

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij

Molekularne bioznanosti

Ivana Škrinjar

**Procjena povezanosti razine interleukina 6 i čimbenika nekroze tumora alfa u serumu i  
slini s ishodom bolesti u osoba oboljelih od karcinoma usne šupljine**

Doktorska disertacija

Osijek, 2015.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni  
studij Molekularne bioznanosti

Znanstveno područje: Biomedicina i zdravstvo

Znanstveno polje: Temeljne medicinske znanosti- Imunologija

Doktorska disertacija

**Procjena povezanosti razine interleukina 6 i čimbenika nekroze tumora alfa u serumu i slini s ishodom bolesti u osoba oboljelih od karcinoma usne šupljine**

Ivana Škrinjar

**Disertacija je izrađena na:** Stomatološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkoj bolnici Dubrava, Zagreb

**Mentori:** doc.dr.sc. *Vlaho Brailo*

doc.dr.sc. *Aleksandar Milenović*

### **Kratki sažetak doktorske disertacije:**

Cilj istraživanja bio je utvrditi postoji li povezanost između razine interleukina 6 (IL-6) i čimbenika nekroze tumora alfa (TNF- $\alpha$ ) u serumu i slini bolesnika oboljelih od karcinoma usne šupljine s vremenom pojave recidiva bolesti, pojavom regionalnih i udaljenih metastaza i preživljenja bolesnika. Povišena razina IL-6 u serumu prije liječenja pokazala se značajnim čimbenikom rizika za recidiv bolesti. Stoga bi se otkrivanje takvih bolesnika moglo iskoristiti za bolje praćenje i ranije otkrivanje recidiva i metastaza bolesti što mi moglo pridonijeti smanjenju stope smrtnosti od karcinoma usne šupljine.

**Broj stranica: 101**

**Broj slika: 34**

**Broj tablica: 22**

**Broj literaturnih navoda: 220**

**Jezik izvornika: hrvatski**

**Ključne riječi: karcinom usne šupljine, interleukin 6, čimbenik nekroze tumora alfa**

**Datum obrane: 08. svibnja 2015.**

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. prof. dr. sc. Neven Žarković, znanstveni savjetnik Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, predsjednik
2. doc. dr. sc. Vlaho Brailo, docent Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, mentor 1 i član
3. doc. dr. sc. Aleksandar Milenović, spec. maksilofacijalne kirurgije, KBC Sestre Milosrdnice, mentor 2 i član
4. prof. dr. sc. Jasminka Pavelić, znanstvena savjetnica Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, član
5. prof. dr. sc. Vanja Vučićević Boras, izv. profesorica Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, član
6. doc. dr. sc. Dragana Gabrić Pandurić, docentica Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (zamjena)

**Disertacija je pohranjena u:** Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**  
**University of Dubrovnik**  
**Ruder Bošković Institute**  
**University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of**  
**Molecular biosciences**  
**Scientific Area:** Biomedicine and Health  
**Scientific Field:** Basic Medical Sciences - Immunology

**PhD thesis**

**Evaluation of interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha levels in serum and saliva  
with the outcome of the disease in patients with oral cancer**

Ivana Škrinjar

**Thesis performed at:** School of Dental Medicine University of Zagreb and Clinical Hospital  
Dubrava, Zagreb

**Supervisors:** Assist. Prof. *Vlaho Brailo*  
Assist. Prof. *Aleksandar Milenović*

**Short abstract:** The aim of the study was to investigate the relationship between interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) in serum and saliva of patients with oral cancer and tumor recurrence, the presence of regional and distant metastases and survival of patients. Elevated levels of IL-6 in serum before treatment has proved to be a significant risk factor for disease recurrence. Therefore, the detection of such patients could be used for better monitoring and early detection of recurrence and metastatic disease that could contribute to reducing mortality from oral cancer.

**Number of pages:** 101

**Number of figures:** 34

**Number of tables:** 22

**Number of references:** 220

**Original in:** croatian

**Key words:** interleukin-6, tumor necrosis factor alpha, oral cancer

**Date of the thesis defense:** May 8<sup>th</sup>, 2015

### **Reviewers:**

1. Assoc. Prof. Neven Žarković, Senior Scientist, Rudjer Boskovic Institute, commission president
2. Assist. Prof. Vlaho Brailo, School of Dental Medicine, University of Zagreb, supervisor 1 and member
3. Assist. Prof. Aleksandar Milenović, maxillofacial surgery specialist, University Clinical Hospital Sisters of Mercy, supervisor 2 and member
4. Prof. Jasminka Pavelić, Senior Scientist, Rudjer Boskovic Institute, member
5. Assoc. Prof. Vanja Vučićević Boras, School of Dental Medicine, University of Zagreb, member
6. Assist. Prof. Dragana Gabrić Pandurić, School of Dental Medicine, University of Zagreb, (substitute)

**Thesis deposited in:** National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

## *Zahvala*

*Hvala mojim mentorima doc.dr.sc. Vlaha Brailu i doc.dr.sc. Aleksandru Milenoviću što su mi svojim znanjem, nesebičnošću i pomoći omogućili izradu ovog rada.*

*Hvala prof.dr.sc. Vanji Vučićević Boras na korisnim savjetima tijekom izrade rada.*

*Hvala dr.sc. Danici Vidović Juras na pomoći tijekom skupljanja ispitanika.*

*Hvala studijskoj savjetnici prof.dr.sc. Jasminki Pavelić na pomoći i savjetima tijekom pisanja rada.*

*Hvala Kruni i Dominiku na podršci, strpljenju i vremenu oduzetom od zajedničkog druženja.*

*Hvala svima koji su na bilo koji način pridonijeli da se ovaj rad ostvari.*

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. KARCINOM USNE ŠUPLJINE .....	2
1.1.1 EPIDEMIOLOGIJA .....	2
1.1.2. ETIOLOGIJA .....	2
1.1.3. PATOGENEZA .....	4
1.1.3.1. LEUKOPLAKIJA.....	4
1.1.3.2. ERITROPLAKIJA.....	5
1.1.3.3. <i>LICHEN PLANUS</i> USNE ŠUPLJINE .....	6
1.1.4. KARCINOGENEZA .....	8
1.1.5. KLINIČKA SLIKA .....	11
1.1.6. KLASIFIKACIJA .....	12
1.1.7. LIJEČENJE.....	13
1.1.8. PROGNOZA.....	14
1.2. CITOKINI.....	17
1.2.1 INTERLEUKIN 6.....	18
1.2.2 ČIMBENIK NEKROZE TUMORA ALFA .....	19
1.3. ULOGA IMUNOSNOG SUSTAVA I UPALE U PROCESU KARCINOGENEZE...	20
<b>2. SVRHA RADA</b> .....	27
<b>3. ISPITANICI I POSTUPCI</b> .....	29
3.1. ISPITANICI.....	30
3.2. POSTUPCI .....	30
3.2.1. PRIKUPLJANJE UZORAKA .....	30
3.2.2. ODREĐIVANJE IL-6 I TNF- $\alpha$ KEMILUMINISCENTNIM ENZIMSKIM IMUNOTESTOM.....	31
3.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	32

<b>4. REZULTATI</b> .....	34
4.1. VRIJEDNOSTI CITOKINA U SERUMU I SLINI BOLESNIKA I KONTROLA .....	36
4.2. ODNOS KONTROLNIH VARIJABLI I RAZINE IL-6 I TNF- $\alpha$ U SERUMU I SLINI BOLESNIKA.....	37
4.3. ODNOS DOBI, SPOLA I PUŠENJA NA POJAVU LOKOREGIONALNOG RECIDIVA I UDALJENIH METASTAZA U BOLESNIKA .....	43
4.4. UNIVARIJATNA ANALIZA VREMENA BEZ RECIDIVA BOLESTI .....	44
4.5. MULTIVARIJATNA ANALIZA VREMENA BEZ RECIDIVA BOLESTI.....	51
4.6. UNIVARIJATNA ANALIZA VREMENA PREŽIVLJENJA BOLESNIKA .....	52
4.7. MULTIVARIJATNA ANALIZA VREMENA PREŽIVLJENJA BOLESNIKA.....	58
<b>5. RASPRAVA</b> .....	59
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	70
<b>7. LITERATURA</b> .....	72
<b>8. POPIS KORIŠTENIH KRATICA</b> .....	90
<b>9. SAŽETAK</b> .....	94
<b>10. SUMMARY</b> .....	96
<b>11. ŽIVOTOPIS</b> .....	98

## **1. UVOD**

## **1.1. KARCINOM USNE ŠUPLJINE**

Prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije karcinom usne šupljine (engl. *Oral Cancer* - OC) pripada skupini tumora glave i vrata koji nastaje na usnicama, jeziku, žlijezdama slinovnicama, zubnom mesu, dnu usne šupljine, orofarinksu, sluznici obraza i drugim mjestima unutar usne šupljine (1). U 90 % slučajeva radi se o planocelularnom karcinomu (2).

### **1.1.1. EPIDEMIOLOGIJA**

U odnosu na sve vrste karcinoma čovjeka OC se pojavljuje učestalošću od 3 % (3), i čini 30 % svih karcinoma glave i vrata (4). Bolest je znatno češća u muškaraca, a razvija se tijekom srednje i starije životne dobi. Prema podacima Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo od karcinoma usne šupljine i orofarinksa u 2011. godini oboljelo je 335 osoba, 264 muškaraca i 71 žena (5).

Unatoč poboljšanju kirurškog liječenja i liječenja zračenjem petogodišnje preživljenje bolesnika nije se znatno popravilo unazad nekoliko desetaka godina. U svijetu se ova vrsta neoplazme ubraja među deset s najnepovoljnijom prognozom. U oko 80 % zemalja ne postoje registri učestalosti pojavnosti OC. Procijenjeno je da je u 2008. godini u svijetu dijagnosticirano 400.000 novih slučajeva karcinoma usana, usne šupljine i ždrijela (izuzev nazofarinksa) (3). Učestalost OC raste s životnom dobi. Otprilike 95 % tumora nastaje u osoba starijih od 40 godina, a prosječna dob bolesnika u vrijeme postavljanja dijagnoze je 60 godina (6). U posljednjih 20 godina primijećen je porast učestalosti OC u osoba mlađih od 40 godina s 0,4 % na 4 %. Taj se porast posebno odnosi na žene, što je rezultiralo promjenom omjera muškaraca i žena oboljelih od karcinoma s 10:1 na 3:1 u populaciji mlađoj od 40 godina (7,8). OC se češće pojavljuje u crnaca nego u bijelaca pa je i mortalitet dvostruko veći u crnaca nego u bijelaca (9).

### **1.1.2. ETIOLOGIJA**

Duhan i alkohol su potvrđeni čimbenici rizika nastanka OC (10-12). Duhan i duhanski dim sadrže niz karcinogena kao što su nitrozamin (nikotin), policiklički aromatski ugljikovodici, nitrozodietanolamin, nitrozoprolin i polonij, odnosno ugljikov monoksid, tiocijanat, vodikov cijanid i metabolite navedenih sastojaka. Kombinirano djelovanje duhana i alkohola ima sinergistički učinak na razvoj OC (13,14). Mehanizmi ovog djelovanja uključuju dehidrirajuće učinke alkohola na sluznicu, povećanje propusnosti sluznice te učinke



karcinogena iz alkohola i duhana. Osobe koje koriste više od 100 g alkohola dnevno imaju 30 puta veći rizik obolijevanja od OC od onih koji konzumiraju manje od 15 g alkohola dnevno. Ako je uz teški alkoholizam prisutno i pušenje više od 20 cigareta dnevno, rizik za razvoj OC povećava se za više od 100 puta (7,15,16).

Ostali oblici duhana (duhan za žvakanje-betel i duhan za šmrkanje) povezani su s rizikom za razvoj OC u manjoj mjeri nego pušenje duhana. Za razliku od pušenja koje djeluje na cijelu usnu šupljinu, šmrkanje izaziva promjene samo na mjestu primjene (6).

Korištenje otopina za ispiranje usta koje sadrže alkohol ne povezuje se s rizikom nastanka karcinoma (17).

Uloga humanog papiloma virusa (HPV) u nastanku OC nije posve razjašnjena. Uloga visokorizičnih tipova HPV-a u patogenezi ove bolesti prvi je put prepoznata 1983. godine. Od onda su objavljena brojna istraživanja koju upućuju na tu povezanost, tako da je *International Agency for Research on Cancer* (dio Svjetske zdravstvene organizacije) 2009. godine prepoznala HPV 16 kao čimbenik rizika za nastanak orofaringealnog planocelularnog karcinoma (18,19). Nadalje, prisutnost HPV-a češća je za 2 do 3 puta u prekanceroznim lezijama te za 4 do 5 puta u zloćudnim lezijama usne šupljine nego u zdravoj sluznici (20).

Predviđa se da će HPV pozitivni planocelularni karcinomi usne šupljine premašiti broj karcinoma vrata maternice u SAD u sljedećih 15 do 20 godina (21). HPV pozitivni karcinomi su biološki različiti u odnosu na karcinome povezane s pušenjem duhana i alkoholom. Bolesnici s uznapredovalim oblikom orofaringealnog karcinoma imaju bolju prognozu ako su karcinomi HPV pozitivni te se raspravlja o specifičnom liječenju takvih slučajeva (22-25).

Istraživanjem hrvatske populacije nije nađena statistički značajna razlika u prisutnosti HPV 16 u brisevima između bolesnika s OC i zdravih ispitanika (26).

U oko 15 % bolesnika s OC nije utvrđen poznati čimbenik rizika, a bolest može biti izrazito agresivnog tijeka (27). U literaturi se kao uzrok navodi infekcija virusima (HPV i Epstein-Barr virusom) (28), gljivicom *Candida albicans* (29) i određenim bakterijama (30). Postoji nekoliko studija koje su pokazale povezanost između određenih vrsta bakterija i karcinoma (31,32). U nedavnom istraživanju (27) pokazano je da se u tkivu OC, ali ne i u zdravom tkivu, nalaze bakterije *Exiguobacterium oxidotolerans*, *Prevotella melaninogenica*, *Staphylococcus aureus*, *Veillonella parvula* i *Micrococcus*. Većina ovih mikroorganizama je saharolitična i otporna na kiselost što potvrđuje činjenicu da je mikrookolina tumora hipoksična s niskom pH vrijednošću.

Mehanizam povezanosti između bakterija i OC još uvijek nije razjašnjen te uloga bakterija ostaje nejasna. Iako postoji nekoliko tipova bakterija koje mogu potaknuti nenormalni rast stanica sprečavanjem imunskog odgovora domaćina ili potiskivanjem apoptoze (33) ostaje nejasno je li bakterije sekundarno koloniziraju tumor ili imaju aktivnu ulogu u karcinogenezi.

### **1.1.3. PATOGENEZA**

Razvoj planocelularnog karcinoma sluznice usne šupljine započinje pretvorbom normalnih stanica epitela u displastične koje s vremenom prelaze u stanice karcinoma. Prekancerodne displastične lezije su morfološki promijenjeno tkivo u kojem je veća vjerojatnost za nastanak karcinoma, a u usnoj šupljini su to leukoplakija, eritroplakija i *lihen planus* (34). Displastične lezije se dijele na osnovi histomorfoloških kriterija na blage, umjerene ili teške, a stupanj displazije je *zlatni standard* predviđanja zloćudnog potencijala prekancerodnih lezija.

#### **1.1.3.1. LEUKOPLAKIJA**

Leukoplakija se klinički očituje kao bijela mrlja na sluznici usne šupljine čija se klinička ili histopatološka obilježja ne mogu pripisati niti jednoj drugoj bolesti (35). Najvažniji prepoznati čimbenici rizika za nastanak leukoplakije su uporaba duhana i alkohola. Postoje dva klinička tipa leukoplakije: homogena (slika 1) i nehomogena (slika 2). Nehomogena leukoplakija ima oko sedam puta veću sklonost zloćudnoj preobrazbi od homogene leukoplakije (35,36). Prevalencija leukoplakije iznosi 2,6 % (37) dok postotak zloćudne preobrazbe leukoplakije varira između 0,13-17,5 %, ovisno o istraživanjima (38,39). Čimbenici rizika povećane učestalosti zloćudne preobrazbe su: ženski spol, pojava leukoplakije u nepušača, nehomogeni tip leukoplakije, smještaj leukoplakije na jeziku i/ili dnu usne šupljine, infekcija *Candidom albicans* i prisutnost displazije epitela (38,40).



Slika 1. Homogena leukoplakija na postraničnom rubu jezika (preuzeto iz arhiva Zavoda za oralnu medicinu Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu)



Slika 2. Nehomogena leukoplakija na ventralnoj strani jezika (preuzeto iz arhiva Zavoda za oralnu medicinu Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu)

### 1.1.3.2. ERITROPLAKIJA

Eritroplakija je svijetlocrveni baršunasti plak ili mrlja na sluznici koja se klinički ili patološki ne može pripisati niti jednom drugom patološkom stanju (6). Histopatološkom analizom pokazano je da su većina eritroplakija, 80-90 %, ako ne i sve, epitelna displazija, *carcinoma in situ* ili invazivni karcinom, često bez znakova dobroćudne keratoze (41). Slika 3 prikazuje eritroplakiju u području mekog nepca i nepčanih lukova.



Slika 3. Eritroplakija u području mekog nepca i nepčanih lukova (preuzeto iz arhiva Zavoda za oralnu medicinu Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu)

### **1.1.3.3. LIHEN PLANUS USNE ŠUPLJINE**

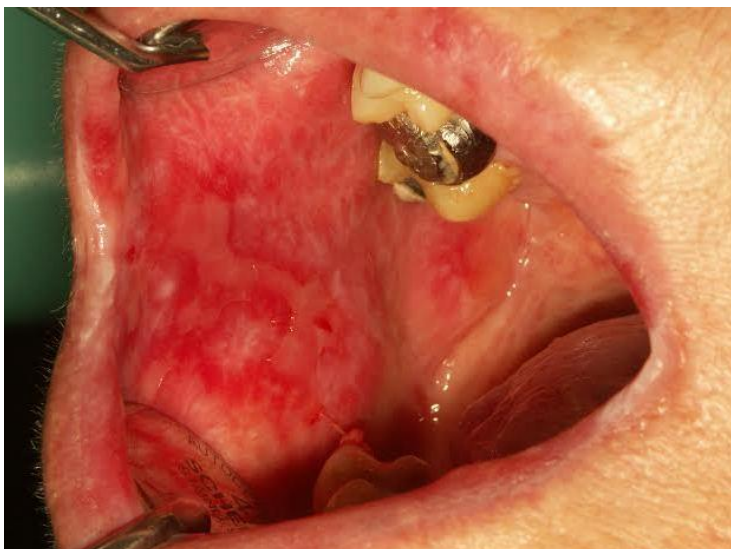
To je kronična autoimuna bolest još nepotpuno razjašnjene etiologije u kojoj citotoksični limfociti T (CD8) pokreću apoptozu stanica epitela (42). Klinički se očituje pojavom bijelih hiperkeratotičnih lezija sa ili bez upalne podloge i ulceracijama sluznice usta. Dijeli se na retikularni, plakozni, papularni, erozivni, ulcerativni i bulozni. Može zahvatiti i kožu te sluznice spolnih organa, ždrijela, analnu te rjeđe spojnicu oka i jednjak. Liječenje aktivnih oblika bolesti uključuje lokalnu ili sustavnu primjenu kortikosteroida te antiseptike i antimikotike radi sprječavanja sekundarne infekcije. Zloćudni potencijal *lichen planusa* usne šupljine je još uvijek upitan; postotak zloćudne preobrazbe iznosi od 0-5,3 % (39,43). Iako se svi tipovi lihena mogu pretvoriti u karcinom, atrofični i erozivni oblici imaju najveću mogućnost zloćudne preobrazbe. Veća mogućnost preobrazbe u OC izglednija je u starijih osoba s erozivnim oblikom koji uz to puše duhan (44). Slike 4-6 prikazuju različite vrste *lichen planusa* usne šupljine.



Slika 4. Retikularni *lichen planus* na sluznici obraza (preuzeto iz arhiva Zavoda za oralnu medicinu Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu)



Slika 5. Plakozni *lichen planus* na postraničnoj strani jezika (preuzeto iz arhiva Zavoda za oralnu medicinu Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu)



Slika 6. Erozivni *lichen planus* na sluznici obraza (preuzeto iz arhiva Zavoda za oralnu medicinu Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu)

Potrebne su šire multicentrične studije s naglaskom na inkluzijske i ekskluzijske kriterije kao što su klinička slika i histološki nalaz te čimbenici rizika za nastanak OC, kako bi se sa sigurnošću mogao utvrditi zloćudni potencijal ove lezije (45).

#### **1.1.4. KARCINOGENEZA**

Karcinogeneza je proces pretvaranja normalnih stanica u zloćudne. Obilježena je raznim događajima na razini pojedine stanice koje dovode do nekontroliranog dijeljenja i nastanka tumorske mase.

Tri su stadija karcinogeneze: inicijacija, promocija i progresija. Inicijacija nastaje kao posljedica mutacije DNA. U ovom stadiju inicirana stanica može ostati latentna tjednima, mjesecima ili godinama ili pak postati autonomna. Proces inicijacije omogućava simetrično dijeljenje stanice tako da nastaju dvije inicirane stanice (46). Inicijacija je brz i ireverzibilan proces.

Stadij promocije obilježava klonalna ekspanzija iniciranih stanica zbog amitogenog procesa uzrokovanog povećanim brojem novih stanica i sprječavanjem apoptoze, što dovodi do preživljenja iniciranih stanica (47), a zbiva se uslijed djelovanja karcinogenog čimbenika (promotora). Promotor ne djeluje izravno na DNA i potiče biološke učinke bez metaboličke aktivnosti (48). Također povećava proliferaciju stanica i uzrokuje promjene u kontroli staničnog rasta (49). Promotor mora biti prisutan tjednima, mjesecima i godinama da bi bio

učinkovit i njegov učinak ovisi o koncentraciji u ciljnom tkivu (50). Promocija je reverzibilni stadij; nakon nestanka promotora može se pojaviti regresija proliferacije stanica, najvjerojatnije pomoću apoptoze. Neki promotori su specifični za određeno tkivo dok drugi djeluju na različite vrste tkiva (51). Nisu sve stanice izložene promotoru uključene u stadij promocije. Samo one stanice potaknute na dijeljenje, koje su nediferencirane i preživjele su apoptozu dovode do nastanka zloćudnih tumora (47).

