a značajno je povezan sa stupnjem patohistološkoga gradusa, stadijem bolesti, sklonošću lokoregionalnom metastaziranju, recidivom bolesti, statusom bolesti i preživljenjem bolesnika.
5. Uočava se razlika u preživljenju između dviju skupina bolesnika koji su bili pozitivni na visokorizične i niskorizične sojeve HPV-a premda nema razinu statističke značajnosti.
6. Postoji statistički značajna razlika u preživljenju između četiri skupine bolesnika koji imaju različit stupanj izražajnosti EGFR-a.
7. Povezanost infekcije HPV-om i izražajnosti EGFR-a je značajna ( $\chi^2 = 9,490$ ;  $df = 3$ ;  $p = 0,023$ ). S povećanjem stupnja izražajnosti EGFR-a raste postotak bolesnika pozitivnih na niskorizične sojeve HPV-a. Značajna je povezanost između HPV pozitivnih i negativnih karcinoma i izražajnosti EGFR-a ( $\chi^2 = 6,296$ ;  $df = 3$ ;  $p = 0,098$ ).
8. Povezanost kategorija bolesnika različitih odnosa izražajnosti HPV-a i EGFR-a sa stadijem bolesti, patohistološkim gradusom, sklonošću metastaziranju i preživljenjem

uglavnom nije statistički značajna. Taj odnos prema recidivu bolesti statistički je značajan ( $\chi^2 = 13,129$ ;  $df = 3$ ;  $p = 0,004$ ). Najveći postotak recidiva nalazimo u kategorijskoj skupini bolesnika pozitivnih na niskorizične sojeve HPV-a uz pojačanu izražajnost EGFR-a.

9. Postoji statistički značajna razlika u preživljenju kategorija bolesnika različitog odnosa izražajnosti HPV-a i EGFR-a. Obje kategorije ispitanika kojima je dokazana pojačana izražajnost EGFR-a imaju kraće preživljenje.



## 7. SAŽETAK

Cilj ovoga rada bio je utvrditi prisutnost infekcije humanim papiloma virusom (HPV) i izražajnost receptora epidermalnog čimbenika rasta (EGFR) te njihove moguće povezanosti s histopatološkim i kliničkim značajkama pločastog karcinoma grkljana. Isto tako trebalo je ispitati utjecaj EGFR-a u pacijenata s HPV pozitivnim pločastim karcinomom grkljana na prognozu i preživljenje bolesnika. U istraživanje je bilo uključeno 196 bolesnika s pločastim karcinomom grkljana liječenih u Klinici za bolesti uha, grla i nosa i kirurgiju glave i vrata KBC-a Split u razdoblju od 1. siječnja 2000. do 31. prosinca 2009. godine. Uočili smo povezanost HPV infekcije s patohistološkim gradusom, sklonošću regionalnom metastaziranju, stadijem i recidivom bolesti te statusom i preživljenjem bolesnika, ali bez statističke značajnosti. Dokazana je statistički značajna povezanost stupnja izražajnosti EGFR-a ( $p < 0,001$ ) i patohistološkoga gradusa, stadija bolesti, sklonosti metastaziranju, povrata (recidiva) bolesti, statusa i preživljenja bolesnika. Kaplan-Meierova krivulja preživljenja za bolesnike s HPV pozitivnim karcinomima koja nije statistički značajna (*Log Rank test*,  $\chi^2 = 1,705$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0,192$ ), pokazala je bitno bolje preživljenje kod bolesnika koji su bili pozitivni na visokorizične sojeve HPV-a. Statistički značajna razlika preživljenja dokazana je između četiri skupine bolesnika koje imaju različit stupanj izražajnosti EGFR-a (*Log Rank test*;  $\chi^2 = 75,049$ ;  $df = 3$ ;  $p < 0,001$ ). Također je statistički značajna povezanost ( $\chi^2 = 9,490$ ;  $df = 3$ ;  $p = 0,023$ ) infekcije HPV-om i izražajnosti EGFR-a. U studiji nije dokazana statistički značajna povezanost kategorija bolesnika različitih odnosa izražajnosti HPV-a i EGFR-a sa stadijem bolesti, patohistološkim gradusom, sklonošću metastaziranju i preživljenjem, ali je u opisanim kategorijama dokazana statistička značajnost prema sklonosti recidivu bolesti ( $\chi^2 = 13,129$ ;  $df = 3$ ;  $p = 0,004$ ). Krivulja preživljenja navedenih kategorija bolesnika različitog odnosa izražajnosti HPV-a i EGFR-a pokazala je statistički značajnu razliku (*Log Rank test*,  $\chi^2 = 12,178$ ;  $df = 3$ ;  $p = 0,007$ ) preživljenja s izrazito slabijim preživljenjem u obje kategorije ispitanika kojima je dokazana pojačana izražajnost EGFR-a. Time se EGFR potvrđuje kao dominantna komponenta za određivanje prognoze, odnosno mogućeg preživljenja bolesnika s pločastim karcinomom grkljana.

## 8. SUMMARY

The aim of this study was to determine the presence of human papilloma virus (HPV) infection and expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and their possible association with clinical and histopathologic features of laryngeal squamous cell carcinoma. The impact of EGFR expression in patients with HPV - positive squamous cell larynx carcinoma on prognosis and survival, was also examined.

The study included 196 patients with squamous cell larynx carcinoma, treated in the Department for Ear, Nose and Throat and Head and Neck Surgery, University Hospital Split, Croatia in period from January 1, 2000. to December 31, 2009.

No statistical significance demonstrated correlation of HPV infection with histological grade, tendency for regional metastasis, recurrence of disease, stage, status and survival of patients.

However, statistically significant correlation was demonstrated between the level of EGFR expression ( $p < 0.001$ ) according to histopathological grade, stage of disease, tendency to metastasize, return (recurrence) of disease, status and survival of patients.

Kaplan-Meier survival curves for patients with HPV - positive cancers, which was not statistically significant (Log Rank test,  $\chi^2 = 1.705$ ;  $df = 1$ ;  $p = 0.192$ ) demonstrated significantly better survival in patients who were positive for high risk HPV strains. Statistically significant survival difference was demonstrated between the four groups of patients with different degree of EGFR expression (Log Rank test,  $\chi^2 = 75.049$ ;  $df = 3$ ;  $p < 0.001$ ).

Statistically significant association was also demonstrated between ( $\chi^2 = 9.490$ ;  $df = 3$ ;  $p = 0.023$ ) HPV infection and EGFR expression. No statistically significant correlation was found between different patient categories in relation to HPV and EGFR expression to the stage of disease, histological grade, tendency to metastasize and survival; within categories statistically significant tendency toward recurrence was found ( $\chi^2 = 13.129$ ;  $df = 3$ ;  $p = 0.004$ ).

Survival curves for categories with different expression of HPV and EGFR showed a statistically significant difference in survival (Log Rank test,  $\chi^2 = 12.178$ ;  $df = 3$ ;  $p = 0.007$ ), with markedly poor survival in both categories who demonstrated enhanced expression of EGFR. This confirms the EGFR as a dominant component for determining prognosis, and possible survival.

## 9. LITERATURA

1. Bumber Ž, Katić V, Nikšić-Ivančić M, Pegan B, Petric V, Šprem N. Otorinolaringologija. Zagreb: Ljevak; 2004.
2. Križan Z. Kompendij anatomije čovjeka II dio - Pregled građe glave, vrata i leđa. Zagreb: Školska knjiga; 1999.
3. Krajina Z. Otorinolaringologija i cervikofacijalna kirurgija: Školska knjiga; 1986.
4. Duančić V. Osnove embriologije čovjeka. Zagreb: Medicinska knjiga Beograd - Zagreb; 1983. 123-5 p.
5. Fredrickson J. Larynx / Hypopharinx, Trachea / Bronchus and Esophagus. In: Cummings C, editor. Otolaryngology Head & Neck Surgery. Third ed. St. Louis: Mosby; 1998. p. 1823-2241.
6. Padovan I. Otorinolaringologija 3 Kirurgija usne šupljine, ždrijela, grla i vrata. Zagreb: Školska knjiga; 1987.
7. Panje W, Herberhold C. Neck. In: Naumann H, editor. Head and Neck Surgery. New York: George Thieme Verlag; 1998. p. 145-69.
8. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Hrvatski nacionalni registar za rak. Incidencija raka u Hrvatskoj 2008: Bilten br. 33.
9. Wingo PA, Tong T, Bolden S. Cancer statistics, 1995. CA Cancer J Clin. 1995;45(1):8-30. Epub 1995/01/01.
10. Waterhouse JAH. Neoplasms of the larynx. In: Ferlito A, editor. Epidemiology. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1993.
11. Smith RV, Fried MP. Advanced Cancer of the larynx. In: Baily BJ, Johnson JT, Newlands SD, editors. Head & Neck Surgery – Otolaryngology 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 1757-77.

12. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. Classification of tumors. Pathology and genetics of Head and Neck Tumors. Lyon: IARC Press; 2005. 107-208 p.
13. Hardisson D. Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2003;260(9):502-8. Epub 2003/05/09.
14. Pavelić K. Molekularno-genetička osnova raka. Onkologija. In: Šamija M, editor. Onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2000. p. 19-26.
15. Fan CY. Genetic alterations in head and neck cancer: interactions among environmental carcinogens, cell cycle control, and host DNA repair. Curr Oncol Rep. 2001;3(1):66-71. Epub 2000/12/21.
16. Sourvinos G, Rizos E, Spandidos DA. p53 Codon 72 polymorphism is linked to the development and not the progression of benign and malignant laryngeal tumours. Oral Oncol. 2001;37(7):572-8. Epub 2001/09/21.
17. Papadimitrakopoulou VA. Carcinogenesis of head and neck cancer and the role of chemoprevention in its reversal. Curr Opin Oncol. 2000;12(3):240-5. Epub 2000/06/07.
18. Gleich LL, Salamone FN. Molecular genetics of head and neck cancer. Cancer Control. 2002;9(5):369-78. Epub 2002/11/01.
19. Du J, Chen GG, Vlantis AC, Chan PK, Tsang RK, van Hasselt CA. Resistance to apoptosis of HPV 16-infected laryngeal cancer cells is associated with decreased Bak and increased Bcl-2 expression. Cancer Lett. 2004;205(1):81-8. Epub 2004/03/24.
20. Hoffmann M, Gorogh T, Gottschlich S, Lohrey C, Rittgen W, Ambrosch P, et al. Human papillomaviruses in head and neck cancer: 8 year-survival-analysis of 73 patients. Cancer Lett. 2005;218(2):199-206. Epub 2005/01/27.
21. Fouret P, Dabit D, Sibony M, Alili D, Commo F, Saint-Guily JL, et al. Expression of p53 protein related to the presence of human papillomavirus infection in precancer lesions of the larynx. Am J Pathol. 1995;146(3):599-604. Epub 1995/03/01.

22. Rodrigo JP, Suarez C, Gonzalez MV, Lazo PS, Ramos S, Coto E, et al. Variability of genetic alterations in different sites of head and neck cancer. *Laryngoscope*. 2001;111(7):1297-301. Epub 2001/09/25.
23. Franceschi S, Munoz N, Bosch XF, Snijders PJ, Walboomers JM. Human papillomavirus and cancers of the upper aerodigestive tract: a review of epidemiological and experimental evidence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1996;5(7):567-75. Epub 1996/07/01.
24. Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol*. 2000;36(3):256-63. Epub 2000/05/04.
25. Jefferies S, Foulkes WD. Genetic mechanisms in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol*. 2001;37(2):115-26. Epub 2001/02/13.
26. Gasco M, Crook T. The p53 network in head and neck cancer. *Oral Oncol*. 2003;39(3):222-31. Epub 2003/03/06.
27. Fletcher C. *Diagnostic Histopathology of tumors*. London: Churchill Livingstone; 2000.
28. Shah JP, Patel SG. *Head and Neck Surgery and Oncology*. Edinburgh: Mosby; 2003. 173-394 p.
29. Tomek R. Klinička onkologija. In: Šamija M, editor. *Onkologija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2000. p. 61-5.
30. Greene F, Page D, Morrow M, Balch C, Haller D, Fritz A, et al. *Cancer Staging Manual*. 6 ed. New York: Springer; 2002.
31. Beahrs O, NMyers M. *Manual for staging of cancer*, American Joint Committee on Cancer. Philadelphia: JB Lippincot; 1983.