Posljednji stadij karcinogeneze je progresija, kada se tumor očituje u punom obliku sa svim biološkim osobitostima. U ovom stadiju, proliferacija stanica je neovisna o prisutnosti stimulirajućeg čimbenika (52). Stadij progresije je ireverzibilan, a obilježen je genetskom nestabilnošću, ubrzanom rastom stanica, invazijom, metastazama i promjenama u biokemijskim, metaboličkim i morfološkim obilježjima stanica (51). Za progresiju tumora ključna je angiogeneza. Stečeni angiogenetski fenotip prethodi razvoju obilježja koja pridonose zloćudnom potencijalu te njegova inhibicija odgađa razvoj neoplazme (53).

Primarni uzrok nastanka karcinoma je oštećenje DNA koje može nastati uslijed djelovanja endogenih i egzogenih čimbenika. Dnevno se pojavljuje više od 60.000 oštećenja DNA po jednoj stanici kao posljedica endogenih procesa u samoj stanici. Od unutarnjih čimbenika uključenih u karcinogenezu spominju se oštećenja imunskog sustava i upala uzrokovana nepoznatim čimbenicima, genetski kod, dob i hormonalna ravnoteža (51). S druge strane, oštećenja DNA nastaju i kao posljedica djelovanja vanjskih čimbenika. Jedan od najpoznatijih karcinogenih čimbenika, duhanski dim, uzrokuje povećani broj oštećenja DNA i dovodi do povećanog rizika za nastanak karcinoma pluća (54) i OC. Od ostalih vanjskih karcinogenih čimbenika potvrđeni su UV zračenje u nastanku melanoma (55), infekcija s *H.pylori* u nastanku karcinoma želuca (56) te aflatoksin u nastanku karcinoma jetre (57). Ukoliko je popravak DNA nedostatan dolazi do nakupljanja oštećenja DNA i povećanog rizika za nastanak karcinoma.

Unazad više od desetak godina različite studije su ukazale na važnost mikroRNA (miRNA) u biologiji nastanka karcinoma. Nekoliko je istraživanja koja su pokazala da ekspresija miRNA može pružiti odgovarajuće informacije o porijeklu tumora, prognozi i predviđanju rizika za nastanak, čak bolje nego ekspresija ostalih vrsta RNA kao što je npr. mRNA (58,59). U tumorima, brojni čimbenici transkripcije reguliraju transkripciju miRNA. Nedavni dokazi upućuju da onkogeni čimbenik transkripcije *myc* djeluje kao regulator transkripcije miRNA, potičući tako transkripciju onkogene miRNA te inhibiciju transkripcije tumor supresorske

miRNA (60,61). Otkrivene su različite uloge podvrsta metilirane miRNA. Npr., miR-193 je uključena u kontrolu diferencijacije i rasta stanica u akutnoj mijeloidnoj leukemiji (62); miR-199a kontrolira ekspresiju gena povezanih sa širenjem tumora želuca, jajnika i testisa (63); miR-335 je povezana s metastazama karcinoma dojke (64); miR-200 obitelj je potisnuta u karcinomu debelog crijeva i dojke čime se potiče epitelijalno-mezenhimalna tranzicija (65).

### **Molekularne promjene u nastanku karcinoma usne šupljine**

Na molekularnoj razini, u proces karcinogeneze uključene su brojne onkogene mutacije i mutacije supresorskih gena. Da bi se normalne stanice preobrazile u zloćudne potreban je niz mutacija različitih gena (66). Onkogene mutacije pogađaju gene *ras*, *myc*, *erb-B*, *bcl-1*, *bcl-2*, *int-2*, *CK8*, *CK19* i gen za ciklin-D1 (67). Supresorski geni uključeni u razvitak OC su *p53*, *Rb* i *p16INK4A*. Ostali potencijalni promotori karcinogeneze su geni *FHIT*, *APC*, *DOC1*, *VHL* i *TGF- $\beta$ R-II* (68-70). Kromosomi na kojima se nalaze spomenuti geni podložni su mutacijama koje se često očituju i kao gubitak heterozigotnosti (engl. *Loss of Heterozigosity* - LOH). Dok su ranija istraživanja bila usredotočena na LOH u planocelularnom karcinomu, danas se prisutnost ove promjene gena istražuje u prekanceroznim lezijama (71,72). LOH na kromosomima 3p i/ili 9p mogao bi biti preduvjet zloćudne preobrazbe prekanceroznih lezija usne šupljine. Neinvazivni genetički probir za LOH u odljuštenim stanicama ima ograničenu vrijednost za praćenje bolesnika s leukoplakijom. Međutim, LOH na 9p zajedno s mutiranim genom *p53* u uzorcima leukoplakije usne šupljine dobivenim biopsijom povezani su sa zloćudnom preobrazbom i biljeg su određivanja rizika zloćudne preobrazbe (71). Važnu ulogu u patogenezi OC vjerojatno imaju i čimbenici transkripcije kao što su, npr., članovi obitelji NF- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B1, NF- $\kappa$ B2, RELA, cREL i RELB). U fiziološkim uvjetima aktiviraju se prilikom ozljeda. U stanicama karcinoma su pretjerano aktivni te tako sudjeluju u patogenezi i otpornosti tumora na liječenje (73). Aktivacija NF- $\kappa$ B povezana je s progresijom OC i smanjenim preživljenjem oboljelih (74).

U novije vrijeme istražuje se utjecaj slobodnih radikala i reaktivnih kisikovih spojeva (engl. *Reactive Oxygen Species* - ROS) u brojnim patofiziološkim procesima uključujući i karcinogenezu. Ovi spojevi uzrokuju oštećenje DNA i staničnih lipida i proteina što može potaknuti karcinogenezu. Glavnu ulogu u procesu karcinogeneze ima narušavanje ravnoteže između oksidansa i antioksidansa (75). Povišena razina ROS-a ili reaktivnih dušikovih spojeva (engl. *Reactive Nitrogen Species* - RNS) zajedno sa smanjenjem antioksidansa



pronađena je u različitim karcinomima, uključujući OC (76-78). Oksidativni stres je uključen u sva tri stadija karcinogeneze. ROS mogu stimulirati klonalnu ekspanziju mutiranih stanica modulacijom gena koji su povezani s proliferacijom i smrću stanice (79). Također reguliraju aktivnost određenih čimbenika transkripcije kao što su NF- $\kappa$ B, Nrf2 (engl. *Nuclear Factor (erythroid-derived 2)-like 2*), HIP i p53 koji kontroliraju stanični rast i onkogenezu (79,80). Nedavno je otkriveno kako povećana ekspresija čimbenika transkripcije Twist u uzorcima karcinoma glave i vrata i drugih tumora korelira s pojavom metastaza i lošijom prognozom oboljelih (81-85). U stanicama tumora Twist djeluje kao onkogen, a njegova povišena ekspresija potiče progresiju tumora i pojavu metastaza (86).

#### **1.1.5. KLINIČKA SLIKA**

OC se najčešće pojavljuje na dnu usne šupljine i rubovima jezika. U europskoj i američkoj populaciji u 40 do 50 % bolesnika zahvaća jezik. U azijskoj populaciji se najčešće pojavljuje na sluznici obraza kao posljedica žvakanja betela (87). U početnom stadiju tumor je najčešće asimptomatski; simptomi se pojavljuju tek u uznapredovalom stadiju bolesti. Najčešći simptomi su nelagoda u ustima, otežano gutanje, bol kod gutanja, otežan govor, pomičnost zuba ili pojava jednog ili više čvorova na vratu. U otprilike 50 % bolesnika bolest je prilikom postavljanja dijagnoze u uznapredovalom stadiju (7). U početnom stadiju karcinom se očituje kao eritroplakična lezija. U kasnijim stadijima dolazi do razvoja ulkusa, a može se pojaviti i egzofitična masa koja proliferira u usnu šupljinu. Slike 7 i 8 prikazuju OC na različitim mjestima usne šupljine.



Slika 7. Planocelularni karcinom dna usne šupljine (preuzeto iz arhiva Zavoda za oralnu medicinu Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu)



Slika 8. Planocelularni karcinom na sluznici obraza (preuzeto iz arhiva Zavoda za oralnu medicinu Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu)

### **1.1.6. KLASIFIKACIJA**

U klasifikaciji OC najviše se upotrebljava TNM klasifikacija (88) koja za kriterije uzima veličinu tumora (T), prisutnost regionalnih metastaza u limfnim čvorovima (N) i prisutnost udaljenih metastaza (M).

T - veličina tumora:

T1s: karcinom *in situ*

T1: tumor < 2 cm

T2: tumor >2 cm i < 4 cm

T3: tumor > 4 cm

T4: tumor > 4 cm s infiltracijom okolnih struktura (kosti, mišića, sinusa i kože).

N - prisutnost regionalnih metastaza u vratnim limfnim čvorovima

N0: bez metastaza u vratnim limfnim čvorovima

N1: solitarni ipsilateralni čvor < 3cm

N2a: solitarni ipsilateralni čvor >3 cm i < 6 cm

N2b: multipli ipsilateralni čvorovi > 3 cm i < 6 cm

N2c: bilateralni i kontralateralni čvorovi < 6 cm

N3a: ipsilateralni čvor > 6 cm

N3b: kontralateralni čvor > 6 cm

M - prisutnost udaljenih metastaza

M0: nema udaljenih metastaza

M1: prisutna udaljena metastaza

Temeljem navedenih kriterija određuje se stadij OC:

Stadij 1: T1 N0 M0

Stadij 2: T2 N0 M0

Stadij 3: T1/T2/T3 N1 M0

T3 N0 M0

Stadij 4: T4 N0 M0

bilo koji T N2/N3 M0

bilo koji T bilo koji N M1

### **1.1.7. LIJEČENJE**

Liječenje bolesnika s OC uključuje kirurški zahvat i/ili zračenje te kemoterapiju. Odabir liječenja ovisi o stadiju bolesti. Stadiji 1 i 2 liječe se uglavnom kirurški dok se stadiji 3 i 4 liječe kombinacijom kirurškog zahvata i zračenja (6,7).

Kirurški zahvat primjenjuje se kada je tumorom zahvaćena kost, u slučaju kada su očekivane popratne pojave kirurškog zahvata blaže od popratnih pojava zračenja, kod tumora koji nisu osjetljivi na zračenje te u slučaju recidivirajućih tumora u područje koje je primilo maksimalnu dozu zračenja. Uz tumor se odstranjuju i limfni čvorovi u vratu. Glavni razlog neuspjeha kirurškog zahvata su recidivi tumora. Posljedice kirurškog zahvata su narušena funkcija i estetika što ima znakovit utjecaj na kvalitetu života bolesnika. Često se zbog toga primjenjuje rekonstruktivna kirurgija pomoću režnjeva kako bi se poboljšale funkcije jedenja, žvakanja i govora bolesnika.

Liječenje zračenjem provodi se kurativno, u kombinaciji s kirurškim zahvatom i/ili kemoterapijom, ili palijativno. Palijativno zračenje provodi se u bolesnika u kojih se ne može provesti kurativno zračenje, a cilj je olakšati simptome boli, krvarenja, ulceracija i začepljenje dišnih puteva. Terapijska doza zračenja iznosi između 50 i 70 Gy, a primjenjuje se najčešće u dnevnim dozama od 2 Gy. S obzirom na to da zračenje osim na stanice tumora djeluje i na okolno tkivo, pojavljuju se brojne popratne pojave. Akutne (mukozitis, gubitak okusa i suhoća usta koja može trajati doživotno) nastaju tijekom zračenja i traju do nekoliko tjedana nakon zračenja. Kronične popratne pojave nastaju nekoliko mjeseci ili godina nakon zračenja a uključuju radijacijski karijes, trizmus i osteoradionekrozu (89).

Kemoterapija se primjenjuje u uznapredovalim oblicima bolesti u cilju smanjenja simptoma i produljenja života. Može se koristiti i za prevenciju recidiva tumora nakon kirurškog zahvata i zračenja. Najčešće se upotrebljavaju bleomicin, 5-fluorouracil i cisplatin (90). Primjenjuju se i lijekovi kao što su erlotinib i cetuksimab koji blokiraju receptore za epidermalni čimbenik rasta (*engl.* Epidermal Growth Factor - EGF) (91,92). Erlotinib nije pokazao štetne učinke u kombinaciji s cisplatinom i zračenjem, ali nije niti pomogao u produljenju života niti vremena bez recidiva bolesti oboljelih od OC (93).

U Kini je odobren genski lijek Gendicine, rekombinatni adenovirus koji sadrži zdravi, nemutirani, oblik gena p53. Pokazano je da intratumorske injekcije Gendicina u kombinaciji sa zračenjem poboljšavaju učinke samog zračenja (94).

### **1.1.8. PROGNOZA**

Stadij tumora u trenutku postavljanja dijagnoze važan je prognostički čimbenik. Petogodišnje preživljenje iznosi 80 % (s karcinomima stadija 1 i 2) i oko 30 % (s karcinomima stadija 3 i 4), a ovisi o prisutnosti regionalnih i udaljenih metastaza (7). Preživljenje bolesnika ovisi o

stadiju i smještaju tumora te broju i smještaju pozitivnih limfnih čvorova i njihovom ekstrakapsularnom širenju (95). Smatra se da bolesnici s tumorima u prednjem dijelu usne šupljine imaju bolju prognozu i bolje petogodišnje preživljenje od bolesnika s tumorima smještenim u stražnjem dijelu usne šupljine (4). To se objašnjava povezanošću smještaja tumora i metastaziranjem u limfne čvorove (96). Najvjerojatnije se radi o različitoj limfnoj drenaži pojedinih dijelova usne šupljine i nemogućnosti potpunog odstranjenja tkiva tumora tijekom kirurškog zahvata. Limfna drenaža stražnjih dijelova jezika je obostrana dok je drenaža prednjih dijelova jezika jednostrana. Općenito se limfa iz prednjih dijelova usne šupljine drenira u gornje vratne limfne čvorove dok iz stražnjih dijelova ide u donje vratne limfne čvorove. Zahvaćenost donjih vratnih limfnih čvorova povezana je s lošijom prognozom bolesti (97). Najlošija prognoza je u bolesnika kojima su zahvaćeni obostrani limfni čvorovi. Zahvaćenost limfnih čvorova samo na strani tumora ukazuje na najbolju prognozu. Učestalost okultnih metastaza u limfnim čvorovima kod tumora u ranijim stadijima (T1 i T2) varira između 27 i 40 % (98). Širenje tumora izvan čahure važan je predskazatelj regionalnog recidiva i udaljenih metastaza, a posljedično tome i preživljenja bolesnika.

Rizik za metastaziranje tumora u limfne čvorove nije povezan samo s veličinom tumora već i s njegovom histološkom građom (99). Histološka građa tumora povezana je i sa smanjenim preživljenjem bolesnika sa stadijem tumora 1 ili 2 te predstavlja nezavisni čimbenik preživljenja bolesnika u odnosu na veličinu tumora i prisutnost regionalnih ili udaljenih metastaza tumora (100).

Volumen tumora povezan je s metastaziranjem u limfne čvorove i odražava njegovu agresivnost (101). Kod planocelularnog karcinoma jezika debljine 5 mm znatno se povećava mogućnost metastaziranja u vratne limfne čvorove (102) dok za tumore debljine 2 mm koji se nalaze na dnu usne šupljine treba razmotriti provođenje elektivne disekcije vrata (103). Za tumore sluznice obraza debljine 6 mm i više pretpostavlja se da imaju lošu prognozu (104).

S obzirom na to da nije ustanovljena jasna povezanost između veličine tumora i njegove histološke građe, samo stupnjevanje tumora TNM klasifikacijom nije dovoljno za određivanje prognoze. To se posebno odnosi na OC s različitim histološkim osobinama u različitim dijelovima tumora. Tako dio tumora nazvan invazivni front (engl. *Invasive Tumor Front* - ITF) pokazuje niži stupanj diferencijacije i viši stupanj raslojavanja stanica u odnosu na ostatak tumora (105). ITF je termin koji opisuje prirodu invazije tumora na granici s tkivom domaćina. Način invazije može biti određen korištenjem sljedećih kriterija: stadij 1 ima jasno

određene granice, stadij 2 pokazuje invaziju na određenom dijelu, dok stadij 3 pokazuje invaziju na više mjesta. Stadij 4 pokazuje raslojavanje u više dijelova koji pokazuju invaziju, a ponekad su prisutne i izolirane stanice koje prodiru u okolno tkivo. Stadiji 3 i 4 su najčešće povezani s metastazama u limfnim čvorovima i naknadnim metastazama (97).

Perineuralna i endoneuralna invazija tumora povezana je s veličinom tumora, histološkim nalazom, ITF-om i zahvaćenošću limfnih čvorova. Perineuralna invazija znatno utječe na prognozu i preživljenje oboljelih (4) jer infiltracija ovojnice živaca dovodi stanice tumora do baze lubanje. Kod tumora koji zahvaćaju živce češće su regionalne i udaljene metastaze (97). Udaljene metastaze pojavljuju se u 5-25 % bolesnika, prvenstveno u onih s lošom lokoregionalnom kontrolom, a najčešće su zahvaćena pluća (106). Udaljene metastaze najčešće se pojavljuju unutar dvije godine kod tumora koji pokazuju N2 ili N3 stadij prema TNM klasifikaciji. Širenje tumora izvan čahure limfnog čvora predstavlja važan predskazatelj koji značajno povećava rizik za razvoj udaljenih metastaza.

I recidiv je važan prognostički čimbenik bolesnika s OC. Definira se kao ponovni nalaz bolesti unutar 5 godina od postavljanja prve dijagnoze. Tumor koji se nađe nakon tog razdoblja smatra se novim primarnim karcinomom. U bolesnika s recidivom petogodišnje preživljenje iznosi oko 30 %, za razliku od bolesnika bez recidiva u kojih je preživljenje 92 % (107). Recidiv karcinoma usne šupljine pojavljuje se u 32,7 % do 44,9 % bolesnika s prosječnim vremenom recidiva od 14 mjeseci (90,108). Univarijatnom analizom pokazano je da su čimbenici rizika recidiva veličina tumora, stupanj diferencijacije, zahvaćenost limfnih čvorova, postavljanje režnja, reseksijski rubovi i zahvaćenost limfnih i krvnih žila. Multivarijatna analiza je pokazala da su veličina i stupanj diferencijacije tumora te zahvaćenost limfnih čvorova nezavisni čimbenici rizika za recidiv. Razlike u dobi, spolu, smještaju tumora i zahvaćenih limfnih čvorova te perineuralna invazija nisu znakovit čimbenik recidiva tumora. Dvogodišnje i petogodišnje preživljenje niže je u skupini bolesnika s recidivom. Postoperativni recidiv tumora znači lošu prognozu tijekom bolesti i smanjenu kvalitetu života bolesnika (109). Za bolesnike kod kojih je vjerojatnije da će imati recidiv tumora preporučuje se široka lokalna ekscizija, postavljanje režnja, radikalna disekcija vrata i adjuvantna kemoterapija (90).

Postoje i dva proteinska biljega, keratin 4 i kornulin, čiji se gubitak ekspresije na rubovima tumora povezuje s lokalnim recidivom, bez obzira na odsustvo displazije u uzorku (110).

U linijama stanica karcinoma glave i vrata, u tkivu tumora i u serumu bolesnika s karcinomom glave i vrata otkrivene su povišene vrijednosti niza citokina i čimbenika rasta koji uključuju interleukin 1 (IL-1), interleukin 6 (IL-6), interleukin 8 (IL-8), onkogen 1 povezan s rastom (engl. *Growth-Related Oncogene-1* - GRO-1), čimbenik stimulacije granulocita i makrofaga, vaskularni endotelni čimbenik rasta (VEGF) i čimbenik rasta hepatocita (HGF) (111-118).

Uloga IL-6 u karcinomima glave i vrata pokazana je u nizu dosadašnjih istraživanja (115,119,120). Koncentracija IL-6 u serumu povezana je sa stadijem i progresijom tumora (121), a koncentracija IL-6 u slini korelira s ranim lokoregionalnim recidivom OC (122).

S obzirom na činjenicu da je recidiv bolesti povezan s niskim preživljenjem bolesnika, rano otkrivanje relapsa tumora molekularnim biljezima moglo bi koristiti u otkrivanju malih i lakše izlječivih recidiva tumora (119).

## 1.2. CITOKINI

Citokini su velika i raznolika skupina proteina male molekulske mase koje u malim količinama sintetizira većina stanica tijela. Ipak, većinu citokina izlučuju makrofagi i pomoćnički limfociti T (Th). Djeluju kao posrednici i regulatori imunskih i brojnih drugih fizioloških procesa organizma. Djeluju lokalno (autokrino ili parakrino) te na udaljena tkiva (endokrino). S obzirom na funkciju i podrijetlo dijele se u limfokine (izlučuju ih aktivirani limfociti), interleukine (izlučuju ih leukociti - djeluju na druge leukocite), interferone, kemokine (djeluju kemotaktički) i čimbenike rasta. S obzirom na način djelovanja tijekom imunokompetentne reakcije dijele se u proupalne i protivupalne citokine, iako poneki od njih, u pojedinim slučajevima, mogu djelovati i na jedan i na drugi način (npr. leukemija inhibitorni čimbenik, interferon  $\alpha$ , IL-6 i transformirajući čimbenik rasta  $\beta$  (TGF)- $\beta$ ). Neki od glavnih proupalnih citokina su: IL-1 $\beta$ , IL-6 i čimbenik nekroze tumora alfa (TNF- $\alpha$ ). Uglavnom ih luče aktivirani makrofagi, a uključeni su u pojačavanje upalne reakcije. Protivupalni citokini, kao što su antagonist receptora za IL-1, interleukin 4 (IL-4), interleukin 10 (IL-10), interleukin 11 (IL-11) i interleukin 13 (IL-13), kontroliraju jačinu aktivnosti proupalnih

citokina, odnosno jačinu imunosno/upalne reakcije. Učinak na stanice ostvaruju vezivanjem na specifične receptore (123).

Usprkos brojnih spoznaja o povezanosti između stanica tumora i imunosnog sustava domaćina neka su temeljna pitanja još uvijek nerazjašnjena. Npr., zašto stanice imunosnog sustava učinkovito uklanjaju stanice tumora *in vitro*, ali ne i u *in vivo* uvjetima. Stoga je opravdano istraživanje promjena raznih stanica imunosnog sustava u bolesnika oboljelih od zloćudnih bolesti. Proupalni citokini, interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6 i TNF- $\alpha$  imaju ključnu ulogu u regulaciji staničnog i humoralnog imunosnog odgovora na tumor (124).