32. Michaels L, Hellquist H. Ear, Nose, Throat Histopathology. 2 ed. Berlin: Springer Verlag; 2001.
33. Bumber Ž, Katić V, Nikšić-Ivančić M, Pegan B, Petric V, Šprem N. otorinolaringologija: Ljevak; 2004. 272-5 p.
34. Šamića M. Onkologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2000.
35. Wittekind C, Green F, Hutter R. TNM Atlas. Berlin: Springer; 2004.
36. Christopoulos T, Papageorgakopoulou N, Ravazoula P, Mastronikolis N, Papadas T, Theocharis D, et al. Expression of metalloproteinases and their tissue inhibitors in squamous cell laryngeal carcinoma. *Oncology reports*. 2007;18(4):855-60.
37. Carey TE. Field cancerization: are multiple primary cancers monoclonal or polyclonal? *Ann Med*. 1996;28(3):183-8. Epub 1996/06/01.
38. Chung KY, Mukhopadhyay T, Kim J, Casson A, Ro JY, Goepfert H, et al. Discordant p53 gene mutations in primary head and neck cancers and corresponding second primary cancers of the upper aerodigestive tract. *Cancer Res*. 1993;53(7):1676-83. Epub 1993/04/01.
39. Rhys Evans PH, Montgomery PQ, Gullane PJ. Principles and Practice of Head and Neck Oncology. London: Martin Dunitz; 2003. 163-334 p.
40. Almadori G, Galli J, Cadoni G, Bussu F, Maurizi M. Human papillomavirus infection and cyclin D1 gene amplification in laryngeal squamous cell carcinoma: biologic function and clinical significance. *Head Neck*. 2002;24(6):597-604. Epub 2002/07/12.
41. Almadori G, Cadoni G, Galli J, Ferrandina G, Scambia G, Exarchakos G, et al. Epidermal growth factor receptor expression in primary laryngeal cancer: an independent prognostic factor of neck node relapse. *Int J Cancer*. 1999;84(2):188-91. Epub 1999/03/30.
42. Maurizi M, Almadori G, Ferrandina G, Distefano M, Romanini ME, Cadoni G, et al. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in laryngeal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 1996;74(8):1253-7. Epub 1996/10/01.

43. Das BR, Nagpal JK. Understanding the biology of oral cancer. *Med Sci Monit.* 2002;8(11):RA258-67. Epub 2002/11/22.
44. Grandis JR, Tweardy DJ. Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res.* 1993;53(15):3579-84. Epub 1993/08/01.
45. Demiral AN, Sarioglu S, Birlik B, Sen M, Kinay M. Prognostic significance of EGF receptor expression in early glottic cancer. *Auris Nasus Larynx.* 2004;31(4):417-24. Epub 2004/12/02.
46. Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, et al. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol.* 1991;113(1):173-85. Epub 1991/04/01.
47. Anwar K, Nakakuki K, Naiki H, Inuzuka M. ras gene mutations and HPV infection are common in human laryngeal carcinoma. *Int J Cancer.* 1993;53(1):22-8. Epub 1993/01/02.
48. Perez-Ayala M, Ruiz-Cabello F, Esteban F, Concha A, Redondo M, Oliva MR, et al. Presence of HPV 16 sequences in laryngeal carcinomas. *Int J Cancer.* 1990;46(1):8-11. Epub 1990/07/15.
49. Tsuchiya H, Tomita Y, Shirasawa H, Tanzawa H, Sato K, Simizu B. Detection of human papillomavirus in head and neck tumors with DNA hybridization and immunohistochemical analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1991;71(6):721-5. Epub 1991/06/01.
50. Watts SL, Brewer EE, Fry TL. Human papillomavirus DNA types in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1991;71(6):701-7. Epub 1991/06/01.