### 1.2.1. INTERLEUKIN 6

Luče ga brojne stanice, npr., aktivirani limfociti T i B, monociti, endotelne i epitelne stanice, fibroblasti, ali i stanice nekih tumora. Uključen je u brojne fiziološke i patološke procese, uključujući odgovor na infekciju i ozljedu te razvoj neoplazmi. IL-6 potiče lučenje aktivacijskog proteina 2 (AP2), čimbenika transkripcije koji ima vrlo važnu ulogu u regulaciji staničnog ciklusa i koji aktivira onkogene *Ras* i *c-erbB2*. Osim toga, inaktivira tumor supresorski gen *p53* podržavanjem statusa metiliranosti njegove promotorske regije što uzrokuje potiskivanje apoptoze i nekontrolirani rast stanica (125).

IL-6 djeluje sinergistički s TNF- $\alpha$  u stimulaciji limfocita T, poticanju odgovora proteina akutne faze u stanicama jetre i centra za termoregulaciju u hipotalamusu, poticanju umnažanja limfocita B, njihove diferencijacije i proizvodnje imunoglobulina, poticanju hematopoeze i trombopoeze (126). Nadalje, IL-6 djeluje kao čimbenik rasta za brojne stanice kao što su prekursorske hematopoetske stanice, keratinociti, neuroni, osteoklasti i stanice endotela (127). IL-6 ne potiče proizvodnju niti jednog drugog citokina i ima relativno mali izravni učinak na stanice imunosnog sustava u fiziološkim koncentracijama, što sugerira da je njegova glavna imunološka funkcija pojačavanje učinaka ostalih citokina (126).

Receptor za IL-6 (IL-6R ili CD126) sastoji se od 2 glikoproteinska lanca  $\alpha$  i  $\beta$ . Alfa lanac ima molekulsku težinu 80 kD, nema citoplazmatsku domenu i veže se na  $\beta$  lanac molekulske težine 130 kD koji prenosi signal u citoplazmu (128).



IL-6 potiče upalni i autoimunski odgovor u brojnim bolestima kao što su šećerna bolest, ateroskleroza, depresija, Alzheimerova bolest, sustavni eritematozni lupus, multipli mijelom, Behçetova bolest i reumatoidni artritis (129).

IL-6 je identificiran u serumu oboljelih od različitih zloćudnih tumora uključujući i OC. Povezanost između IL-6 i stadija bolesti pronađena je u bolesnika s karcinomima želuca i planocelularnim karcinomom jednjaka te u bolesnika s uznapredovalim metastatskim karcinomom (130-132).

Način kojim IL-6 iz seruma odražava status zloćudne bolesti je nepoznat. Jedna od mogućnosti je da povišena vrijednost IL-6 u serumu koji potječe od stanica tumora odražava njegovu proliferativnu aktivnost. Stoga bi mogao poslužiti u otkrivanju uznapredovalih metastaza (115).

U oboljelih od karcinoma glave i vrata promijenjena je aktivnost monocita stimuliranih endotoksinom u *in vitro* uvjetima. Očituje se pojačanim lučenjem IL-6 i smanjenim lučenjem monocitnog kemotaktičnog peptida 1 (MCP-1) koji su, vezano uz preživljenje bolesnika, negativni prognostički čimbenici (133). U bolesnika s OC povišena je i razina IL-6 u slini (134,135).

### **1.2.2. ČIMBENIK NEKROZE TUMORA ALFA**

TNF- $\alpha$  je proupalni citokin; dio je superobitelji TNF kojoj pripada 19 liganada i 29 receptora. Gen za TNF- $\alpha$  nalazi se u čovjeka na kromosomu 6. TNF- $\alpha$  luče aktivirani makrofagi, mastociti i limfociti T. On potiče hemoragičnu nekrozu i smrt stanica tumora, pojačava izražavanje molekula tkivne podudarnosti (MHC-II), autokrinu aktivaciju makrofaga, inhibira lipoproteinske lipaze i mijelopoezu te uzrokuje kaheksiju. TNF- $\alpha$  uzrokuje aktivaciju endotelnih stanica uključujući pojačanu ekspresiju površinskih receptora (npr. leukocitnih adhezijskih molekula) i gubitak međustanične adhezije što uzrokuje ekstravazaciju i migraciju leukocita u tkivo. TNF- $\alpha$  je moćan induktor apoptoze. U visokim koncentracijama uzrokuje kolaps krvnih žila i hemoragijsku nekrozu tumora dok u niskim koncentracijama stimulira angiogenezu i sudjeluje u lokalnom rastu tumora. TNF- $\alpha$  prenosi signal preko dvije vrste receptora, TNF-R1 (55 kDa) i TNF-R2 (75 kDa), koji daljnjim unutarstaničnim prijenosom

signala aktiviraju izvršne proteine ili transkripcijske čimbenike. Ovi receptori pripadaju grupi TNF-receptora koje za prijenos signala do ciljnih stanica koriste i citotoksični limfociti T.

Ostali članovi grupe TNF-receptora uključuju Fas (CD95), CD30 i CD40 koji su uključeni u diferencijaciju limfocita. Većina CD8+ stanica i prirodnih stanica ubojica (NK stanice) imaju vezikule koje sadrže TNF- $\alpha$  i limfotoksin koji se oslobađaju u dodiru s ciljnom stanicom. Receptori Fas i TNF-R1 imaju unutarцитoplazmatsku domenu (engl. *Death Domain* - DD domena) koja je važna za pokretanje apoptoze. Suprotno tome receptor TNF-R2 nema unutarцитoplazmatsku domenu te te ne može pokrenuti apoptozu (136). Receptor TNF-R1 nalazi se na gotovo svim stanicama tijela, a receptor TNF-R2 ograničen je na stanice imunskog i živčanog sustava te endotelne stanice.

TNF- $\alpha$  može djelovati i kao endogeni promotor tumora aktivacijom čimbenika transkripcije NF- $\kappa$ B (137). I same stanice različitih vrsta tumora izlučuju TNF- $\alpha$  (138) koji je nužan za njihovo preživljenje, dakle djeluje onkogeno. Ostali članovi superobitelji TNF djeluju uglavnom protutumorski. TNF- $\alpha$  ima ulogu u patogenezi kardiovaskularnih, neuroloških, autoimunih i plućnih bolesti te osteoporozi (137). Odobreno je nekoliko monoklonskih protutijela protiv TNF- $\alpha$ ; golimumab za liječenje reumatoidnog i psorijatičnog artritisa (139), certalizumab za liječenje reumatoidnog artritisa i Crohnove bolesti (140) i denosumab za liječenje osteoporoze.

Na posredan način, djelovanjem na ROS, TNF- $\alpha$  može uzrokovati oštećenje DNA i zloćudnu preobrazbu stanica koja je inače suprimirana antioksidansima. Ovaj se učinak može usporediti s učinkom ionizirajućeg zračenja (141).

Pokazano je da je u oboljelih od OC koncentracija TNF- $\alpha$  u slini značajno viša nego u zdravih ispitanika i osoba s premalignim lezijama sluznice usta (134).

### **1.3. ULOGA IMUNOSNOG SUSTAVA I UPALE U PROCESU KARCINOGENEZE**

#### **Mikrookolina tumora u karcinomu usne šupljine**

Mikrookolina OC sastoji se od fibroblasta povezanih s karcinomom (engl. *Cancer-associated Fibroblasts* - CAFs), stanica imunskog sustava i ostalih stanica. Fibroblasti su obilno prisutni u vezivnom tkivu sluznice i glavni su element odgovoran za lučenje proteina bazalne membrane. Oni luče strukturane proteine kao što su kolagen tipa IV i laminin te proizvode brojne citokine i druge molekule koje djeluju parakrino. CAFs su fenotipski izmijenjeni

fibroblasti koji aktivno sudjeluju u procesu karcinogeneze potičući rast stanica tumora i nastanak metastaza i jedan su od ključnih staničnih elemenata mikrookoline tumora (142). Stvaraju niz kontraktilnih proteina čime poprimaju „aktivni“ fenotip, odnosno postaju miofibroblasti. U OC CAFs vrlo često imaju „aktivni“ tip fenotipa te su povezani s odlaganjem gustog kolagena i dezmozoplazijom vezivnog tkiva (143). Pokazano je da je miofibroblastni tip fenotipa povezan s lošom prognozom oboljelih od OC (144). CAFs proizvode niz čimbenika ključnih za karcinogenezu, potičući pokretljivost stanica aktiviranjem citokina kao što su HGF i TGF- $\beta$  (145). Također CAF izravno pridonose preoblikovanju izvanstaničnog matriksa lučenjem metaloproteinaze matriksa (146).

Makrofazi povezani s tumorom (engl. *Tumor-associated Macrophages* - TAM) su u različitim vrstama tumora prisutni u različitim koncentracijama, a česti su u OC. Dijele se u proupalne (M1) i supresivne (M2). Istraživanja različitih vrsta tumora su pokazala da TAM mogu biti povezani bilo s pozitivnom ili negativnom prognozom bolesti. M1 TAM pridonose protutumorskom imunosnom odgovoru stvaranjem proupalnih citokina, interleukina 12 (IL-12), interleukina 23 (IL-23) i  $\gamma$ -interferona (147,148). Za razliku od toga, M2 TAM se nakupljaju u blizini krvnih žila te potiču angiogenezu (149) i luče supresivne citokine kao što su IL-10, IL-23 i TGF- $\beta$ . Također uzrokuju remodeliranje tkiva i sprečavaju protutumorski citotoksični učinak M1 TAM (147). Podaci za OC pokazuju da prevladavaju većinom M2 TAM te da visoka razina TAM korelira s višim stadijem tumora, pojavom metastaza u limfnim čvorovima i širenjem tumora izvan kapsule limfnog čvora (150,151). TAM proizvode ROS, RNS i prostaglandine koji pridonose upali i tumorigenezi, a u karcinomu glave i vrata također stvaraju značajne količine čimbenika inhibicije migracije makrofaga (MIF-1) koji stimulira neutrofile (152). Neutrofili djeluju na tumor na različite načine: potiču genetsku nestabilnost putem ROS, povećavaju angiogenezu putem VEGF i povećavaju invaziju tumora putem HGF (153).

Kronična upala u mikrookolini OC pridonosi širenju tumora putem različitih mehanizama uključujući stvaranje ROS i angiogenih čimbenika (152).

Ciklooksigenaza katalizira stvaranje prostaglandina i najvjerojatnije je ograničavajući čimbenik u njihovoj sintezi. Ciklooksigenaza-2 (COX2) je pretjerano aktivna u upalnim i paraneoplastičnim lezijama. Prostaglandini su također povišeni u OC a prostaglandin E<sub>2</sub> potiče invaziju i angiogenezu i sprječava apoptozu stanica karcinoma (152). Razina COX2 se

pokazala kao prognostički čimbenik, a selektivni COX2 inhibitori su pokazali povećani učinak terapije zračenjem u *in vitro* uvjetima (154,155).

Limfociti T su ključni za odgovor domaćina na tumor pa stoga imaju važnu ulogu i u OC. Nekoliko je dokaza koji upućuju na prisutnost disfunkcionalnih cirkulirajućih limfocita T i limfocita T koji infiltriraju tumorsku masu u karcinomu glave i vrata. Ova saznanja pokazuju da tumori mogu suprimirati lokalni i sustavni imunosni odgovor (147,156,157). Povrh toga, metastatski limfni čvorovi OC pokazuju značajno snižene razine limfocita CD8<sup>+</sup> (158). Poremećaj funkcije tumor infiltrirajućih limfocita T uključuju odsutnost ili nisku ekspresiju ključnih molekula signalnih receptora, smanjenu proliferaciju kao odgovor na mitogene, nemogućnost ubijanja stanica tumora, neravnotežu u lučenju citokina i sklonost apoptozi (147).

### **Imunosni sustav i karcinogeneza**

Imunosni sustav može prepoznati promijenjene stanice stečenom ili prirođenom imunosti. Mikrookolina tumora sadrži makrofage, neutrofile, mastocite, NK-stanice i limfocite T i B te upućuje na postojanje imunosne reakcije povezane s tumorom (159). Iako je nerazjašnjeno povećava li upalna reakcija rizik za nastanak tumora ili genske promjene potiču upalu i neoplastične promjene, utvrđeno je da stanice tumora aktivno interferiraju s imunosnim sustavom bolesnika (160).

Citokini su uključeni u sve imunosne reakcije. Njihova međudjelovanja uključuju međuovisne pozitivne i negativne povratne mehanizme koji održavaju homeostazu i imunološku kontrolu (123).

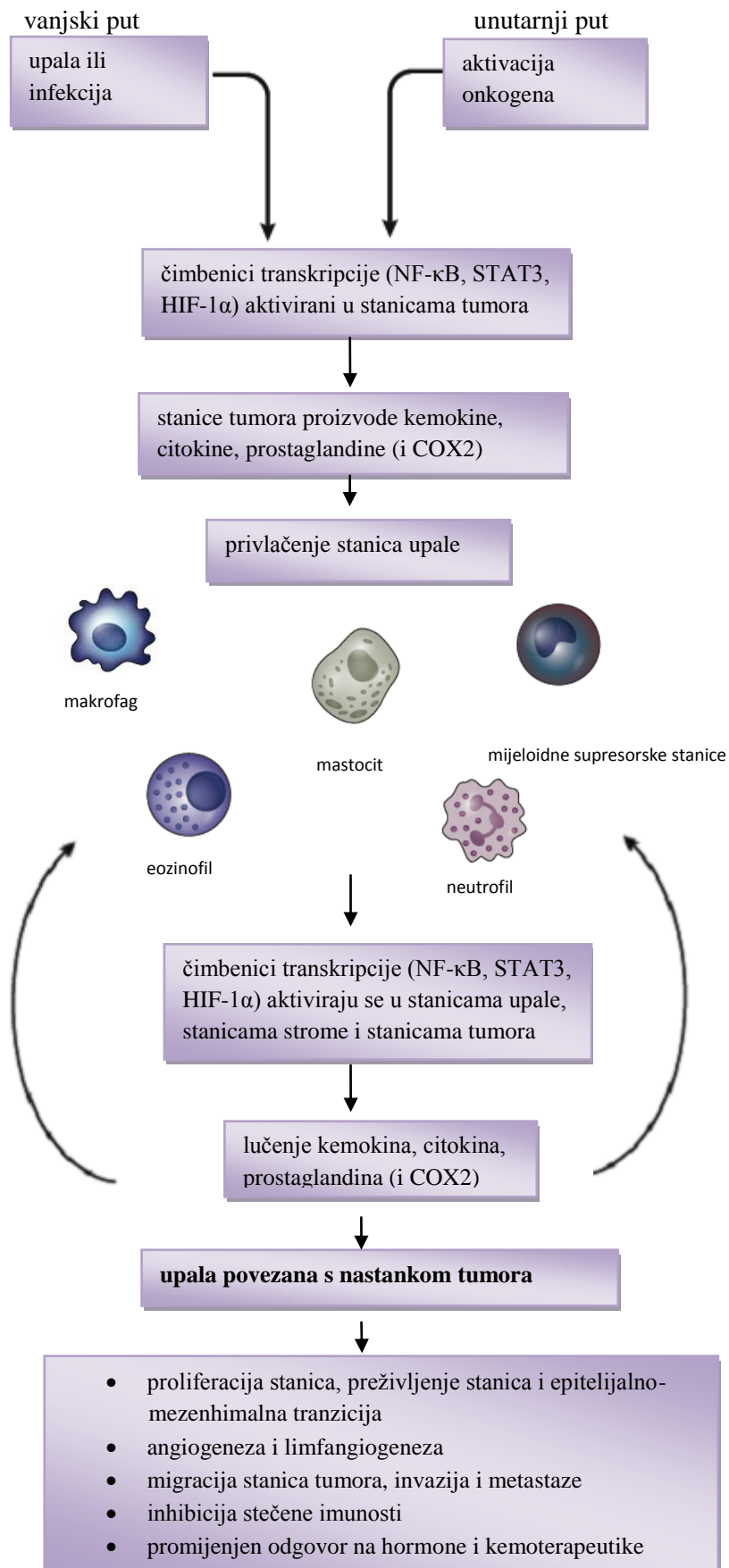
Prepoznavanje stanica tumora odvija se na dva načina (161). U prvom stanice prirođene imunosti izravno prepoznaju stanice tumora. NK-stanice također nadgledaju gubitak molekula klase MHC-I s površine stanica tumora što se uobičajeno događa tijekom karcinogeneze (162). U drugom stanice stečene imunosti koriste neizravan put, tzv. *cross-priming*, za prepoznavanje stanica tumora. Stanice tumora ne izražavaju važne ko-stimulatorne molekule kao što su članovi obitelji B7, koji su nužni za odgovor limfocita T (163). Dendritične stanice koje su fagocitirale stanice tumora prezentiraju antigen pomoću MHC-sustava, migriraju u regionalne limfne čvorove te stimuliraju tumor specifične limfocite (164).

Ova saznanja pokazuju da se u kontroli tumora koriste mehanizmi i prirođene i stečene imunosti. Međutim, razvoj klinički vidljivih tumora pokazuje da ove reakcije nisu uvijek

dovoljne da spriječe napredovanje bolesti jer stanice tumora uspijevaju izbjeći djelovanje imunskog sustava. Mehanizam kojim stanice tumora to uspijevaju nije do kraja razjašnjen, ali vjerojatno uključuje neučinkovit *cross-priming*, regulatorne puteve koji podržavaju imunološku toleranciju, imunosupresivne čimbenike koji potiču od samog tumora te gensku nestabilnost tumora (165).

Citokini se oslobađaju kao odgovor na stanični stres, uključujući karcinogenima uzrokovanu ozljedu, infekciju i upalu. U ovim stanjima citokini djeluju poticanjem odgovora domaćina koji je usmjeren na kontroliranje staničnog stresa i minimiziranje oštećenja. Dok učinkovito rješavanje ozljede potiče obnovu tkiva, nemogućnost popravka ozljede može uzrokovati trajno oslobađanje citokina i pogoršanje oštećenja tkiva. Kao takav, odgovor domaćina na stanični stres može utjecati na različite stadije nastanka i progresije tumora (161).

Upalni proces povezan je s različitim stadijima karcinogeneze (138). Epidemiološke studije su pokazale da kronična upala predisponira različite tipove tumora. Procijenjeno je da su infekcija i upalna reakcija povezane sa 15-20 % smrti od zloćudnih tumora diljem svijeta (166). Obilježja upale povezane s tumorom uključuju prisutnost upalnih stanica i medijatora (kemokina, citokina, prostaglandina) u tkivu tumora, remodeliranje tkiva i angiogenezu, slično kao u kroničnom upalnom odgovoru. Još jedan dokaz koji govori u prilog povezanosti upale i tumora je da nesteroidni protuupalni lijekovi smanjuju rizik nastanka određenih vrsta tumora kao što su karcinom debelog crijeva i karcinom dojke te smanjuju smrtnost od tih tipova tumora (160). Povezanost upale i karcinogeneze zbiva se na dva načina: unutarnjim i vanjskim putem (slika 9).



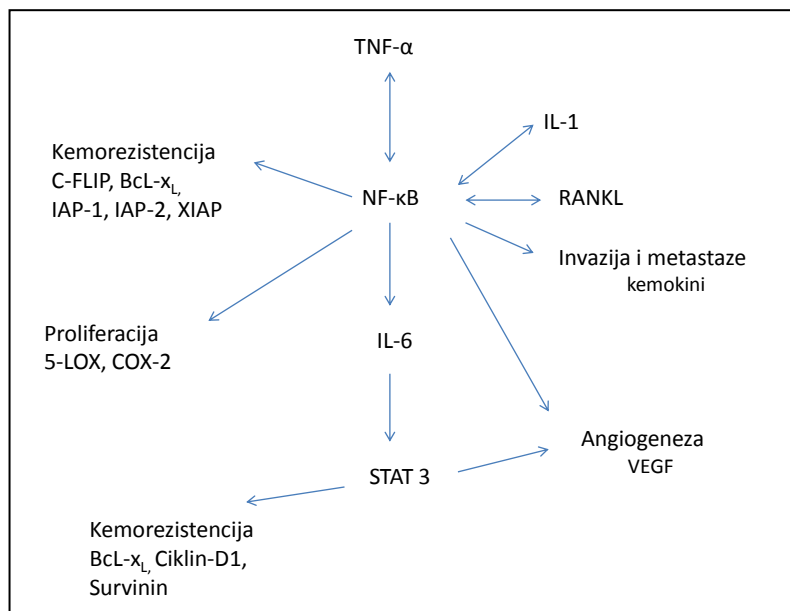
Slika 9. Prikaz vanjskog i unutarnjeg puta koji povezuju upalu i nastanak tumora (preuzeto iz literarnog navoda broj 160)

Unutarnji put aktiviran je genskim promjenama koje uzrokuju neoplaziju. Ovi događaji uključuju mutacije raznih onkogeni, amplifikaciju gena/kromosoma i inaktivaciju supresorskih gena. Ovako izmijenjene stanice luče medijatore upale te na taj način generiraju upalnu mikrookolinu tumora koja inače ne nastaje u primarno upaljenom tkivu. Suprotno, u vanjskom putu upalna stanja ili infekcija povećavaju rizik za nastanak tumora na određenim anatomskim područjima. Ova se dva puta spajaju rezultirajući aktivacijom čimbenika transkripcije, prvenstveno NF- $\kappa$ B, STAT3 i hipoksijom inducirano $\alpha$  čimbenika 1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) u stanicama tumora. Ovi čimbenici transkripcije koordiniraju lučenje medijatora upale, uključujući citokine i kemokine kao i stvaranje COX2 što rezultira sintezom prostaglandina. Ovi čimbenici aktiviraju leukocite, prvenstveno mijelomonocitne loze, tako da se u okolini tumora pojavljuju TAM. TAM su jedan od glavnih izvora upalnih citokina u mikrookolini tumora (148). Citokini aktiviraju iste čimbenike transkripcije u upalnim stanicama, stromalnim stanicama i stanicama tumora, što rezultira još većom sintezom medijatora upale i poticanjem upalne mikrookoline tumora (160).