51. Poljak M. Prophylactic human papillomavirus vaccination and primary prevention of cervical cancer: issues and challenges. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18 Suppl 5:64-9. Epub 2012/08/07.
52. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology.* 2010;401(1):70-9. Epub 2010/03/09.
53. Syrjanen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol.* 2005;32 Suppl 1:S59-66. Epub 2005/03/09.
54. 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(2):467-75. Epub 2005/03/01.
55. Aaltonen LM, Rihkanen H, Vaheri A. Human papillomavirus in larynx. *Laryngoscope.* 2002;112(4):700-7. Epub 2002/08/02.
56. Szladek G, Juhasz A, Kardos G, Szoke K, Major T, Sziklai I, et al. High co-prevalence of genogroup 1 TT virus and human papillomavirus is associated with poor clinical outcome of laryngeal carcinoma. *J Clin Pathol.* 2005;58(4):402-5. Epub 2005/03/26.
57. Torrente MC, Ampuero S, Abud M, Ojeda JM. Molecular detection and typing of human papillomavirus in laryngeal carcinoma specimens. *Acta Otolaryngol.* 2005;125(8):888-93. Epub 2005/09/15.
58. Jacob SE, Sreevidya S, Chacko E, Pillai MR. Cellular manifestations of human papillomavirus infection in laryngeal tissues. *J Surg Oncol.* 2002;79(3):142-50. Epub 2002/03/01.
59. Venuti A, Manni V, Morello R, De Marco F, Marzetti F, Marcante ML. Physical state and expression of human papillomavirus in laryngeal carcinoma and surrounding normal mucosa. *J Med Virol.* 2000;60(4):396-402. Epub 2000/02/24.



60. Balaram P, Nalinakumari KR, Abraham E, Balan A, Hareendran NK, Bernard HU, et al. Human papillomaviruses in 91 oral cancers from Indian betel quid chewers--high prevalence and multiplicity of infections. *Int J Cancer*. 1995;61(4):450-4. Epub 1995/05/16.
61. Du J, Chen GG, Vlantis AC, Xu H, Tsang RK, van Hasselt AC. The nuclear localization of NFkappaB and p53 is positively correlated with HPV16 E7 level in laryngeal squamous cell carcinoma. *J Histochem Cytochem*. 2003;51(4):533-9. Epub 2003/03/19.
62. Syrjanen S, Puranen M. Human papillomavirus infections in children: the potential role of maternal transmission. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000;11(2):259-74. Epub 2002/05/11.
63. Almadori G, Cadoni G, Cattani P, Galli J, Bussu F, Ferrandina G, et al. Human papillomavirus infection and epidermal growth factor receptor expression in primary laryngeal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2001;7(12):3988-93. Epub 2001/12/26.
64. El-Mofty SK, Lu DW. Prevalence of human papillomavirus type 16 DNA in squamous cell carcinoma of the palatine tonsil, and not the oral cavity, in young patients: a distinct clinicopathologic and molecular disease entity. *Am J Surg Pathol*. 2003;27(11):1463-70. Epub 2003/10/25.
65. Cruz IB, Snijders PJ, Steenbergen RD, Meijer CJ, Snow GB, Walboomers JM, et al. Age-dependence of human papillomavirus DNA presence in oral squamous cell carcinomas. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1996;32B(1):55-62. Epub 1996/01/01.
66. Van Doornum GJ, Korse CM, Buning-Kager JC, Bonfrer JM, Horenblas S, Taal BG, et al. Reactivity to human papillomavirus type 16 L1 virus-like particles in sera from patients with genital cancer and patients with carcinomas at five different extragenital sites. *Br J Cancer*. 2003;88(7):1095-100. Epub 2003/04/03.
67. Pintos J, Franco EL, Black MJ, Bergeron J, Arella M. Human papillomavirus and prognoses of patients with cancers of the upper aerodigestive tract. *Cancer*. 1999;85(9):1903-9. Epub 1999/05/01.

68. Herrero R. Chapter 7: Human papillomavirus and cancer of the upper aerodigestive tract. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003(31):47-51. Epub 2003/06/17.
69. Lin KY, Westra WH, Kashima HK, Mounts P, Wu TC. Coinfection of HPV-11 and HPV-16 in a case of laryngeal squamous papillomas with severe dysplasia. *Laryngoscope.* 1997;107(7):942-7. Epub 1997/07/01.
70. Rimell FL, Shoemaker DL, Pou AM, Jordan JA, Post JC, Ehrlich GD. Pediatric respiratory papillomatosis: prognostic role of viral typing and cofactors. *Laryngoscope.* 1997;107(7):915-8. Epub 1997/07/01.
71. Gerein V, Rastorguev E, Gerein J, Jecker P, Pfister H. Use of interferon-alpha in recurrent respiratory papillomatosis: 20-year follow-up. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2005;114(6):463-71. Epub 2005/07/27.
72. Garcia-Millian R, Santos A, Perea SE, Gonzalez-Cabanas R, Valenzuela C, Arana M. Molecular analysis of resistance to interferon in patients with laryngeal papillomatosis. *Cytokines Cell Mol Ther.* 1999;5(2):79-85. Epub 1999/10/09.
73. Sirianni N, Wang J, Ferris RL. Antiviral activity of Cidofovir on a naturally human papillomavirus-16 infected squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) cell line improves radiation sensitivity. *Oral Oncol.* 2005;41(4):423-8. Epub 2005/03/29.
74. Tasca RA, McCormick M, Clarke RW. British Association of Paediatric Otorhinolaryngology members experience with recurrent respiratory papillomatosis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2006;70(7):1183-7. Epub 2006/01/18.
75. Azzimonti B, Hertel L, Aluffi P, Pia F, Monga G, Zocchi M, et al. Demonstration of multiple HPV types in laryngeal premalignant lesions using polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *J Med Virol.* 1999;59(1):110-6. Epub 1999/08/10.

76. Umudum H, Rezanko T, Dag F, Dogruluk T. Human papillomavirus genome detection by in situ hybridization in fine-needle aspirates of metastatic lesions from head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer*. 2005;105(3):171-7. Epub 2005/04/12.
77. Johnston D, Hall H, DiLorenzo TP, Steinberg BM. Elevation of the epidermal growth factor receptor and dependent signaling in human papillomavirus-infected laryngeal papillomas. *Cancer Res*. 1999;59(4):968-74. Epub 1999/02/24.
78. Pavelić K. Molekularno-genetička osnova raka. *Onkologija*. In: Šamija M, editor. *Onkologija*. Zagreb: Medicinska naklada.; 2000. p. 19-26; 48.
79. Ongkeko WM, Altuna X, Weisman RA, Wang-Rodriguez J. Expression of protein tyrosine kinases in head and neck squamous cell carcinomas. *Am J Clin Pathol*. 2005;124(1):71-6. Epub 2005/06/01.
80. Rucci L, Bocciolini C, Franchi A, Ferlito A, Casucci A. Epidermal growth factor receptor and p53 expression in T1-T2 glottic cancer involving the anterior or posterior commissure. *Acta Otolaryngol*. 2004;124(1):102-6. Epub 2004/02/24.
81. Koynova DK, Tsenova VS, Jankova RS, Gurov PB, Toncheva DI. Tissue microarray analysis of EGFR and HER2 oncogene copy number alterations in squamous cell carcinoma of the larynx. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2005;131(3):199-203. Epub 2004/12/14.
82. Pavelić K. Molekularno-genetička osnova raka. *Onkologija*. In: Šamija M, editor. Zagreb: Medicinska naklada; 2000. p. 26.
83. Rubin Grandis J, Melhem MF, Barnes EL, Tweardy DJ. Quantitative immunohistochemical analysis of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*. 1996;78(6):1284-92. Epub 1996/09/15.