Primarni upalni citokini uključeni u karcinogenezu su IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-23 i TNF- $\alpha$  (167). TNF- $\alpha$  stimulira aktivaciju neutrofila i monocita na mjestu upale. Aktivira i endotelne stanice krvnih žila koje izražavaju adhezijske molekule za neutrofile, monocite i limfocite (168). Stanice tumora luče male količine TNF- $\alpha$  uzrokujući hiperpermeabilnost krvnih žila (169). Osim stanica tumora, ostale stanice koje luče TNF- $\alpha$  pronađene su u mikrookolini tumora. Makrofazi i stanice CD4+ luče TNF- $\alpha$  i potiču upalnu reakciju (170,171). Povrh toga, lučenje TNF- $\alpha$  povezano je s povećanim oslobađanjem kemokina (CCL2, CXCL8, CXCL12), IL-6, VEGF i MIF-1.

IL-6 je ključni protuapoptični citokin koji stimulira rast i jedan je od izvršnih citokina koje aktivira NF- $\kappa$ B u promociji tumora. Uključen je u aktivaciju neutrofila te potiče migraciju i proliferaciju limfocita T (172). U eksperimentalnim uvjetima IL-6 i TNF- $\alpha$  kostimuliraju CD8 stanice što rezultira snažnom citolitičkom aktivnošću (173). U upalnoj reakciji, IL-6 ima ulogu u povezivanju prirodene i stečene imunosti (174).

Na slici 10 prikazana je shema aktivacije NF- $\kappa$ B putem TNF- $\alpha$ . Vidljivo je da NF- $\kappa$ B sudjeluje u raznim stadijima rasta tumora, uključujući proliferaciju, angiogenezu, invaziju i metastaziranje te je odgovoran za kemorezistenciju stanica tumora.



Slika 10. Shema aktivacije NF- $\kappa$ B (preuzeto iz literaturnog navoda broj 138)

S obzirom na to da IL-6 i TNF- $\alpha$  sudjeluju u procesu karcinogeneze, definiranje njihove uloge u prognozi oboljelih od OC može predstavljati važan klinički parametar vjerojatnosti recidiva tumora i preživljenja bolesnika. Mogućnost rutinske analize ovih citokina mogla bi biti od pomoći u individualiziranom pristupu praćenja svakog bolesnika s OC.



## **2. SVRHA RADA**

Svrha ovog istraživanja bila je utvrditi:

1. postoji li povezanost između vrijednosti IL-6 i TNF- $\alpha$  u serumu i slini osoba oboljelih od karcinoma usne šupljine i recidiva tumora (lokoregionalnog recidiva ili udaljenih metastaza).
2. postoji li povezanost između vrijednosti IL-6 i TNF- $\alpha$  u serumu i slini osoba oboljelih od karcinoma usne šupljine i preživljenja bolesnika.

Hipoteza istraživanja je da bolesnici oboljeli od karcinoma usne šupljine s povišenim vrijednostima IL-6 i TNF- $\alpha$  u serumu i slini prije liječenja imaju veću šansu za raniju pojavu lokalnog recidiva, regionalnih i/ili udaljenih metastaza te kraće preživljenje u odnosu na bolesnike s nižim vrijednostima navedenih citokina.

### **3. ISPITANICI I POSTUPCI**

### **3.1. ISPITANICI**

Istraživanje je provedeno na 36 bolesnika (u daljnjem tekstu bolesnici) (30 muškaraca i 6 žena, starosti od 37 do 78 godina, srednja vrijednost 59+/- 10 godina) koji su u periodu od 23. studenog 2006. do 31. siječnja 2008. godine zaprimljeni u Kliniku za kirurgiju lica, čeljusti i usta Kliničke bolnice Dubrava, Zagreb. U svih je po prvi puta dijagnosticiran, i histološki potvrđen, planocelularni karcinom usne šupljine. Niti jedan bolesnik nije bolovao od, osnovnoj bolesti pridružene, autoimune bolesti. Stadij tumora određen je prema TNM klasifikaciji (60- *American Joint Committee on Cancer* 1992), a parodontni status prema *Community Periodontal Index of Treatment Needs* (CPITN) (175). Zabilježeni su i podaci o pušenju, smještaju tumora i pridruženim komorbiditetima - povišenom krvnom tlaku, šećernoj bolesti i gastritisu. Podaci o bolesnicima čuvani su u kartonima bolesnika te u elektroničkoj bazi podataka Klinike za kirurgiju lica, čeljusti i usta Kliničke bolnice Dubrava. Kontrolnu skupinu činio je 31 ispitanik (u daljnjem tekstu kontrola) (12 žena i 19 muškaraca, od 50 do 78 godina starosti, srednja vrijednost 58+/- 5 godina) koji su bili dobrovoljni darivatelji krvi u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu s urednim kliničkim nalazom usne šupljine. U svih je ispitanika (bolesnika i kontrole) određena razina citokina IL-6 i TNF- $\alpha$  u slini i serumu.

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Stomatološkog fakulteta u Zagrebu i Etičko povjerenstvo KB Dubrava u sklopu projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa (MZOŠ) „Salivarni markeri oralnih bolesti i njihova primjena“, broj 065-0650445-0485.

Svi ispitanici su upoznati s detaljima istraživanja u kojem su svojevrijem sudjelovali te su potpisali informirani pristanak. U bilo kojoj fazi istraživanja svaki je ispitanik mogao prekinuti sudjelovanje bez posljedica na daljnji postupak liječenja.

### **3.2. POSTUPCI**

#### **3.2.1. PRIKUPLJANJE UZORAKA**

U skupini bolesnika uzorci krvi i sline prikupljeni su prije bilo kakvog liječenja i najmanje 14 dana nakon biopsije.

U svih su ispitanika uzorci sline prikupljeni između 8 i 10 sati ujutro. Ispitanici su tijekom 5 minuta izbacivali nestimuliranu sakupljenu slinu u građiranu epruvetu (176). Uzorci su potom podijeljeni u dva dijela i do analize čuvani zamrznutima na -70 °C.

Uzorci krvi prikupljeni su između 8 i 10 sati ujutro metodom vakuumske vađenja krvi (na antikoagulans) iz vena kubitalne jame. Ostavljeni su pri sobnoj temperaturi 90 minuta i potom centrifugirani 10 minuta pri 450 g u stolnoj centrifugi (ROTINA 35, Hettich, Njemačka). Dobiveni serum podijeljen je u dva dijela i do analize je čuvan zamrznut na -70 °C.

Nakon odmrzavanja uzorci sline i seruma nisu ponovo zamrzavani, a analizirani su 1-2 sata nakon odmrzavanja. Koncentracije IL-6 i TNF- $\alpha$  određene su kemiluminiscentnim enzimskim imunotestom (ELISA) i izražene u pikogramima po mililitru (pg/mL).

### **3.2.2. ODREĐIVANJE IL-6 I TNF- $\alpha$ KEMILUMINISCENTNIM ENZIMSKIM IMUNOTESTOM**

Test djeluje po načelu *sandwich* metode. Primarno protutijelo vezano na krutu fazu veže na sebe antigen (citokin) iz uzorka. Na taj se imunokompleks veže sekundarno protutijelo obilježeno enzimom, čime nastaje *sandwich* učvršćen na krutu fazu. Dodavanjem luminogenog supstrata i njegovom razgradnjom emitira se svjetlost čija se jačina mjeri luminometrom. U aparat za određivanje citokina početno se stavlja 300  $\mu$ L uzorka (sline, seruma). Nakon toga je cijela reakcija potpuno automatizirana (IMMULITE, Siemens Healthcare, Eschborn, Njemačka). Uređaj ispisuje koncentraciju mjerenog citokina u pg/mL.

Korišteno je primarno monoklonsko mišje protu-IL-6-protutijelo i primarno monoklonsko mišje protu-TNF- $\alpha$ -protutijelo (IMMULITE, Siemens, Njemačka). Korištena su sljedeća sekundarna protutijela obilježena enzimom alkalna fosfataza: poliklonsko ovčje protu-IL-6-protutijelo i poliklonsko zečje protu-TNF- $\alpha$ -protutijelo (IMMULITE, Siemens, Njemačka). Luminogeni supstrat bio je adamantil-1,2-dioksetan fosfat.

IMMULITE IL-6 test sadrži protutijela visoko specifična za IL-6 čovjeka, bez križne reaktivnosti s drugim citokinima koji mogu biti prisutni u uzorku. Osjetljivost testa iznosi: 2,0 pg/ml, a raspon određivanja baždarnom krivuljom 2-1000 pg/ml. Varijabilnost unutar istog testa je 4,4 %, a varijabilnost između više testova 6,4 %.

IMMULITE TNF- $\alpha$  test sadrži protutijela visoko specifična za TNF- $\alpha$  čovjeka, bez križne reaktivnosti s drugim citokinima koji mogu biti prisutni u uzorku. Osjetljivost testa iznosi 4,0 pg/ml, a raspon određivanja baždarnom krivuljom 4-1000 pg/ml. Varijabilnost unutar istog testa je 3,2 %, a varijabilnost između više testova 5,2 %.

Kartoni i baza bolesnika ponovo su pregledani u lipnju 2012. godine i, osim već prikupljenih anamnestičkih podataka, zabilježen je i način liječenja osnovne bolesti, postojanje ili odsutnost lokoregionalnog recidiva i udaljenih metastaza. Prema smještaju tumori su podijeljeni na one koji zahvaćaju prednji dio usne šupljine, one koji zahvaćaju stražnji dio usne šupljine i tumore koji zahvaćaju i prednji i stražnji dio usne šupljine. Zabilježeno je vrijeme nastanka udaljenih metastaza ili lokoregionalnog recidiva (broj dana nakon prvog pregleda i uzimanja uzoraka krvi i sline). Vrijeme bez recidiva tumora i/ili pojave regionalnih i udaljenih metastaza označeno je kao vrijeme bez recidiva bolesti (engl. *disease free survival*). U bolesnika kod kojih nije došlo do nestanka tumora vrijeme bez recidiva bolesti označeno je, za potrebe statističke analize, kao jedan dan. Preživljenje bolesnika na dan 10. lipnja 2012. zabilježeno je kao umro ili živ, a prema posljednjoj kvartalnoj kontroli. Vrijeme (u danima) od uzimanja uzoraka krvi i sline do smrti bolesnika ili 10. lipnja 2012. (ukoliko je bolesnik preživio) označeno je kao vrijeme preživljenja bolesnika (engl. *cause specific survival*).

### **3.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA**

Za obradu podataka korišten je statistički program MedCalc 13.0.0. Normalnost raspodjele testirana je Kolmogoroff Smirnovljevim testom. Za sve je varijable, osim dob, pokazana neravnomjerna raspodjela podataka. Za prikaze pojedinih varijabli korištene su metode deskriptivne statistike. Dostupnim metodama nije bilo moguće pretvoriti varijable tako da pokazuju normalnu raspodjelu te su u daljnjoj analizi korištene metode neparametrijske statistike. Ovisnost kontrolnih varijabli i vrijednosti IL-6 i TNF- $\alpha$  testirane su Mann-Whitnejevim testom. Iznimno, kod testiranja razlika u vrijednostima citokina između dobnih skupina korišten je parametrijski t-test. Dob je dihotomizirana prema srednjoj vrijednosti oboljelih od karcinoma usne šupljine koja je iznosila 59 godina. Za analizu odnosa vrijednosti IL-6 i TNF- $\alpha$  u serumu i slini u odnosu na recidiv tumora, regionalne i udaljene metastaze te preživljenje, korištene su Kaplan Meierove krivulje i log-rang test u univarijatnoj te Coxova regresijska analiza preživljena u multivarijatnoj statistici. Razina značajnosti (p) manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom u svim analizama.

Kontrolne varijable bile su dob, spol, pušenje, smještaj tumora, N klasifikacija, stadij bolesti, vrsta liječenja i pridruženi komorbiditeti.

Vrijednosti citokina niže od detektibilne označene su kao 0,001 pg/ml, a više kao 1000 pg/ml. Povišene vrijednosti IL-6 i TNF- $\alpha$  definirane su kao vrijednosti više od 95. percentile vrijednosti kod zdravih ispitanika (177).

#### **4. REZULTATI**



Istraživanje je provedeno na uzorcima sline i seruma 36 ispitanika koji boluju od OC (u daljnjem tekstu bolesnici) i 31 zdravog ispitanika (u daljnjem tekstu kontrola). Raspodjela po dobi i spolu za bolesnike i kontrolu prikazana je u tablici 1. U skupini bolesnika srednja starosna dob iznosila je 59, a u kontroli 58 godina. S obzirom na dob i spol među ispitivanim skupinama nije bilo statistički značajne razlike.

Tablica 1. Raspodjela po dobi i spolu za bolesnike i kontrolu

Skupina	Muškarci N (%)	Žene N (%)	Ukupno N (%)	p*	Srednja dob +/- SD	p**
Bolesnici	30 (83)	6 (17)	36 (100)	0,209	59 +/-10	0,6155
Kontrola	19 (61)	12 (39)	31 (100)		58 +/- 5	
Ukupno	49 (100)	18 (100)	67 (100)			

\* hi-kvadrat test, \*\* t-test, N = broj uzoraka, SD – standardna devijacija

U tablici 2 prikazana je raspodjela bolesnika s obzirom na TNM status. Većina bolesnika imala je tumor smješten u stražnjem dijelu usne šupljine te tumore stadija 3 i 4. U trenutku postavljanja dijagnoze jedan je bolesnik imao udaljenu metastazu.

Tablica 2. Kliničke osobitosti bolesti

Smještaj tumora (N)	Prednji dio usne šupljine	11
	Stražnji dio usne šupljine	21
	I prednji i stražnji dio usne šupljine	4
Veličina tumora (N)	T1	4
	T2	8
	T3	12
	T4	12
N klasifikacija* (N)	N0	17
	N1	5
	N2	12
	N3	1
Prisutnost udaljenih metastaza (N)	M0	35
	M1	1
Stadij bolesti (N)	Stadij 1	3
	Stadij 2	6
	Stadij 3	12
	Stadij 4	15

\* za jednog bolesnika nema podataka o N klasifikaciji

N = broj bolesnika

#### 4.1. VRIJEDNOSTI CITOKINA U SERUMU I SLINI BOLESNIKA I KONTROLA

Povišene vrijednosti IL-6 i TNF- $\alpha$  definirane su kao više od 95. percentile vrijednosti kod kontrola (177) te su za IL-6 u serumu iznosile 6 pg/ml, za TNF- $\alpha$  u serumu 28,6 pg/ml, za IL-6 u slini 80,8 pg/ml, a za TNF- $\alpha$  u slini 96,6 pg/ml.

##### IL-6 I TNF- $\alpha$ U SERUMU

U tablici 3 prikazan je broj bolesnika i kontrola te pripadajuće vrijednosti IL-6 i TNF- $\alpha$  u njihovim serumima. Utvrđeno je statistički značajno povišenje koncentracije IL-6 u serumu bolesnika u odnosu na kontrolu. Suprotno tome, nije utvrđena statistički značajna razlika u vrijednostima TNF- $\alpha$  u serumu između bolesnika i kontrole

Tablica 3. Broj bolesnika i kontrola i pripadajuće vrijednosti IL-6 i TNF- $\alpha$  u serumu

<b>IL-6</b>	Bolesnici	Kontrola	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Bolesnici	Kontrola
< ili = 6 pg/ml	28	31	< ili = 28,6 pg/ml	36	30
> 6 pg/ml	8	0	> 28,6 pg/ml	0	1
P*	0,006		P*	0,463	

\* Fisherov egzaktni test

##### IL-6 I TNF- $\alpha$ U SLINI

U tablici 4 prikazan je broj bolesnika i kontrola te pripadajuće vrijednosti IL-6 i TNF- $\alpha$  u njihovoj slini. Bolesnici su imali značajno više vrijednosti IL-6 u slini u odnosu na kontrolu. Suprotno tome, nije utvrđena statistički značajna razlika u vrijednostima TNF- $\alpha$  u slini između bolesnika i kontrole.

Tablica 4. Vrijednosti IL-6 u slini bolesnika i kontrola

<b>IL-6</b>	Bolesnici	Kontrola	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Bolesnici	Kontrola
< ili = 80,8 pg/ml	15	30	< = 96,6 pg/ml	31	30
> 80,8 pg/ml	21	1	> 96,6pg/ml	5	1
P*	0,0001		p*	0,205	

\* Fisherov egzaktni test

## 4.2. ODNOS KONTROLNIH VARIJABLI I RAZINE IL-6 I TNF- $\alpha$ U SERUMU I SLINI BOLESNIKA

### Utjecaj spola i dobi na vrijednosti IL-6 i TNF- $\alpha$ u serumu bolesnika

Muški ispitanici imali su statistički značajno više vrijednosti oba citokina u odnosu na ženske ispitanike (tablica 5). Dob nije utjecala na vrijednosti IL-6 i TNF- $\alpha$  u serumu bolesnika (tablica 6).

Tablica 5. Koncentracije IL-6 i TNF- $\alpha$  u serumu bolesnika - raspodjela po spolu

	IL-6 u serumu (pg/ml)	TNF- $\alpha$ u serumu (pg/ml)
<b>Muškarci (N = 30)</b>		
Medijan	3	7
Najmanja vrijednost	0,001	0,001
Najveća vrijednost	14	22
<b>Žene (N = 6)</b>		
Medijan	1	5
Najmanja vrijednost	0,001	0,001
Najveća vrijednost	2	8
<b>p*</b>	<b>0,03</b>	<b>0,02</b>

\*Mann-Whitney U test

Tablica 6. Koncentracije IL-6 i TNF- $\alpha$  u serumu bolesnika - raspodjela po dobi

		IL-6 u serumu (pg/ml)	TNF- $\alpha$ u serumu (pg/ml)
Dob <59 godina	Aritmetička sredina	2,72	7,83
	Standardna devijacija	3,18	3,43
Dob 59+	Aritmetička sredina	5	7,94
	Standardna devijacija	4,6	5,85
<b>P*</b>		0,093	0,095

\* Studentov t-test

## Utjecaj pušenja i komorbiditeta na vrijednosti IL-6 i TNF- $\alpha$ u serumu bolesnika

Pušači imaju statistički značajno više vrijednosti TNF- $\alpha$  u serumu od nepušača, ali se razine IL-6 nisu razlikovale u ove dvije skupine (tablica 7). Prisutni komorbiditeti (povišeni krvni tlak, šećerna bolest i gastritis) nisu utjecali na vrijednosti IL-6 u serumu, ali su bili povezani s nižim vrijednostima TNF- $\alpha$  u serumu (tablica 8).

Tablica 7. Odnos pušenja i vrijednosti IL-6 i TNF- $\alpha$  u serumu bolesnika

	Pušači (N=26)			Nepušači (N=10)			P*
	Medijan	Najniža vrijednost	Najviša vrijednost	Medijan	Najniža vrijednost	Najviša vrijednost	
<b>IL-6 (pg/ml)</b>	3	0,001	14	1	0,001	7	0,17
<b>TNF-<math>\alpha</math> (pg/ml)</b>	7,5	0,001	22	5	0,001	10	<b>0,04</b>

\* Mann-Whitney U test

Tablica 8. Odnos komorbiditeta i vrijednosti IL-6 i TNF- $\alpha$  u serumu bolesnika

	Prisutni komorbiditeti (N=14)			Bez komorbiditeta (N=22)			P*
	Medijan	Najniža vrijednost	Najviša vrijednost	Medijan	Najniža vrijednost	Najviša vrijednost	
<b>IL-6 (pg/ml)</b>	2	0,001	12	3	0,001	14	0,57
<b>TNF-<math>\alpha</math> (pg/ml)</b>	5	0,001	11	7,5	5	22	<b>0,02</b>

\* Mann-Whitney U test

## Odnos smještaja, N klasifikacije te stadija tumora i vrijednosti IL-6 i TNF- $\alpha$ u serumu bolesnika

Nije utvrđena statistički značajna razlika u vrijednostima IL-6 i TNF- $\alpha$  u serumu bolesnika u odnosu na smještaj tumora (tablica 9), N klasifikaciju (tumori bez metastaza u limfne čvorove u odnosu na tumore s metastazama u limfne čvorove) te stadij bolesti (stadiji 1 i 2 u odnosu na stadije 3 i 4) (tablica 10).

Tablica 9. Odnos smještaja tumora i vrijednosti IL-6 i TNF- $\alpha$  u serumu bolesnika

		Smještaj tumora – usna šupljina			
		Prednji dio	Stražnji dio	I prednji i stražnji dio	
	Broj tumora	11	21	4	
IL-6 (pg/ml)	Najniža vrijednost	0,001	0,001	0,001	p*=0,206
	Najviša vrijednost	12	14	4	
	Medijan	3	2	0,001	
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	Najniža vrijednost	4	0,001	6	p*=0,641
	Najviša vrijednost	10	22	13	
	Medijan	7	6	8	

\* Kruskal-Wallis test

Tablica 10. Odnos N klasifikacije i stadija tumora i vrijednosti IL-6 i TNF- $\alpha$  u serumu bolesnika

		N klasifikacija tumora		Stadij tumora	
		N0	N1+N2+N3	S1+S2	S3+S4
	N	17	18	9	27
IL-6 (pg/ml)	Najniža vrijednost	0,001	0,001	2	0,001
	Najviša vrijednost	14	12	12	14
	Medijan	2	2,5	3	2
	p*	0,776		0,202	
TNF-alfa (pg/ml)	Najniža vrijednost	0,001	0,001	4	0,001
	Najviša vrijednost	15	22	11	22
	Medijan	5	7	7	7
	p*	0,288		0,485	

\*Mann-Whitney U test

## Utjecaj spola i dobi na vrijednosti IL-6 i TNF- $\alpha$ u slini bolesnika

Koncentracije IL-6 i TNF- $\alpha$  u slini nisu se razlikovale u odnosu na spol (tablica 11) i dob bolesnika (tablica 12).

Tablica 11. Koncentracije IL-6 i TNF- $\alpha$  u slini bolesnika - raspodjela po spolu

	IL-6 (pg/ml)	TNF-alfa (pg/ml)
<b>Muškarci (N=30)</b>		
Medijan	149,5	35,5
Najmanja vrijednost	0,001	14
Najveća vrijednost	1000	313
<b>Žene (N=6)</b>		
Medijan	86,5	32
Najmanja vrijednost	0,001	13
Najveća vrijednost	604	59
<b>p*</b>	0,372	0,21

\*Mann-Whitney U test

Tablica 12. Koncentracije IL-6 i TNF- $\alpha$  u slini bolesnika - raspodjela po dobi

		IL-6 (pg/ml)	TNF- $\alpha$ (pg/ml)
Dob <59 godina	Aritmetička sredina	150,34	48,83
	Standardna devijacija	202,5	28,36
Dob 59+	Aritmetička sredina	352,2	66,33
	Standardna devijacija	380,12	70,24
<b>P*</b>		0,053	0,216

\* Studentov t-test

## Utjecaj pušenja i komorbiditeta na vrijednosti IL-6 i TNF- $\alpha$ u slini bolesnika

Pušenje i komorbiditeti nisu utjecali na promjenu razina IL-6 i TNF- $\alpha$  u slini bolesnika (tablice 13 i 14).

Tablica 13. Utjecaj pušenja na vrijednosti IL-6 i TNF- $\alpha$  u slini bolesnika

	Pušači (N=26)			Nepušači (N=10)			P*
	Medijan	Najniža vrijednost	Najviša vrijednost	Medijan	Najniža vrijednost	Najviša vrijednost	
<b>IL-6 (pg/ml)</b>	167	0,001	1000	29,5	0,001	1000	0,116
<b>TNF- (pg/ml)</b>	33	20	313	37,5	13	138	0,609

\* Mann-Whitney U test

Tablica 14. Utjecaj komorbiditeta na vrijednosti IL-6 i TNF- $\alpha$  u slini bolesnika

	Prisutni komorbiditeti (N=14)			Bez komorbiditeta (N=22)			P*
	Medijan	Najniža vrijednost	Najviša vrijednost	Medijan	Najniža vrijednost	Najviša vrijednost	
<b>IL-6 (pg/ml)</b>	135	0,001	1000	147	0,001	1000	0,661
<b>TNF-alfa (pg/ml)</b>	33,5	13	118	35,5	20	313	0,355

\* Mann-Whitney U test

## Odnos smještaja, N klasifikacije te stadija tumora na vrijednosti IL-6 i TNF- $\alpha$ u slini bolesnika

Nisu utvrđene statistički značajne razlike u koncentracijama IL-6 i TNF- $\alpha$  u slini ovisno o smještaju (tablica 15), N klasifikaciji tumora te stadiju bolesti (tablica 16).

Tablica 15. Odnos smještaja tumora i vrijednosti IL-6 i TNF- $\alpha$  u slini bolesnika

		Smještaj tumora - usna šupljina			
		Prednji dio	Stražnji dio	I prednji i stražnji dio	
	Broj bolesnika	11	21	4	
IL-6 (pg/ml)	Najniža vrijednost	0,001	0,001	2	p*=0,854
	Najviša vrijednost	1000	1000	652	
	Medijan	129	187	87	
TNF-alfa slina (pg/ml)	Najniža vrijednost	20	13	20	p*=0,912
	Najviša vrijednost	94	313	78	
	Medijan	34	31	48,5	

\* Kruskal-Wallis test

Tablica 16. Odnos N klasifikacije te stadija tumora na vrijednosti IL-6 i TNF- $\alpha$  u slini bolesnika

		N klasifikacija tumora		Stadij tumora	
		N0	N1+N2+N3	S1+S2	S3+S4
	N	17	18	9	27
IL-6 (pg/ml)	Najniža vrijednost	0,001	0,001	0,001	0,001
	Najviša vrijednost	1000	1000	288	1000
	Medijan	187	128,5	128	165
	p*	0,552		0,289	
TNF-alfa (pg/ml)	Najniža vrijednost	13	14	23	13
	Najviša vrijednost	138	313	73	313
	Medijan	34	34	34	35
	p*	0,96		0,971	

\*Mann-Whitney U test



#### 4.3. ODNOS DOBI, SPOLA I PUŠENJA NA POJAVU LOKOREGIONALNOG RECIDIVA I UDALJENIH METASTAZA U BOLESNIKA

Dob oboljelih nije utjecala na lokoregionalni recidiv bolesti dok su bolesnici s udaljenim metastazama bili značajno mlađi u odnosu na bolesnike bez udaljenih metastaza (tablica 17).

Tablica 17. Odnos dobi i pojave lokoregionalnog recidiva tumora i udaljenih metastaza u bolesnika

	Dob (godine)	
Lokoregionalni recidiv (N=17)	Najniža vrijednost	41
	Najviša vrijednost	78
	Medijan	61
Bez lokoregionalnog recidiva (N=19)	Najniža vrijednost	37
	Najviša vrijednost	77
	Medijan	60
	p*	0,456
Prisutna udaljena metastaza (N=7)	Najniža vrijednost	44
	Najviša vrijednost	61
	Medijan	53
Bez udaljene metastaze (N=29)	Najniža vrijednost	37
	Najviša vrijednost	78
	Medijan	61
	p*	<b>0,0375</b>

\* Mann-Whitney U test

Spol i pušenje nisu utjecali na pojavu lokoregionalnog recidiva bolesti i udaljenih metastaza u bolesnika (tablice 18 i 19).

Tablica 18. Odnos spola i lokoregionalnog recidiva tumora i pojave udaljenih metastaza

	Lokoregionalni recidiv	Bez lokoregionalnog recidiva	Prisutna udaljena metastaza	Bez udaljene metastaze
Muškarci	12	18	7	23
Žene	5	1	0	6
p*		0,08		0,317

\* Fisherov egzaktni test

Tablica 19. Odnos pušenja i lokoregionalnog recidiva tumora i pojave udaljenih metastaza

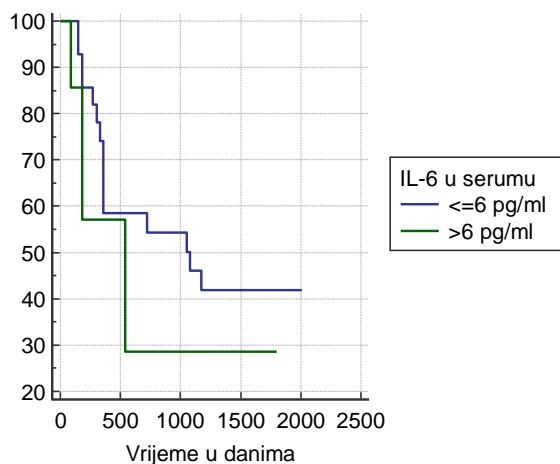
	Lokoregionalni recidiv	Bez lokoregionalnog recidiva	Prisutna udaljena metastaza	Bez udaljene metastaze
Puši	13	13	6	20
Ne puši	4	6	1	9
p*		0,717		0,645

\* Fisherov egzaktni test

#### 4.4. UNIVARIJATNA ANALIZA VREMENA BEZ RECIDIVA BOLESTI

Univarijatom analizom testirane su sljedeće varijable: IL-6 i TNF- $\alpha$  u serumu, IL-6 i TNF- $\alpha$  u slini, dob, spol, pušenje, pridruženi komorbiditeti, smještaj, N klasifikacija i stadij tumora te vrsta liječenja. Vrijednosti IL-6 i TNF- $\alpha$  su dihotomizirane kao normalne i povišene vrijednosti prema vrijednosti 95. percentilne vrijednosti u zdravih ispitanika (133) (IL-6 u serumu - 6 pg/ml; TNF- $\alpha$  u serumu - 28,6 pg/ml, IL-6 u slini - 80,8 pg/ml, TNF- $\alpha$  u slini - 96,6 pg/ml).

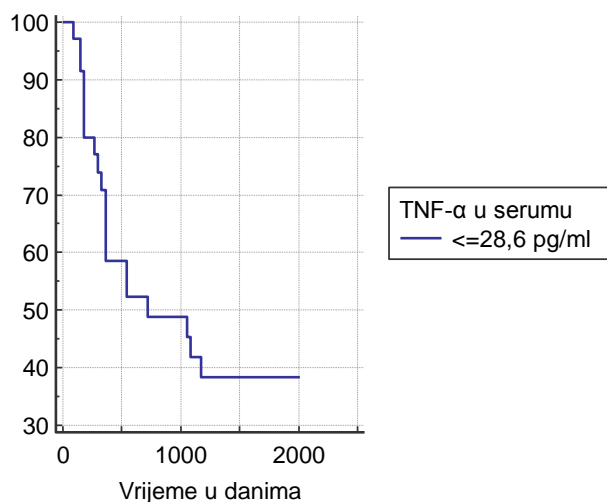
Razine IL-6 i TNF- $\alpha$  u serumu i slini, dob, spol, pušenje, komorbiditeti, smještaj, stadij i N klasifikacija tumora nisu se pokazali kao značajni čimbenici rizika za recidiv bolesti (slika 11 – slika 21). Jedino se vrsta liječenja pokazala statistički značajnim čimbenikom rizika za recidiv bolesti u univarijatom analizi (slika 22 i tablica 20). Bolesnici liječeni kemoradioterapijom imaju kraće vrijeme bez recidiva bolesti.



p=0,251

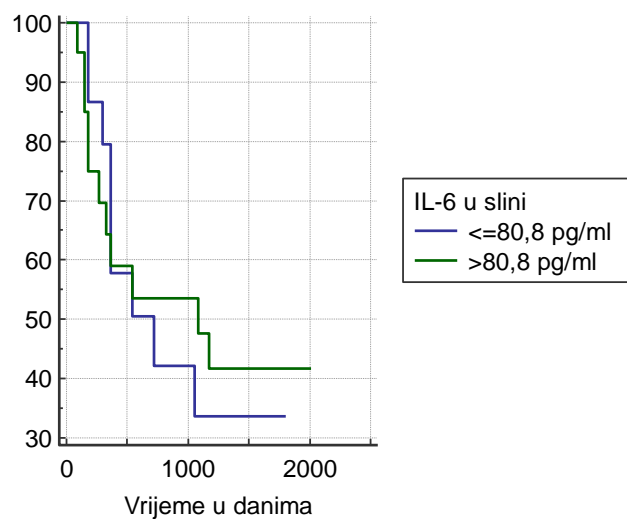
**Slika 11. Kaplan-Meierove krivulje za recidiv bolesti ovisno o koncentraciji IL-6 u serumu**

Koncentracija IL-6 u serumu se nije pokazala kao statistički značajan čimbenik rizika za recidiv bolesti u univarijatom analizi.



**Slika 12. Kaplan-Meierove krivulje za recidiv bolesti ovisno o koncentraciji TNF- $\alpha$  u serumu**

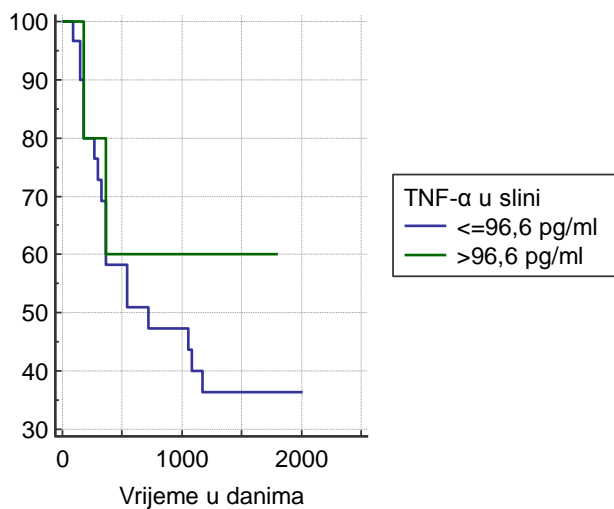
Koncentracija TNF- $\alpha$  u serumu se nije pokazala kao statistički značajan čimbenik rizika za recidiv bolesti u univarijatnoj analizi. Niti jedan bolesnik nije imao koncentraciju TNF- $\alpha$  u serumu veću od 28,6 pg/ml.



p=0,911

**Slika 13. Kaplan-Meierove krivulje za recidiv bolesti ovisno o koncentraciji IL-6 u slini**

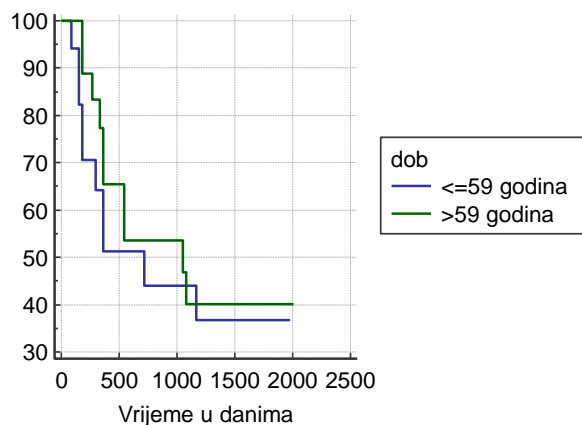
Koncentracija IL-6 u slini se nije pokazala kao statistički značajan čimbenik rizika za recidiv bolesti u univarijatnoj analizi.



$p=0,574$

**Slika 14. Kaplan-Meierove krivulje za recidiv bolesti ovisno o koncentraciji TNF- $\alpha$  u slini**

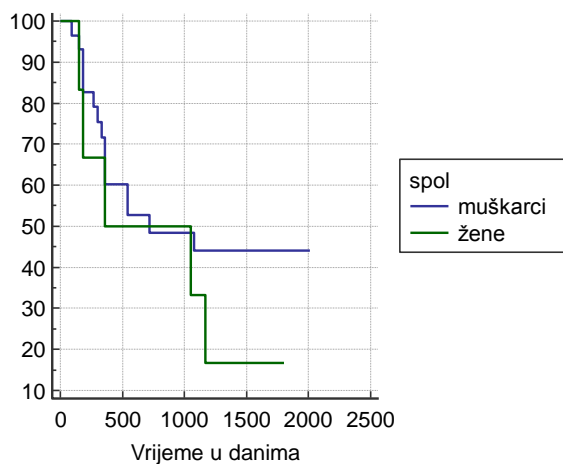
Koncentracija TNF- $\alpha$  u slini se nije pokazala kao statistički značajan čimbenik rizika za recidiv bolesti u univarijatnoj analizi.



$p=0,603$

**Slika 15. Kaplan-Meierove krivulje za recidiv bolesti ovisno o dobi**

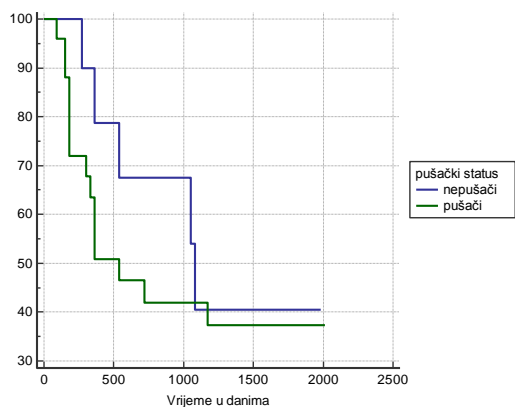
Dob se nije pokazala kao statistički značajan čimbenik rizika za recidiv bolesti u univarijatnoj analizi.



$p=0,316$

**Slika 16. Kaplan-Meierove krivulje za recidiv bolesti ovisno o spolu**

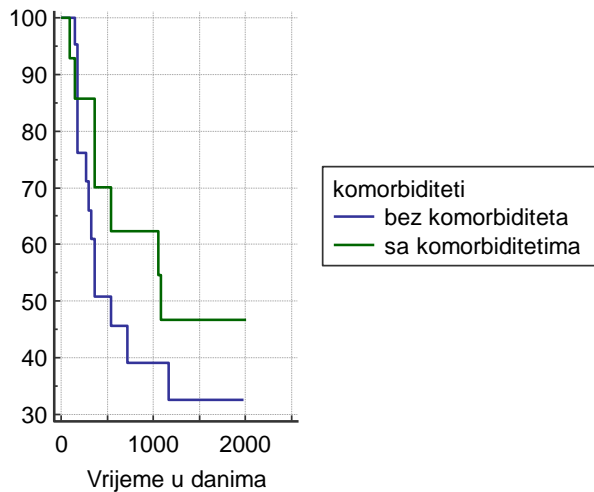
Spol se nije pokazao kao statistički značajan čimbenik rizika za recidiv bolesti u univarijantnoj analizi.



$p=0,453$

**Slika 17. Kaplan-Meierove krivulje za recidiv bolesti ovisno o pušenju cigareta**

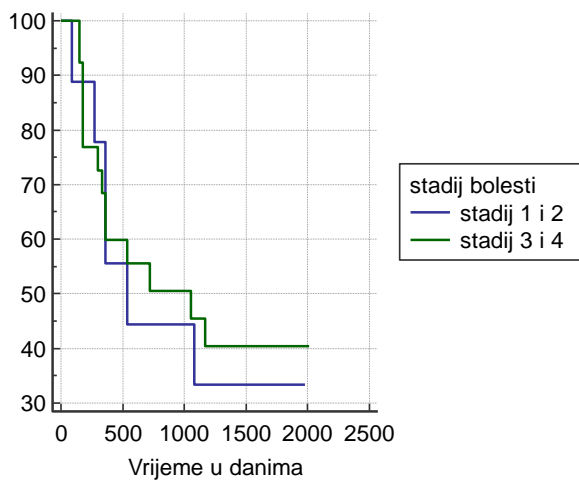
Pušenje se nije pokazalo kao statistički značajan čimbenik rizika za recidiv bolesti u univarijantnoj analizi.



$p=0,349$

**Slika 18. Kaplan-Meierove krivulje za recidiv bolesti ovisno o pridruženim komorbiditetima**

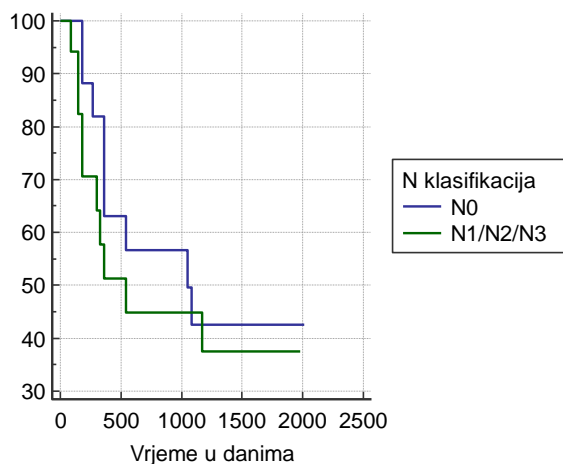
Pridruženi komorbiditeti se nisu pokazali kao statistički značajan čimbenik rizika za recidiv bolesti u univarijantnoj analizi.



$p=0,776$

**Slika 19. Kaplan-Meierove krivulje za recidiv bolesti ovisno o stadiju bolesti**

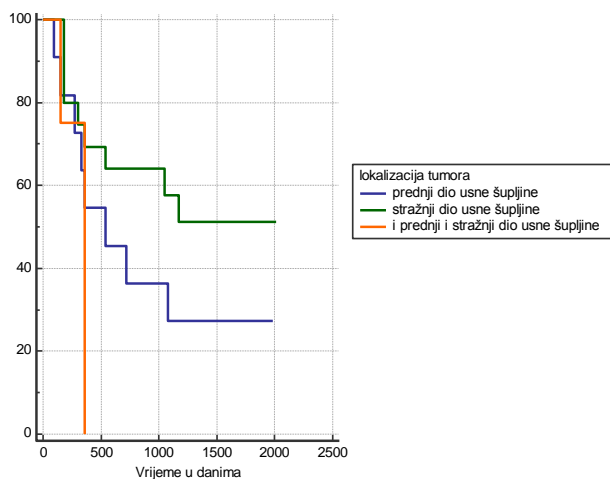
Stadij bolesti se nije pokazao kao statistički značajan čimbenik rizika za recidiv bolesti u univarijantnoj analizi.



p=0,489

**Slika 20. Kaplan-Meierove krivulje za recidiv bolesti ovisno o N klasifikaciji**

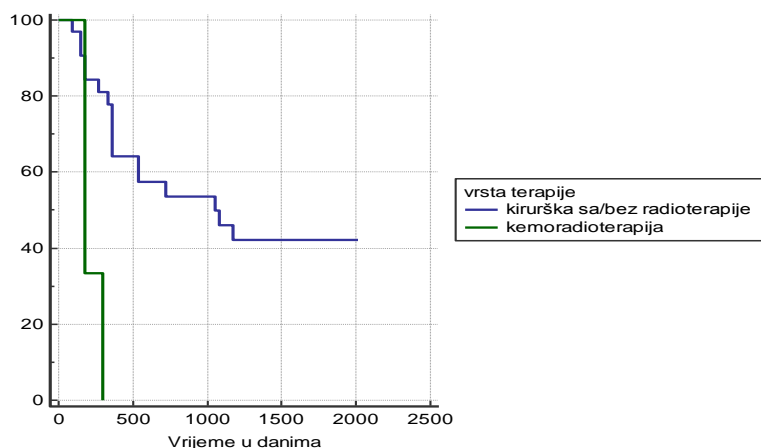
N klasifikacija se nije pokazala kao statistički značajan čimbenik rizika za recidiv bolesti u univarijantnoj analizi.



p=0,12

**Slika 21. Kaplan-Meierove krivulje za recidiv bolesti ovisno o smještaju tumora**

Smještaj tumora nije se pokazao kao statistički značajan čimbenik rizika za recidiv bolesti u univarijantnoj analizi.



p=0,004

**Slika 22. Kaplan-Meierove krivulje za recidiv bolesti ovisno o vrsti liječenja**

Vrsta liječenja se pokazala kao statistički značajan čimbenik rizika za recidiv bolesti u univarijantnoj analizi.

**Tablica 20. Univarijantna analiza utjecaja vrste liječenja na recidiv bolesti**

Vrsta liječenja	Broj događaja (recidiv tumora)		Cenzurirani podaci		Ukupno	Vrijeme bez recidiva tumora (dani)	
	N	%	N	%		Aritmetička sredina +/- SD	Medijan
Kirurško sa/bez radioterapije	17	53,3	15	46,88	32	1130+/- 146	1050
Kemoradioterapija	3	100	0	0	3	220+/- 33	180
Ukupno	20	57,14	15	42,86	35	1049+/- 99	720
Hi-kvadrat	8,49						
Stupnjevi slobode	1						
P	<b>0,004</b>						

N= broj bolesnika

\*= jedan bolesnik je bio bez terapije

Iz tablice 20 je vidljivo da su bolesnici liječeni kemoradioterapijom imali značajno niži medijan vremena bez recidiva bolesti u odnosu na bolesnike liječene kirurški sa ili bez radioterapije (180 dana nasuprot 1050 dana).



#### 4.5. MULTIVARIJATNA ANALIZA VREMENA BEZ RECIDIVA BOLESTI

Daljnjom multivarijatnom analizom ponovo su testirane sve varijable budući da varijabla koja nije značajna u univarijatnoj, može pokazati značajnost u multivarijatnoj analizi, kada su kontrolirani svi kofaktori (178). Vrijednosti IL-6 i TNF- $\alpha$  su za potrebe ove analize logaritmirani kako bi se dobila kontinuirana varijabla i izbjegao utjecaj ekstremnih vrijednosti. Rezultati su prikazani u tablici 21.

Tablica 21. Coxova regresijska analiza vremena bez recidiva bolesti

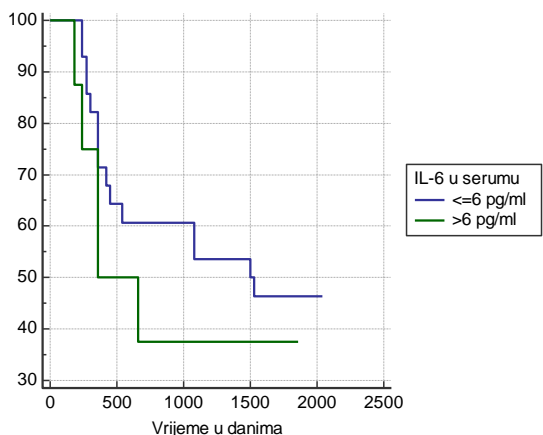
Značajne varijable	Koeficijent regresije	Omjer rizika	95% CI	p
log IL-6 u serumu	0,45	1,57	1,06-2,33	<b>0,03</b>
log IL-6 u slini	-0,32	0,73	0,54-0,97	<b>0,03</b>
Smještaj tumora Prednji i stražnji dio usta vs prednji i vs stražnji dijelovi usta	2,36	10,59	2,04-55,06	<b>0,005</b>
Vrsta liječenja Kemoradioterapija vs kirurško liječenje sa/bez radioterapije	3,21	24,83	4,18- 147,40	<b>&lt;0,001</b>
<b>Neznačajne varijable bile su:</b> log TNF- $\alpha$ u serumu, log TNF- $\alpha$ u slini, dob, spol, pušenje cigareta, stadij tumora, komorbiditeti, N-klasifikacija				

Za IL-6 omjer rizika je za jedinicu logaritamske vrijednosti

Multivarijatnom analizom utvrđeno je da su koncentracije IL-6 u serumu i slini, smještaj tumora i liječenje nezavisni čimbenici rizika za recidiv bolesti. Porast vrijednosti za jednu jedinicu log (IL-6) u serumu povisuje omjer rizika za recidiv bolesti za 1,57. Porast vrijednosti za jednu jedinicu log (IL-6) u slini smanjuje omjer rizika za recidiv bolesti za 0,73. Bolesnici s tumorom u prednjem i stražnjem dijelu usne šupljine imaju 10 puta veću šansu za recidiv bolesti od bolesnika koji imaju tumor samo u stražnjem ili samo u prednjem dijelu usne šupljine. Bolesnici koji su liječeni samo kemoradioterapijom imaju 24,8 puta veći rizik za recidiv bolesti od bolesnika liječenih kirurški sa/bez liječenja zračenjem. Važno je napomenuti da nije utvrđena povezanost između vrste liječenja i stadija tumora, odnosno tumori bolesnika liječenih kemoradioterapijom nisu bili oni najvećeg stadija.

#### 4.6. UNIVARIJATNA ANALIZA VREMENA PREŽIVLJENJA BOLESNIKA

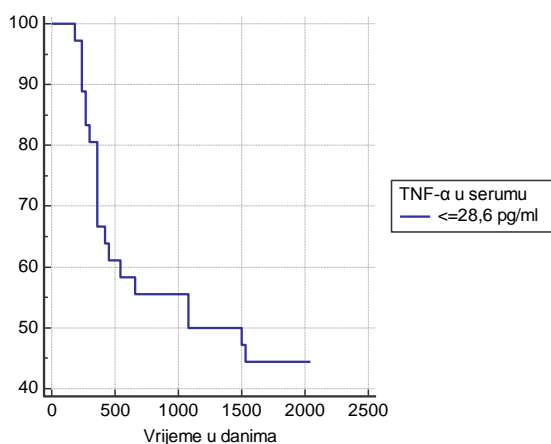
Univarijatom analizom niti jedna varijabla nije se pokazala kao značajni čimbenik rizika za preživljenje bolesnika. Na slici 23 do slike 34 prikazane su Kaplan-Meierove krivulje i značajnost za log-rang test.



p=0,476

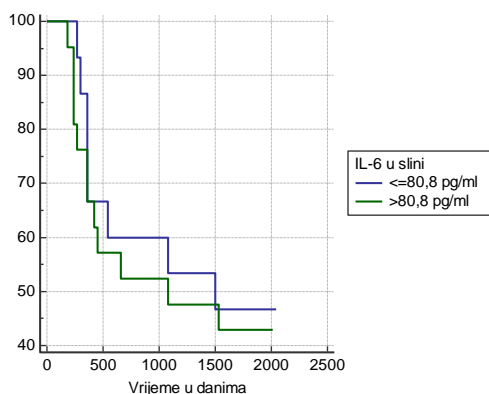
**Slika 23. Kaplan-Meierove krivulje za vrijeme preživljenja bolesnika ovisno o koncentraciji IL-6 u serumu**

Koncentracija IL-6 u serumu se nije pokazala kao statistički značajan čimbenik rizika za preživljenje oboljelih od OC u univarijatom analizi.



**Slika 24. Kaplan-Meierove krivulje za vrijeme preživljenja bolesnika ovisno o koncentraciji TNF- $\alpha$  u serumu**

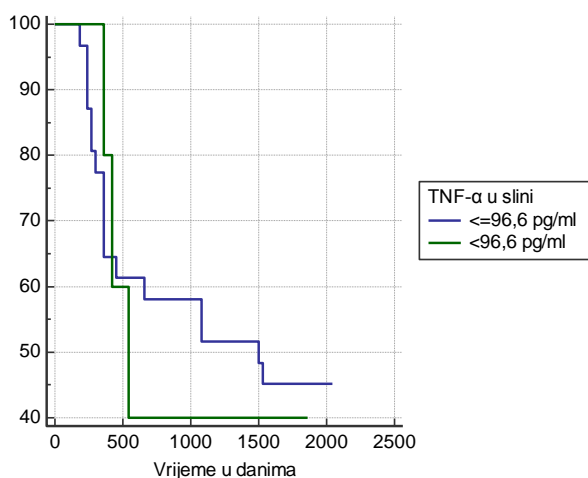
Koncentracija TNF- $\alpha$  u serumu se nije pokazala kao statistički značajan čimbenik rizika za preživljenje oboljelih od OC u univarijatom analizi. Niti jedan bolesnik nije imao koncentraciju TNF- $\alpha$  u serumu veću od 28,6 pg/ml.



p=0,698

**Slika 25. Kaplan-Meierove krivulje za vrijeme preživljenja bolesnika ovisno o koncentraciji IL-6 u slini**

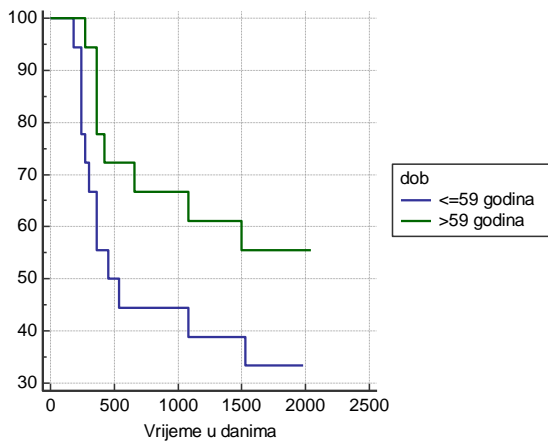
Koncentracija IL-6 u slini se nije pokazala kao statistički značajan čimbenik rizika za preživljenje oboljelih od OC u univarijantnoj analizi.



p=0,93

**Slika 26. Kaplan-Meierove krivulje za vrijeme preživljenja bolesnika ovisno o koncentraciji TNF-α u slini**

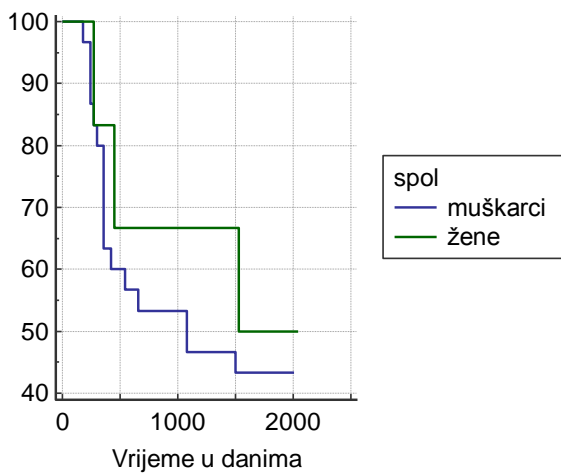
Koncentracija TNF-α u slini se nije pokazala kao statistički značajan čimbenik rizika za preživljenje oboljelih od OC u univarijantnoj analizi.



p=0,111

**Slika 27. Kaplan-Meierove krivulje za vrijeme preživljenja bolesnika ovisno o dobi**

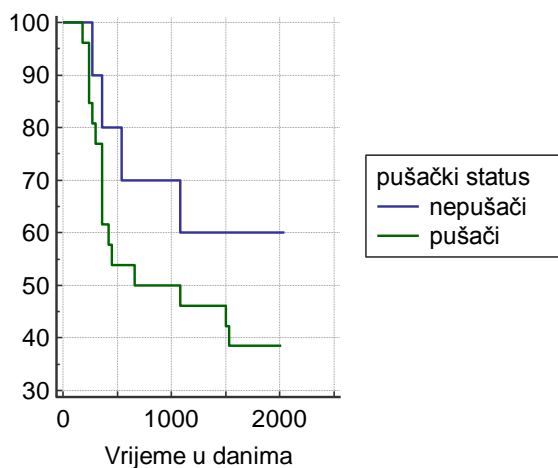
Dob se nije pokazala kao statistički značajan čimbenik rizika za preživljenje oboljelih od OC u univarijatnoj analizi.



p=0,663

**Slika 28. Kaplan-Meierove krivulje za vrijeme preživljenja bolesnika ovisno o spolu**

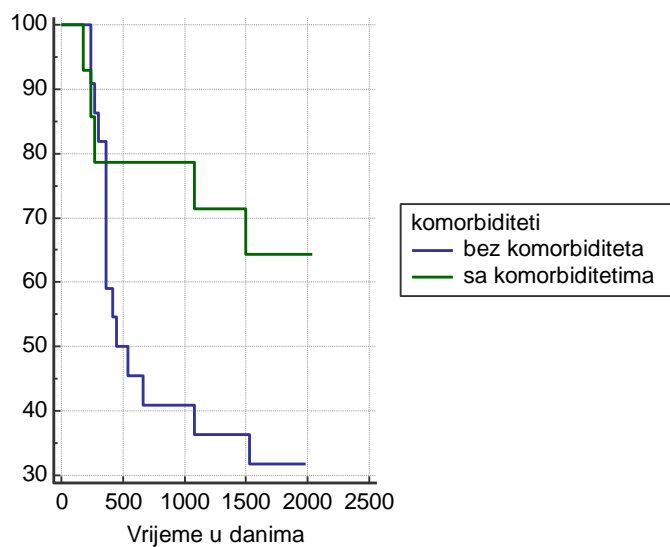
Spol se nije pokazao kao statistički značajan čimbenik rizika za preživljenje oboljelih od OC u univarijatnoj analizi.



p=0,241

**Slika 29. Kaplan-Meierove krivulje za vrijeme preživljenja bolesnika ovisno o pušenju**

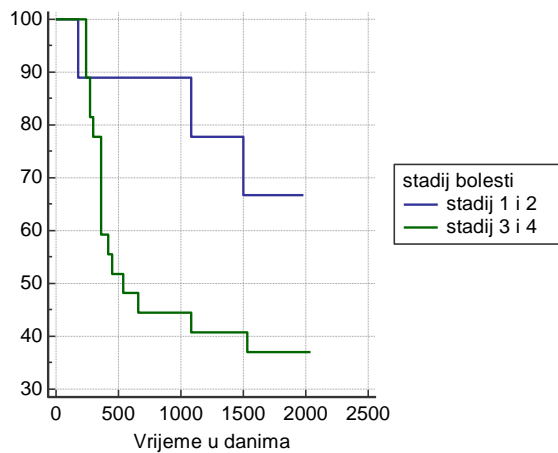
Pušenje se nije pokazalo kao statistički značajan čimbenik rizika za preživljenje oboljelih od OC u univarijantnoj analizi.



p=0,086

**Slika 30. Kaplan-Meierove krivulje za vrijeme preživljenja bolesnika ovisno o komorbiditetima**

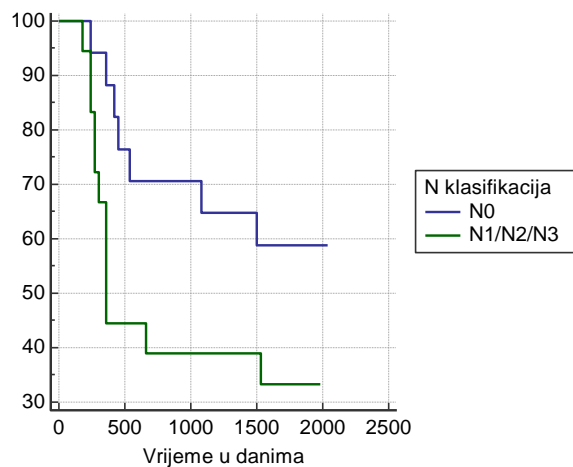
Pridruženi komorbiditeti se nisu pokazali kao statistički značajan čimbenik rizika za preživljenje oboljelih od OC u univarijantnoj analizi.



p=0,124

**Slika 31. Kaplan-Meierove krivulje za vrijeme preživljenja bolesnika ovisno o stadiju bolesti**

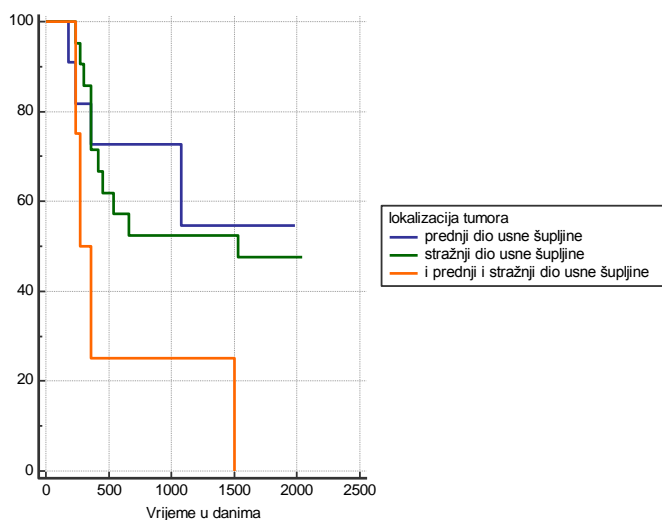
Stadij bolesti se nije pokazao kao statistički značajan čimbenik rizika za preživljenje oboljelih od OC u univarijantnoj analizi.



p=0,072

**Slika 32. Kaplan-Meierove krivulje za vrijeme preživljenja bolesnika ovisno o N klasifikaciji**

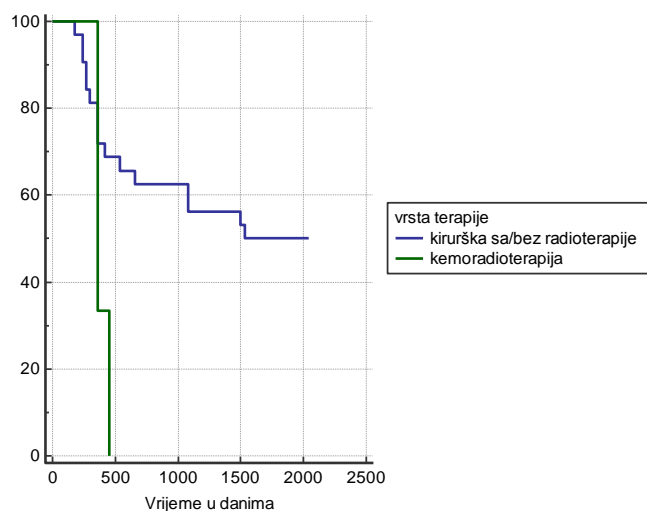
N klasifikacija tumora se nije pokazala kao statistički značajan čimbenik rizika za preživljenje oboljelih od OC u univarijantnoj analizi.



p=0,06

**Slika 33. Kaplan-Meierove krivulje za vrijeme preživljenja bolesnika ovisno o smještaju tumora**

Smještaj tumora se nije pokazao kao statistički značajan čimbenik rizika za preživljenje oboljelih od OC u univarijantnoj analizi.



p=0,06

**Slika 34. Kaplan-Meierove krivulje za vrijeme preživljenja bolesnika ovisno o vrsti liječenja**

Vrsta liječenja se nije pokazala kao statistički značajan čimbenik rizika za preživljenje oboljelih od OC u univarijantnoj analizi.

Niti jedna varijabla nije se pokazala značajna u univarijantnoj analizi, iako su varijable smještaj tumora i način liječenja imale tendenciju dosega značajnosti.

#### 4.7. MULTIVARIJATNA ANALIZA VREMENA PREŽIVLJENJA BOLESNIKA

Budući da se univarijatnom analizom niti jedna varijabla nije pokazala značajnim čimbenikom rizika za preživljenje bolesnika, sve su varijable ponovo analizirane multivarijatnom analizom. Pokazano je da su smještaj tumora i način liječenja jedini nezavisni čimbenici rizika za preživljenje bolesnika (tablica 22).

Tablica 22. Coxova regresijska analiza preživljenja bolesnika

Značajne varijable	Koeficijent regresije	Omjer rizika	95% CI	P
Smještaj tumora Prednji i stražnji dio usta vs prednji i vs stražnji dijelovi usta	1,67	5,35	1,60-17,8	<b>0,006</b>
Vrsta liječenja Kemoradioterapija vs kirurško liječenje sa/bez radioterapije	1,6	4,94	1,24- 19,63	<b>0,02</b>
<b>Neznačajne varijable bile su:</b> log IL-6 u serumu, log IL-6 u slini, log TNF- $\alpha$ u serumu, log TNF- $\alpha$ u slini, dob, spol, pušenje cigareta, komorbiditeti, stadij tumora, N-klasifikacija				

Bolesnici koji imaju tumore koji zahvaćaju prednji i stražnji dio usne šupljine imaju 5,35 puta veću šansu za smrtni ishod od osoba koji imaju tumore smještene samo u prednjem ili samo u stražnjem dijelu usne šupljine. Bolesnici liječeni kemoradioterapijom imaju 4,94 puta veću šansu za smrtni ishod u odnosu na bolesnike liječene kirurški sa/bez liječenja zračenjem.





## Upala i karcinogeneza

Povezanost upale i razvitka tumora danas je općenito prihvaćena, međutim pojedina pitanja su još uvijek nerazjašnjena. To su (160):

1. Je li upala dovoljan čimbenik za nastanak zloćudnih tumora?
2. Postoje li, unatoč različitostima između pojedinih vrsta tumora i mehanizama njihovog nastanka, aspekti upale povezane s tumorom koji su zajednički za sve zloćudne bolesti?
3. Na koji način ravnoteža između „dobre“ i „loše“ upale može biti promijenjena u smjeru prevladavanja stečene imunosti kao rezultata „dobre“ umjesto razvitka zloćudnih tumora kao rezultata „loše“ upale?
4. Koji je najbolji način „ciljanja“ upale povezane s tumorom u bolesnika sa zloćudnim tumorima s ciljem sprečavanja, dijagnoze i liječenja bolesnika?

Prvo, nejasno je je li upala dovoljna za razvoj zloćudnih tumora, odnosno, može li upala sama za sebe uzrokovati neoplazme bez prisutnosti ostalih vanjskih karcinogenih čimbenika. Nekoliko je dokaza koji upućuju da može. Na mišjem modelu upale crijeva uzrokovane manjkom IL-10, učestalost mutacija DNA u stanicama debelog crijeva u odsutnosti vanjskog karcinogena bila je 4-5 puta veća u usporedbi s miševima s dovoljno IL-10 (179). Usporedba tkiva tumora i analognog zdravog tkiva čovjeka pokazala je povećanu učestalost *de novo* nastalih mutacija u stanicama tumora. Jedino gdje se slučajne mutacije u zdravom tkivu pojavljuju s većom učestalošću je u tkivu zahvaćenom upalom (180). Kao jedna od mogućnosti unutaršnjeg upalnog karcinogenog čimbenika spominju se ROS.

I neutrofilu se također spominju kao sudionici upale povezane s karcinogenezom. U linijama stanica epitela pluća neutrofilu su pokazani kao inhibitori popravka oštećene DNA (*engl.* Base Excision Repair), učinka koji je posredovan aktivnošću mijeloperoksidaze (181). Zanimljiva je činjenica da je polimorfizam promotorskih regija gena mijeloperoksidaze povezan s otpornošću na razvoj raka pluća kod pušača (182).

Drugo je pitanje postoje li različitosti u nastanku kronične upale i osobinama njezinih glavnih izvršitelja makrofaga. Istraživanja klasičnim histološkim metodama na različitim modelima pokazuju da se upala povezana s tumorima razlikuje među različitim tipovima tumora (160). Stoga je potrebno istražiti koje su stanične i molekularne sastavnice zajedničke upalnim reakcijama povezanim sa svim vrstama tumorima te one karakteristične za svaki pojedini tip tumora.

Potreban je odgovor i na treće pitanje, na koji način usmjeriti upalu u „pozitivnom“ smjeru odnosno potaknuti odgovarajuću stečenu imunosnu reakciju na tumor. Istražuje se mogućnost genskog liječenja citokinima, odnosno imunoterapija koja dovodi do aktivacije prirodnog i stečenog imunosnog odgovora na tumor.

Posljednje i najvažnije pitanje trebalo bi dati odgovor na koji način bi se upala povezana s tumorom mogla iskoristiti za sprječavanje, dijagnozu i liječenje zloćudnih bolesti. Upotreba kombiniranog liječenja koje djeluje i na zloćudne stanice i na ostale stanice unutar tumora (npr. stanice upale) mogla bi biti učinkovitija te potaknuti dugoročnu stečenu imunost prema izmijenjenim stanicama. Lijekovi koji se koriste u liječenju zloćudnih tumora uključuju i antagoniste IL-6, IL-6 receptora i TNF- $\alpha$  (115).

Iako navedeni dokazi posredno upućuju da upala može uzrokovati nastanak zloćudnih tumora, neposredan dokaz se još uvijek traži.

### **Uloga IL-6 i TNF- $\alpha$ u karcinogenezi**

Pokazano je da u linijama stanica karcinoma pluća primjena inhibitora tirozin kinaznog dijela receptora epidermalnog čimbenika rasta (*engl.* Epidermal Growth Factor Receptor - EGFR) uzrokuje apoptozu stanica karcinoma. Istovremeno se povisuje razina IL-6 koji djeluje kao autokrini čimbenik rasta fibroblasta što uzrokuje stvaranje kolagena i fibroze. Stoga se smatra da bi blokiranje signalnog puta IL-6 moglo dovesti do smanjenja popratnih učinaka u bolesnika liječenih inhibitorom tirozin kinaze EGFR (183). Fosforilirani STAT3 signalni put se pokazao pretjerano aktivnim u linijama stanica s aktivnim mutacijama tirozin kinazne domene EGFR. Ove linije stanica pojačano proizvode IL-6 što dovodi do povećanja fosforiliranog STAT3 koji je važan posrednik učinaka IL-6 (184). Studija Kima i sur. je pokazala mogućnost da je razina citokina i čimbenika rasta, uključujući IL-6 i TNF- $\alpha$ , povišena u moždanim metastazama karcinoma pluća malih stanica te da imaju ulogu u preživljenju stanica tumora (185).

Nadalje, pokazano je da IL-6 može aktivirati glutation, molekulu odgovornu za zaštitu stanica od oštećenja slobodnim radikalima. Ovaj mehanizam pomaže stanicama tumora da izbjegnu apoptozu. Povišene razine hormona povezanih sa stresom, kortikosterona, noradrenalinaa i adenokortikotropnog hormona, dovode do povišene razine IL-6 i posljedično razvoja metastaza melanoma (186).

Apoptoza posredovana s TNF- $\alpha$  je također povezana sa stvaranjem ROS-a. Pokazano je da NF- $\kappa$ B inducira enzime, kao što je superoksid dismutaza, koji neutraliziraju ROS (187). Prema tome, indukcija ROS-a ili inhibicija NF- $\kappa$ B signalnog puta mogla bi biti uspješna u pojačavanju osjetljivosti stanica tumora na apoptozu potaknutu s TNF- $\alpha$  (188).

### **IL-6 u serumu oboljelih od karcinoma usne šupljine**

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da je koncentracija IL-6 u serumu bila statistički značajno viša u oboljelih od karcinoma usne šupljine u odnosu na zdrave ispitanike što je u skladu s rezultatima drugih autora (111,113,115,119,121,189,190). Postoje i oprečni podaci (191-193) moguće uzrokovani upotrebom različitih metoda istraživanja. U istraživanju Anderssona i sur. (191) oboljeli od karcinoma glave i vrata razlikovali su se po dobi i spolu u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih ispitanika. Isto tako, u istraživanju Vučićević Boras i sur. (193) postoji nesrazmjer ispitanika i kontrole u odnosu na dob. Oboljeli od OC bili su srednje dobi 55 godina, a osobe kontrolne skupine 25 godina. U istraživanju Czerninske i sur. (192) u kontrolnu su skupinu, osim zdravih ispitanika, uvrštene i osobe s potencijalno zloćudnim lezijama (displazijom i oralnim lihen planusom). U našem su istraživanju svi kontrolni ispitanici bili zdravi. Ovakve razlike u dizajniranju istraživanja mogle su pridonijeti različitim rezultatima.

Prema svemu navedenom, ipak se čini da bi se razina IL-6 u serumu bolesnika mogla koristiti kao biljeg prognoze bolesti.

### **IL-6 u serumu, recidiv bolesti i preživljenje bolesnika.**

Prema rezultatima ovog istraživanja povišena koncentracija IL-6 u serumu predstavlja nezavisni čimbenik rizika za recidiv OC, ali ne i za preživljenje bolesnika. Povezanost IL-6 u serumu i recidiva tumora glave i vrata pokazali su i Duffy i suradnici u prospektivnoj studiji na 444 ispitanika (119). Osim toga u njihovom se istraživanju koncentracija IL-6 u serumu pokazala čimbenikom rizika preživljenja bolesnika, što u ovom istraživanju nije pokazano. Razlog tome može biti mali broj bolesnika obuhvaćenih studijom. Tome u prilog govori i nalaz Allena i sur.; u studiji provedenoj na 30 bolesnika s uznapredovalim orofaringealnim karcinomom pokazali su da koncentracija IL-6 u serumu prije liječenja nije bila statistički značajan čimbenik rizika za preživljenje bolesnika (194). Međutim, longitudinalni porast IL-6 u serumu tijekom mjeseci nakon liječenja bio je značajno povezan sa smanjenim

preživljenjem bolesnika. U studiju ovih autora bili su uključeni samo bolesnici sa stadijem tumora 3 i 4 te oni liječeni samo kemoterapijom i zračenjem. Suprotno ovom nalazu Druzgal i sur. nisu utvrdili statistički značajnu povezanost u longitudinalnoj promjeni koncentracije IL-6 u serumu nakon liječenja s recidivom bolesti i preživljenjem oboljelih od karcinoma glave i vrata (113).

### **Recidiv bolesti i pušenje.**

U skupini nepušača recidiv se, unutar dvije godine, pojavio u 30 %, a u skupini pušača u 53,8 % bolesnika. Iako ovi podatci nisu statistički značajno različiti poznato je da nastavak pušenja tijekom bolesti povećava rizik pojave recidiva (195). Isto tako je pokazano da se u zdravih osoba koje prestanu pušiti rizik pojave OC nakon 10 godina izjednačava s rizikom pojave u nepušača. Pad rizika u tako relativno kratkom roku upućuje na činjenicu da su karcinogeni iz duhanskog dima uključeni u kasnije stadije oralne karcinogeneze (196). Nažalost, u ovom radu podatci o prekidu ili nastavku pušenja nisu bili dostupni tako da je pravi uzrok visokog postotka recidiva nerazjašnjen. Moguće da se radi o različitom sustavu zdravstvene skrbi za bolesnike u odnosu na one u SAD gdje je zabilježen niži stupanj recidiva (119), dužem čekanju na liječenje zračenjem, slabijem potpornom liječenju zbog kojeg se često prekida liječenje zračenjem te općenito niskoj motivaciji i pojačanom stresu bolesnika.

### **IL-6 i liječenje.**

Povišena vrijednost IL-6 u serumu prije liječenja bolesnika s karcinomom glave i vrata povezana je s lošijom lokalnom kontrolom bolesti kao najvažnijim parametrom prosudbe odgovora na liječenje zračenjem (197). Takvi bolesnici imaju i veću šansu za recidiv bolesti i smanjenu stopu preživljenja. Slično je pokazano i u studiji na 237 bolesnika s OC (198). Povišene vrijednosti IL-6 prije liječenja ukazuju na lošiju prognozu bolesti odnosno petogodišnje preživljenje nevezano s vrstom liječenja. Slično su pokazali i Hao i sur. za oboljele od planocelularnog karcinoma larinksa (199). Stoga se IL-6 u serumu može smatrati nezavisnim prognostičkim čimbenikom preživljenja OC-bolesnika.

Povišene koncentracije IL-6 u serumu oboljelih od OC govore u prilog postojanju sustavnog upalnog odgovora u procesu karcinogeneze. Također, i stanice tumora mogu pojačano izlučivati proupalne citokine kao što je npr. IL-6 (200). Citokini reagiraju s imunološkim i krvožilnim sustavom te potiču rast, invaziju i metastaziranje stanica tumora (201). Mehanizam kojim IL-6 u serumu pridonosi ponašanju i širenju tumora odvija se, najvjerojatnije, njegovim dvostrukim, autokrinim i parakrinim, djelovanjem te dodatnim inhibitornim djelovanjem na imunosti odgovor domaćina na tumor (202,203). IL-6 inhibira diferencijaciju dendritičnih stanica aktivacijom STAT3. Time se potiče imunosti tolerancija na tumor i omogućava njegovo metastaziranje (204). Od svih članova obitelji STAT, STAT3 je najčešće povezan s neoplazmama te ima značajan utjecaj na razvoj karcinoma glave i vrata. Suprotno, inhibicija funkcije STAT3 usporava rast tumora (205). Sriuranpong i sur. (203) su pokazali da se IL-6 posredovana aktivacija STAT3 u karcinomu glave i vrata događa putem autokrine/parakrine stimulacije gp130 receptora i neovisna je o aktivaciji receptora epidermalnog čimbenika rasta. Ovi podatci podupiru tezu da prekid IL-6/gp130 signalnog puta sprječava aktivaciju STAT3 te bi mogao poslužiti kao meta liječenja oboljelih od karcinoma glave i vrata. Takvim bi se načinom liječenja mogao smanjiti rast tumora i sazrijevanje dendritičnih stanica i imunološkog prepoznavanja tumora (119).

Također, povećana ekspresija signalnog G proteina RhoC predstavlja obilježje agresivnih i metastatskih tumora. Povišena ekspresija navedenog proteina u planocelularnom karcinomu glave i vrata pozitivno je povezana s razvojem metastaza u limfnim čvorovima (206). Nedavno istraživanje na linijama stanica karcinoma glave i vrata pokazalo je značajno nižu ekspresiju IL-6 i niži stupanj fosforilacije STAT3 u stanicama bez RhoC u odnosu na kontrolne stanice. Ovaj rezultat upućuje da bi RhoC mogao biti nova meta u liječenju bolesnika s karcinomom glave i vrata (207).

### **IL-6 u slini, recidiv bolesti i preživljenje bolesnika**

Koncentracija IL-6 u slini oboljelih od OC bila je statistički značajno viša nego koncentracija IL-6 u slini zdravih ispitanika. Ovaj rezultat u skladu je s rezultatima drugih studija (122,134,135,208) što ukazuje na poremećaj lokalnog imunosti odgovora u oboljelih od OC. Međutim, u ovom je istraživanju koncentracija IL-6 u slini bila nezavisni čimbenik rizika za recidiv bolesti na način da je niža koncentracija bila povezana s većim rizikom recidiva. S druge strane, koncentracija IL-6 u slini nije utjecala na preživljenje bolesnika oboljelih od OC

Sato i sur. (122) su izvijestili da je koncentracija IL-6 u slini nakon liječenja bila statistički značajno viša u bolesnika koji su kasnije razvili lokoregionalni recidiv tumora, dok koncentracija IL-6 u slini prije liječenja nije utjecala na lokoregionalni recidiv. Razlike u rezultatima moguće je objasniti različitim načinom prikupljanja sline. Stimulirana (Sato i suradnici) nasuprot nestimulirana (ovo istraživanje). Sakupljanje sline je proces koji još uvijek u svijetu nije standardiziran, a količina i sastav sline podložni su utjecajima različitih čimbenika kao što su količina popijene tekućine, pozicija tijela, izloženost svjetlu, prethodna stimulacija, dnevne i godišnje varijacije, lijekovi, dob, tjelesna težina, mentalno stanje (209). Bolesnici oboljeli od OC najčešće imaju lošu oralnu higijenu, pridruženu kandidijazu, dehidriranu sluznicu kao posljedicu konzumiranja alkohola i pušenja te općenito nisku razinu svijesti o oralnom zdravlju. Isključivanje svih navedenih mogućih uzroka različitog sastava sline kod pojedinog bolesnika i jednoobrazan odabir ispitanika nije moguć. Stoga bi ovaj rezultat povišene razine IL-6 trebalo uzeti s rezervom te u budućnosti, ukoliko će stanje bolesnika to omogućiti, pokušati što bolje standardizirati prikupljanje sline kao bi se izbjegli artefakti.

### **TNF- $\alpha$ u serumu, recidiv bolesti i preživljenje bolesnika**

Koncentracija TNF- $\alpha$  u serumu nije se statistički značajno razlikovala između oboljelih od OC i zdravih ispitanika kao što su izvijestili i drugi autori (189,210) niti je bila čimbenik rizika za recidiv bolesti i preživljenje bolesnika. Linkov i sur. (210) su također izvijestili da se koncentracije TNF- $\alpha$  u serumu nisu razlikovale između oboljelih od karcinoma glave i vrata kojima je koncentracija mjerena prije liječenja i skupine bolesnika koji su tri godine bili bez znakova recidiva bolesti. Navedeni rezultat je u skladu s rezultatom ovog istraživanja. Međutim, postoje i suprotni nalazi; povišene vrijednosti TNF- $\alpha$  i C-reaktivnog proteina u plazmi utječu na smanjenje preživljenja oboljelih od karcinoma glave i vrata (191), a povezane su s lošijom prognozom oboljelih od nazofaringealnog karcinoma (211,212).

### **TNF- $\alpha$ u slini, recidiv bolesti i preživljenje bolesnika**

Koncentracija TNF- $\alpha$  u slini nije se statistički značajno razlikovala u skupini oboljelih od OC u odnosu na zdrave ispitanike što su pokazali i drugi autori (208) niti se pokazala kao statistički značajan čimbenik rizika za recidiv bolesti i vjerojatnost preživljenja bolesnika.

Suprotno tome u jednoj su studiji nađene povišene vrijednosti TNF- $\alpha$  u slini bolesnika s OC i displastičnim lihenom usne šupljine (213).

Nedavna studija je pokazala povišene vrijednosti TNF- $\alpha$  u serumu i slini bolesnika s OC u odnosu na zdrave ispitanike i osobe s potencijalno zloćudnim lezijama. Također su pokazane više vrijednosti TNF- $\alpha$  u histološki slabo diferenciranim i nediferenciranim lezijama OC i u bolesnika sa stadijem 4 tumora u odnosu na bolesnike s nižim stadijima što upućuje na ulogu TNF- $\alpha$  u prognozi bolesti (214).

Vežanjem na receptor TNF-R1, TNF- $\alpha$  djeluje na dva signalna puta koji uzrokuju ili preživljenje i proliferaciju stanica ili apoptozu. Put preživljenja stanica zbiva se aktivacijom cFos/cJun čimbenika transkripcije i aktivacijom NF- $\kappa$ B koji zajedno potiču protuapoptotičke, proliferativne, imunomodulatorne i upalne gene. Put apoptoze zbiva se pomoću DD domene receptora koja se veže za prokaspazu-8 što uzrokuje kaskadnu aktivaciju niza proteina koji konačno pokreću apoptozu. Pojedinačni putevi djelovanja TNF- $\alpha$  jasno su razjašnjeni, dok je mehanizam regulacije održavanja ravnoteže između ta dva puta nerazjašnjen (215). S obzirom na složenost djelovanja TNF- $\alpha$ , različiti rezultati dobiveni u ovoj i drugim navedenim studijama nisu neočekivani.

### **Dob, spol, pušenje, pridruženi komorbiditeti, zahvaćenost limfnih čvorova, recidiv bolesti i preživljenje bolesnika**

Sve navedene varijable nisu identificirane kao statistički značajan čimbenik rizika niti za recidiv bolesti niti za preživljenje bolesnika iako su neke od njih utjecale na razlike u koncentracijama promatranih citokina.

Iako spol nije utjecao na recidiv tumora i preživljenje oboljelih što je u skladu s rezultatima drugih studija (119,122), IL-6 i TNF- $\alpha$  u serumu su bili povišeni u muškaraca dok je TNF- $\alpha$  bio viši u pušača nego nepušača. Povišene vrijednosti IL-6 i TNF- $\alpha$  u serumu pronađene su u zdravih pušača u odnosu na zdrave nepušače, a povišene vrijednosti TNF- $\alpha$  i u serumu bolesnika s parodontitisom u odnosu na osobe bez parodontitisa (216). U ovoj studiji nije bilo statistički značajno više pušača među muškarcima u odnosu na žene. Također nije bilo statistički značajne razlike u zdravlju parodonta mjerene CPITN indeksom između muškaraca i žena te između bolesnika i kontrola (podaci nisu prikazani). Stoga se pušenje i parodontna



bolest kao potencijalni uzrok različitih koncentracija IL-6 i TNF- $\alpha$  u serumu među spolovima mogu isključiti. Povišene vrijednosti IL-6 i TNF- $\alpha$  u serumu muškaraca u ovom istraživanju mogu se objasniti značajno većim udjelom muškaraca u odnosu na žene. Ovaj rezultat mora se potvrditi ili opovrgnuti u budućoj studiji koja bi obuhvatila približno jednak broj muškaraca i žena.

Dob oboljelih nije se pokazala kao statistički značajan čimbenik rizika za recidiv bolesti i preživljenje bolesnika. Ovakav rezultat dobili su i drugi autori (122) dok su Duffy i sur. (119) pokazali da je koncentracija IL-6 u serumu bila viša u starijih nego u mlađih osoba te da je dob bila značajan čimbenik rizika za preživljenje bolesnika. Iako se dob oboljelih u ovom istraživanju nije pokazala kao nezavisni čimbenik rizika niti za recidiv bolesti niti za preživljenje, vrijedi istaknuti da su u skupini oboljelih koji su razvili udaljene metastaze ispitanici bili statistički značajno mlađi (medijan 53 godine naspram medijana od 61 godine). Ovakav rezultat potvrđuje činjenicu da je OC agresivniji u mlađih osoba (8) i zahtijeva provjeru u daljnjim studijama s većim brojem ispitanika.

Stadij bolesti nije u ovom istraživanju identificiran kao statistički značajan čimbenik rizika ni za recidiv bolesti niti za preživljenje oboljelih od OC. Ovakav rezultat dobili su Duffy i sur. (119) dok su Mojtahedi i sur. (121) izvijestili da oboljeli od karcinoma glave i vrata višeg stadija (stadij 4) imaju povišene vrijednosti IL-6 u serumu u odnosu na oboljele u nižim stadijima (stadiji 1, 2 i 3) bolesti. S obzirom da postoji povezanost između polimorfizma gena za IL-6 i rizika za nastanak karcinoma, te bi se varijacije mogle objasniti razlikama u postotku recidiva bolesti i preživljenju bolesnika sa sličnim stadijem tumora. Pokazano je da polimorfizmi pojedinačnih nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphisms*- SNP) u genima za proupalne citokine mogu mijenjati njihovu ekspresiju i funkciju. G/C SNP u promotorskoj regiji gena za IL-6 utječe na transkripciju i mijenja razinu IL-6 u plazmi (217).

Koncentracije IL-6 i TNF- $\alpha$  u slini i serumu bolesnika nisu se razlikovale u odnosu na smještaj tumora. Unatoč tome, smještaj tumora se pokazao kao nezavisni čimbenik rizika i za recidiv bolesti i za preživljenje oboljelih od OC. Tumori koji zahvaćaju prednji i stražnji dio usne šupljine imali su najlošiju prognozu. Bolesnici iz te skupine imali su zahvaćeno dno usne šupljine i bazu jezika što govori u prilog da tumori smješteni u tim regijama brže

metastaziraju i općenito su agresivniji što se može objasniti različitom limfnom drenažom navedenih područja (96). Općenito se limfa iz stražnjih dijelova usne šupljine drenira u donje vratne limfne čvorove. Zahvaćenost tih čvorova povezana je s lošijom prognozom oboljelih od OC (97).

Smještaj tumora se pokazao kao statistički značajan čimbenik rizika preživljenja oboljelih od karcinoma glave i vrata i u studiji Duffy i suradnika (119).

Način liječenja se pokazao kao značajan čimbenik rizika za recidiv bolesti i za preživljenje bolesnika oboljelih od OC. Bolesnici liječeni samo kemoterapijom i radioterapijom, bez kirurškog zahvata, imali su lošiju prognozu bolesti. Iako se liječenje određuje prema stadiju bolesti, različiti se oblici liječenja mogu primijeniti za liječenje bolesnika s istim stadijem tumora. Čimbenici kao što su smještaj tumora, probijanje kapsule limfnog čvora, opće stanje bolesnika, itd. utječu na odluku o načinu liječenja. Bolesnici liječeni kemoradioterapijom su imali tumore smještene u stražnjim regijama što je moglo utjecati na prognozu bolesti. Međutim, kako je u toj skupini bilo samo tri bolesnika (dvoje s tumorom stadija 3 i jedan sa stadijem tumora 4), ovaj nalaz treba uzeti s rezervom.

Pušenje cigareta, prisutni komorbiditeti i zahvaćenost limfnih čvorova nisu se pokazali kao značajni čimbenici rizika niti za recidiv karcinoma usne šupljine niti za preživljenje oboljelih što je u suprotnosti s rezultatima Duffy i suradnika (119). Unatoč navedenom, pušači, koji su rizična skupina za nastanak karcinoma usne šupljine, imali su statistički značajno više vrijednosti TNF- $\alpha$  u serumu od nepušača što su utvrdili i drugi autori u osoba s parodontitisom i zdravih ispitanika (216,218). Ovaj rezultat upućuje na postojanje sustavnog upalnog odgovora na sastojke duhanskog dima u pušača. Iako točan mehanizam nije razjašnjen, literaturni podaci ukazuju na povećanu sintezu proupalnih medijatora reguliranih putem Nf- $\kappa$ B čimbenika transkripcije (219).

U oboljelih od OC bez pridruženih komorbiditeta utvrđene su više vrijednosti TNF- $\alpha$  u serumu u odnosu na bolesnike s pridruženim komorbiditetima. Ovaj rezultat mogao bi biti artefakt ili pak odražavati složene i sustavne imunološke interakcije (220).

Temeljem rezultata ovog istraživanja može se zaključiti da u bolesnika s OC postoji sustavni upalni odgovor koji utječe na pojavu recidiva bolesti. Od promatranih citokina jedino IL-6 u serumu ispitivanih bolesnika utječe na recidiv bolesti. TNF- $\alpha$ , najvjerojatnije zbog svojeg složenog dvostrukog djelovanja, ne utječe na ishod bolesti. Stoga bi bolesnici s povišenom koncentracijom IL-6 u serumu mogli imati koristi od učestalijeg praćenja u svrhu ranijeg otkrivanja recidiva bolesti.

## **6. ZAKLJUČCI**

1. Porast koncentracije IL-6 u serumu prije liječenja povezan je s povećanim rizikom za recidiv bolesti.
2. Porast koncentracije IL-6 u slini prije liječenja povezan je sa smanjenjem rizika za recidiv bolesti. Ovaj rezultat treba uzeti s rezervom budući da utjecaj čimbenika kao što su oralna higijena, infekcija kandidom albicans, dehidracija sluznice, konzumiranje alkohola i pušenje na sastav sline i koncentraciju proupalnih citokina nije još sasvim poznat.
3. Razina TNF- $\alpha$  u serumu i slini prije liječenja nije povezana s rizikom recidiva tumora.
4. Koncentracije IL-6 i TNF- $\alpha$  u serumu i slini prije liječenja nisu povezane s dužinom preživljenja bolesnika oboljelih od karcinoma usne šupljine.
5. Rezultati ukazuju da analiza IL-6 u serumu prije liječenja bolesnika oboljelih od OC pokazuje potencijal za korištenje u svrhu individualizacije praćenja svakog pojedinog bolesnika.

## **7. LITERATURA**

1. World Health Organization (2010) ICD-10 Version. Dostupno na: <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2010/en#/C00-C14>
2. Shah JP, Johnson NW, Batsakis JG (2003) Oral Cancer. MD Martin Dunitz Taylor & Francis Group 20-32, 77-128.
3. Ferlay J, Shin HR, Bray F i sur. (2010) GLOBOCAN 2008 vol. 2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No.10 [Internet].Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2010. Dostupno na: <http://globocan.iarc.fr>.
4. Scully C, Bagan J (2009) Oral squamous cell carcinoma overview.Oral Oncol 45:301-8.
5. Hrvatski zavod za javno zdravstvo (2011) Registar za rak. Incidencija raka u Hrvatskoj 2011. Dostupno na: [http://hzjz.hr/wp-content/uploads/2013/11/rak\\_2011.pdf](http://hzjz.hr/wp-content/uploads/2013/11/rak_2011.pdf)
6. Epstein JB. Rak usne šupljine. U: Greenberg D, Glick M, ur. Burketova oralna medicina dijagnoza i liječenje. 10. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2006:194-234.
7. Kademani D (2007) Oral cancer. Mayo Clinic Proc 82:878-87.
8. Llewellyn CD, Linklater K, Bell J, Johnson NW, Warnakulasuriya KA (2001) Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people- a comprehensive literature review. Oral Oncol 37:401-18.
9. Ries L, Harkins D, Krapcho M i sur., ur. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2003. Bethesda, MD: National Cancer Institute. Dostupno na: [http://seer.cancer.gov/archive/csr/1975\\_2003/](http://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2003/)
10. Boyle P, Zheng T, Macfarlane GJ i sur. (1990) Recent advances in the etiology and epidemiology of head and neck cancer. Curr Opin Oncol 2:539-45.
11. Feldman JG, Hazan M, Nagarajan M, Kissin B (1975) A case-control investigation of alcohol, tobacco, and diet in head and neck cancer. Prev Med 4:444-63.
12. Mashberg A, Garfinkel L, Harris S (1981) Alcohol as a primary risk factor in oral squamous carcinoma. CA Cancer J Clin 31:146-55.
13. Johnston WD, Ballantyne AJ (1977) Prognostic effect of tobacco and alcohol use in patients with oral tongue cancer. Am J Surg 134:444-7.
14. Kissin B, Kaley MM, Su WH, Lerner R (1973) Head and neck cancer in alcoholics: the relationship to drinking, smoking and dietary patterns. JAMA 224:1174-5.
15. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM i sur. (1988) Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. Cancer Res 48:3282-7.

16. Lewin F, Norell SE, Johansson H i sur. (1998) Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck: a population-based case referent study in Sweden. *Cancer* 82:1367-75.
17. Petti S, Masood M, Messano GA, Scully C (2013) Alcohol is not a risk factor for oral cancer in nonsmoking, betel quid non-chewing individuals. A meta-analysis update. *Ann Ig* 25:3-14.
18. Bouvard V, Baan R, Straif K i sur. (2009) A review of human carcinogenesis - part B: biological agents. *Lancet Oncol* 10:321-2.
19. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S (2005) Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:467-75.
20. Miller CS, Johnstone BM (2001) Human papilloma virus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 91:622-35.
21. Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM i sur. (2011) Human papilloma virus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol* 29:4294-301.
22. Kian Ang K, Harris J, Wheeler R sur. (2010) Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 363:24-35.
23. Dayyani F, Etzel CJ, Liu M i sur. (2010) Meta-analysis of the impact of human papilloma virus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Head Neck Oncol* 2:15.
24. Fakhry C, Westra WH, Li S i sur. (2008) Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst* 100:261-9.
25. Ragin CC, Taioli E (2007) Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: a review and meta-analysis. *Int J Cancer* 121:1813-20.
26. Nola-Fuchs P, Boras VV, Plecko V i sur. (2012) The prevalence of human papilloma virus 16 and Epstein-Barr virus in patients with oral squamous cell carcinoma. *Acta Clin Croat* 51:609-14.
27. Chocolatewala N, Chaturvedi P, Desale R (2010) The role of bacteria in oral cancer. *Indian J Med Paediatr Oncol* 31:126-31.
28. Scully C (2002) Oral squamous cell carcinoma; from an hypothesis about a virus, to concern about possible sexual transmission. *Oral Oncol* 38:227-34.



29. Cawson RA (1969) Leukoplakia and oral cancer. *Proc R Soc Med* 62:610-14.
30. Lissowska J, Pilarska A, Pilarski P i sur. (2003) Smoking, alcohol, diet, dentition and sexual practices in the epidemiology of oral cancer in Poland. *Eur J Cancer Prev* 12:25-33.
31. Correa P, Miller MJ (1998) Carcinogenesis, apoptosis and cell proliferation. *Br Med Bull* 54:151-62.
32. Littman AJ, White E, Jackson LA (2004) Chlamydia pneumoniae infection and risk of lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13:1624-30.
33. Cover TL, Krishna US, Israel DA, Peek RM Jr (2003) Induction of gastric epithelial cell apoptosis by Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin. *Cancer Res* 63:951-7.
34. Kramer IR, Lucas RB, Pindborg JJ, Sobin LH (1978) Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 46:518-39.
35. Axell T, Pindborg JJ, Smith CJ, van der Waal I (1996) Oral white lesions with special reference to precancerous and tobacco-related lesions: conclusions of an international symposium held in Upsala, Sweden, May 18-21 1994. International Collaborative Group on Oral White Lesions. *J Oral Pathol Med* 25:49-54.
36. Holmstrup P, Vedtofte P, Reibel J, Stoltze K (2006) Long-term treatment outcome of oral premalignant lesions. *Oral Oncol* 42:461-74.
37. Petti S (2003) Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. *Oral Oncol* 39:770-80.
38. Reibel J (2003) Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. *Crit Rev Oral Biol Med* 14:47-62.
39. Lončar Brzak B, Mravak-Stipetić M, Canjuga I i sur. (2012) The frequency and malignant transformation rate of oral lichen planus and leukoplakia. A retrospective study. *Coll Antropol* 36:773-7.
40. Napier SS, Speight PM (2008) Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. *J Oral Pathol Med* 37:1-10.
41. Shear M (1972) Erythroplakia of the mouth. *Int Dent J* 22:460-73.
42. Eisen D, Carrozzo M, Bagan SJV, Thongprasom K (2005) Number V Oral lichen planus: clinical features and management. *Oral Dis* 11:338-49.
43. Ismail SB, Kumar SK, Zain RB (2007) Oral lichen planus and lichenoid reactions: etiopathogenesis, diagnosis, management and malignant transformation. *J Oral Sci* 49:89-106.

44. Fang M, Zhang W, Chen Y, He Z (2009) Malignant transformation of oral lichen planus: a retrospective study of 23 cases. *Quintessence Int* 40:235-42.
45. Bornstein MM, Kalas L, Lemp S i sur (2006) Oral lichen planus and malignant transformation: a retrospective follow-up study of clinical and histopatologic data. *Quintessence Int* 37:261-71.
46. Trosko JE (2003) The role of stem cells and gap junctional intercellular communication in carcinogenesis. *J Biochem Mol Biol* 36:43-8.
47. Trosko JE (2001) Commentary: is the concept of „tumor promotion“ a useful paradigm? *Mol Carcinog* 30:131-37.
48. Williams GM (2001) Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. *Toxicology* 161:3-10.
49. Gomes-Carneiro MR, Ribeiro-Pinto LF, Paumgartten FJ (1997) Environmental risk factors for gastric cancer: the toxicologist's standpoint. *Cad Saúde Pública* 13(Suppl):27-38.
50. Butterworth BE, Popp JA, Connolly RB, Goldsworthy TL (1992) Chemically induced cell proliferation in carcinogenesis. *IARC Sci Publ* 116:279-305.
51. Oliveira PA, Colaco A, Chaves R, Guedes-Pinto H, De-La-Cruz LF, Lopes C (2007) Chemical carcinogenesis. *An Bras Acad Svi* 79:593-616.
52. Lutz WK (2000) A true treshold dose in chemical carcinogenesis cannot be defined for a population, irrespective of the mode of action. *Hum Exp Toxicol* 19:566-8.
53. Hawighorst T, Velasco P, Streit M i sur. (2001) Thrombospondin-2 plays a protective role in multistep carcinogenesis: a novel host anti-tumor defense mechanism. *EMBO J* 20:2631-40.
54. Cunningham FH, Fiebelkom S, Johnson M, Meredith C (2011) A novel application of the Margin of Exposure approach: segregation of tobacco smoke toxicants. *Food Chem Toxicol* 49:2921-33.
55. Kanavy HE, Gerstenblith MR (2011) Ultraviolet radiation and melanoma. *Semin Cutan Med Surg* 30:222-8.
56. Handa O, Naito Y, Yoshikawa T (2011) Redox biology and gastric carcinogenesis: The role of *Helicobacter pylori*. *Redox Rep* 16:1-7.
57. Smela ME, Hamm ML, Henderson PT, Harris CM, Harris TM, Essigmann JM (2002) The aflatoxin B(1) formamidopyrimidine adduct plays a major role in causing the types of mutations observed in human hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:6655-60.

58. Volinia S, Calin GA, Liu CG i sur. (2006) A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer genes targets. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:2257-61.
59. Lu J, Getz G, Miska EA i sur. (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435:834-8.
60. Bui TV, Mendell JT (2010) Myc: Maestro of MicroRNAs. *Genes Cancer* 1:568-75.
61. Chang TC, Yu D, Lee YS i sur. (2008) Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat Genet* 40:43-50.
62. Gao XN, Lin J, Li YH i sur. (2011) MicroRNA-193a represses c-kit expression and functions as a methylation-silenced tumor suppressor in acute myeloid leukemia. *Oncogene* 30:3416-28.
63. Ueda T, Volinia S, Okumura H i sur. (2010) Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: a microRNA expression analysis. *Lancet Oncol* 11:136-46.
64. Tavazoie SF, Alarcon C, Oskarsson T i sur. (2008) Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature* 451:147-52.
65. Davalos V, Moutinho C, Villanueva A i sur. (2012) Dynamic epigenetic regulation of the microRNA-200 family mediates epithelial and mesenchymal transition in human tumorigenesis. *Oncogene* 31:2062-74.
66. Fearon ER, Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61:759-67.
67. Scully C, Field J (1997) Genetic aberration in squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN), with reference to oral carcinoma (review). *Int J Oncol* 10:5-21.
68. Croce CM, Sozzi G, Huebner K (1999) Role of FHIT in human cancer. *J Clin Oncol* 17:1618-24.
69. Mao L, El-Naggar AK, Papadimitrakopoulou V i sur. (1998) Phenotype and genotype of advanced premalignant head and neck lesions after chemopreventive therapy. *J Natl Cancer Inst* 90:1545-51.
70. Uzawa N, Yoshida MA, Hosoe S i sur. (1998) Functional evidence for involvement of multiple putative tumor suppressor gene on the short arm of chromosome 3 in human oral squamous cell carcinogenesis. *Cancer Genet Cytogenet* 107:125-31.
71. Graveland AP, Bremmer JF, de Maaker M i sur. (2013) Molecular screening of oral precancer. *Oral Oncol* 49:1129-35.

72. Skorodumova LO, Muriaev AA, Volodina EV i sur. (2012) Molecular risk markers for malignant transformation of oral mucosal leukoplakia. *Vopr Onkol* 58:327-32.
73. Chen Z, Yan B, Van Waes C (2008) The role of the NF-kappaB transcriptome and proteome as biomarkers in human head and neck squamous cell carcinomas. *Biomark Med* 2:409-26.
74. Zhang PL, Pellitteri PK, Law A i sur. (2005) Overexpression of phosphorylated nuclear factor-kappa B in tonsillar squamous cell carcinoma and high-grade dysplasia is associated with poor prognosis. *Mod Pathol* 18:924-32.
75. Choudhari SK, Chaudhary M, Gadbail AR, Sharma A, Tekade S (2014) Oxidative and antioxidative mechanisms in oral cancer and precancer: A review. *Oral Oncol* 50:10-8.
76. Bose KS, Vyas P, Singh M (2012) Plasma non-enzymatic antioxidants-vitamin C, E, beta-carotenes, reduced glutathione levels and total antioxidant activity in oral sub mucous fibrosis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 16:530-2.
77. Korde SD, Basak A, Chaudhary M, Goyal M, Vagga A (2011) Enhanced nitrosative and oxidative stress with decreased total antioxidant capacity in patients with oral precancer and oral squamous cell carcinoma. *Oncology* 80:382-9.
78. Rasheed MH, Beevi SS, Geetha A (2007) Enhanced lipid peroxidation and nitric oxide products with deranged antioxidant status in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 43:333-8.
79. Trueba GP, Sanchez GM, Giuliani A (2004) Oxygen free radical and antioxidant defence mechanism in cancer. *Front Biosci* 9:2029-44.
80. Trachootam D, Lu W, Ogasawa MA, Nilsa RD, Huang P (2008) Redox regulation of cell survival. *Antiox Redox Signal* 10:1343-74.
81. Kwok WK, Ling MT, Lee TW i sur. (2005) Up-regulation of TWIST in prostate cancer and its implication as a therapeutic target. *Cancer Res* 65:5153-62.
82. Hosono S, Kajiyama H, Terauchi M (2007) Expression of Twist increases the risk for recurrence and for poor survival in epithelial ovarian carcinoma patients. *Br J Cancer* 96:314-20.
83. Ou DL, Chien HF, Chen CL, Lin TC, Lin LI (2008) Role of TWIST in head and neck carcinoma with lymph node metastasis. *Anticancer Res* 28:1355-9.
84. Yang MH, Wu MZ, Chiou SH i sur. (2008) Direct regulation of TWIST by HIF-1 alpha promotes metastasis. *Nat Cell Biol* 10:295-305.

85. Yu L, Mu Y, Sa N, Wang H, Xu W (2014) Tumor necrosis factor  $\alpha$  induces epithelial-mesenchymal transition and promotes metastasis via NF- $\kappa$ B signaling pathway-mediated TWIST expression in hypopharyngeal cancer. *Oncol Rep* 31:321-7.
86. Yang J, Mani SA, Donaher JL i sur. (2004) Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117:927-39.
87. Scully C, Bedi R (2000) Ethnicity and oral cancer. *Lancet Oncol* 1:37-42.
88. American Joint Committee on Cancer (1992) Manual for staging of cancer. 4th ed. Philadelphia: J.B. Lippincott 27-52.
89. Vissink A, Burlage FR, Spijkervet FK, Jansma J, Coppes RP (2003) Prevention and treatment of the consequences of head and neck radiotherapy. *Crit Rev Oral Biol Med* 14:213-25.
90. Wang B, Zhang S, Yue K i sur. (2013) The recurrence and survival of oral squamous cell carcinoma: a report of 275 cases. *Chinese J Cancer* 32:614-8.
91. Bauman JE, Ferris RL (2014) Integrating novel therapeutic monoclonal antibodies into the menagement of head and neck cancer. *Cancer* 120:624-32.
92. Tsien CI, Nyati MK, Ahsan A i sur. (2013) Effect of erlotinib on epidermal growth factor receptor and downstream signaling in oral cavity squamous cell carcinoma. *Head Neck* 35:1323-30.
93. Martins RG, Parvathaneni U, Bauman JE (2013) Cisplatin and radiotherapy with or without erlotinib in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: a randomized phase II trial. *J Clin Oncol* 31:1415-21.
94. Zhang SW, Xiao SW, Liu CQ i sur. (2005) Recombinant adenovirus-p53 gene therapy combined with radiotherapy for head and neck squamous-cell carcinoma. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 27:426-8.
95. Woolgar JA, Rogers S, West CR i sur. (1999) Survival and patterns of reccurence in 200 oral cancer patients treated by radical surgery and neck dissection. *Oral Oncol* 35:257-65.
96. Woolgar JA (2006) Histopathological prognosticators in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 42:229-39.
97. Omar EA (2013) The outline of prognosis and new advances in diagnosis of oral squamous cell carcinoma (OSCC): Review of the literature. *J Oral Oncol* 2013:1-13.
98. Keski-Säntti H, Atula T, Törnwall J, Koivunen P, Mäkitie A (2006) Elective neck treatment versus observation in patients with T1/T2 N0 squamous cell carcinoma of oral tongue. *Oral Oncol* 42:96-101.

99. Giacomara V, Tirelli G, Papanikolla L i sur. (1999) Predictive factors of nodal metastasis in oral cavity and oropharynx carcinomas. *Laryngoscope* 109:795-9.
100. Thomas B, Stedman M, Davies L (2014) Grade as a prognostic factor in oral squamous cell carcinoma: A population-based analysis of the data. *Laryngoscope* 124:688-94.
101. Bier-Laning CM, Durazo-Arvizu R, Muzaffar K, Petruzzelli GJ (2009) Primary tumor thickness as a risk factor for contralateral cervical metastases in T1/T2 oral tongue squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 119:883-8.
102. Fukano H, Matsuura H, Hasegawa Y, Nakamura S (1997) Depth of invasion as a predictive factor for cervical lymph node metastasis in tongue carcinoma. *Head Neck* 19:205-10.
103. Lwin CT, Hanlon R, Lowe D i sur. (2012) Accuracy of MRI in prediction of tumour thickness and nodal stage in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 48:149-54.
104. Urist MM, O'Brien CJ, Soong SJ, Visscher DW, Maddox WA (1987) Squamous cell carcinoma of the buccal mucosa: analysis of prognostic factors. *Am J Surg* 154:411-4.
105. Sharma M, Sah P, Sharma SS, Radhakrishnan R (2013) Molecular changes in invasive front of oral cancer. *J Oral Maxillofac Pathol* 17:240-7.
106. Calhoun KH, Fulmer P, Weiss R, Hokanson JA (1994) Distant metastases from head and neck squamous cell carcinomas. *Laryngoscope* 104:1199-205.
107. Camisasca DR, Silami MA, Honorato J i sur. (2011) Oral squamous cell carcinoma clinicopathological features in patients with and without recurrence. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 73:170-6.
108. Vázquez-Mahía I, Seoane J, Varela-Centelles P i sur. (2012) Predictors for tumor recurrence after primary definitive surgery for oral cancer. *J Oral Maxillofac Surg* 70:1724-32.
109. Lindenblatt Rde C, Martinez GL, Silva LE i sur. (2012) Oral squamous cell carcinoma grading systems -analysis of the best survival predictor. *J Oral Pathol Med* 41:34-9.
110. Schaaïj-Visser TBM, Graveland AP, Gauci S i sur. (2009) Differential proteomics identifies protein biomarkers that predict local relapse of head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res* 15:7666-75.
111. Chen Z, Malhotra PS, Thomas GR i sur. (1999) Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 5:1369-79.
112. Dong G, Chen Z, Li ZY i sur. (2001) Hepatocyte growth factor/scatter factor-induced activation of MEK and PI3K signal pathways contributes to expression of proangiogenic

cytokines interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 61:5911-8.

113. Druzgal CH, Chen Z, Yeh NT i sur. (2005) A pilot study of longitudinal serum cytokine and angiogenesis factor levels as markers of therapeutic response and survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 27:771-84.

114. Gokhale AS, Haddad RI, Cavacini L i sur. (2005) Serum concentrations of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and epidermal growth factor receptor in patients with squamous cell cancer of the head and neck. *Oral Oncol* 41:70-6.

115. Riedel F, Zaiss I, Herzog D i sur. (2005) Serum levels of interleukin-6 in patients with primary head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 25:2761-5.

116. Riedel F, Gotte K, Schwalb J i sur. (2000) Serum levels of vascular endothelial growth factor in patients with head and neck cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 257:332-6.

117. Shkeir O, Athanassiou-Papaefthymiou M, Lapadatescu M i sur. (2013) In vitro cytokine release profile: predictive value for metastatic potential in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck* 35:1542-50.

118. Teknos TN, Cox C, Yoo S i sur. (2002) Elevated serum vascular endothelial growth factor and decreased survival in advanced laryngeal carcinoma. *Head Neck* 24:1004-11.

119. Duffy SA, Taylor JMG, Terrel JE i sur. (2008) Interleukin-6 predicts recurrence and survival among head and neck cancer patients. *Cancer* 113:750-7.

120. Heikkilä K, Ebrahim S, Lawrol DA (2008) Systematic review of the association between circulating interleukin-6 (IL-6) and cancer. *Eur J Cancer* 44:937-45.

121. Mojtahedi Z, Khademi B, Hashemo SB i sur. (2011) Serum interleukine-6 concentration, but not interleukine-18 is associated with head and neck squamous cell carcinoma progression. *Pathol Oncol Res* 17:7-10.

122. Sato J, Ohuchi M, Abe K sur. (2013) Correlation between salivary interleukin-6 levels and early locoregional recurrence in patients with oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* 35:889-94.

123. Lippitz BE (2013) Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. *Lancet Oncol* 14:e218-28.

124. Cordingley FT, Bianchi A, Hoffbrand AA i sur. (1988) Tumor necrosis factor as an autocrine tumor growth factor for chronic B cell malignancies. *Lancet* 1:969-71.

125. Hendrayani SF, Al-Khalal HH, Aboussekhra A (2014) The Cytokine IL-6 Reactivates Breast Stromal Fibroblasts through Transcription Factor STAT3