84. Krecicki T, Jelen M, Zalesska-Krecicka M, Rak J, Szkudlarek T, Jelen-Krzeszewska J. Epidermal growth factor receptor (EGFR), proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 antigen in laryngeal epithelial lesions. *Oral Oncol.* 1999;35(2):180-6. Epub 1999/08/06.
85. Vlachtsis K, Nikolaou A, Markou K, Fountzilas G, Daniilidis I. Clinical and molecular prognostic factors in operable laryngeal cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2005;262(11):890-8. Epub 2005/03/02.
86. Pivot X, Magne N, Guardiola E, Poissonnet G, Dassonville O, Francoual M, et al. Prognostic impact of the epidermal growth factor receptor levels for patients with larynx and hypopharynx cancer. *Oral Oncol.* 2005;41(3):320-7. Epub 2005/03/04.
87. Kourelis K, Papadas T, Vandoros G, Goumas P, Sotiropoulou-Bonikou G. Glottic versus supraglottic tumors: differential molecular profile. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2008;265(1):79-84. Epub 2007/10/03.
88. Wu R, Abramson AL, Shikowitz MJ, Dannenberg AJ, Steinberg BM. Epidermal growth factor-induced cyclooxygenase-2 expression is mediated through phosphatidylinositol-3 kinase, not mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase, in recurrent respiratory papillomas. *Clin Cancer Res.* 2005;11(17):6155-61. Epub 2005/09/08.
89. Gale N, Kambic V, Poljak M, Cor A, Velkavrh D, Mlacak B. Chromosomes 7,17 polysomies and overexpression of epidermal growth factor receptor and p53 protein in epithelial hyperplastic laryngeal lesions. *Oncology.* 2000;58(2):117-25. Epub 2000/03/08.
90. Deeb G, Wang J, Ramnath N, Slocum HK, Wiseman S, Beck A, et al. Altered E-cadherin and epidermal growth factor receptor expressions are associated with patient survival in lung cancer: a study utilizing high-density tissue microarray and immunohistochemistry. *Mod Pathol.* 2004;17(4):430-9. Epub 2004/01/24.

91. Hambek M, Solbach C, Schnuerch HG, Roller M, Stegmüller M, Sterner-Kock A, et al. Tumor necrosis factor alpha sensitizes low epidermal growth factor receptor (EGFR)-expressing carcinomas for anti-EGFR therapy. *Cancer Res.* 2001;61(3):1045-9. Epub 2001/02/28.

## 10. ŽIVOTOPIS

Rođen sam u Bugojnu - BiH, 24. prosinca 1962. godine. U Imotskom sam završio osnovnu i srednju školu, a 1989. godine sam diplomirao na Medicinskom fakultetu u Sarajevu. Pripravnički liječnički staž za DZ Imotski sam obavio u KBC Split, a državni ispit položio sam 1991. u Zagrebu.

Do početka Domovinskog rata radio sam u hitnoj djelatnosti DZ Imotski, a od srpnja 1991. godine do studenog 1993. aktivno sudjelovao u Domovinskom ratu kao referent i načelnik saniteta 115. brigade Hrvatske vojske. Po završetku Domovinskog rata, do 1998. godine, radio sam u primarnoj zdravstvenoj zaštiti i hitnoj medicinskoj pomoći u Zagrebu i Ivanić Gradu. Godine 1998. započeo sam specijalizaciju iz Otorinolaringologije u Klinici za bolesti uha, grla i nosa i kirurgiju glave i vrata KBC Split. Specijalistički ispit položio sam 2003. u Zagrebu, te od tada radim kao specijalist otorinolaringolog u Klinici za bolesti uha, grla i nosa s kirurgijom glave i vrata KBC Split.

Kao predavač i moderator sudjelovao sam aktivno na brojnim domaćim i internacionalnim tečajevima i kongresima. Dva puta bio sam voditelj tečajeva trajnog usavršavanja, a u više navrata član organizacijskih odbora raznih stručnih skupova. Autor sam i koautor nekoliko znanstvenih i stručnih radova. U sklopu specijalističkog usavršavanja boravio sam u „*University Ear, Nose and Throat Hospital*“ u Grazu te u „*Memorial Sloan-Kettering Cancer Center*“ u New Yorku.

Tijekom specijalizacije, na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, završavam stručni poslijediplomski studij „Otorinolaringologija i maksilofacijalna kirurgija“. Nakon specijalizacije završavam poslijediplomski doktorski studij „Klinička medicina“ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu.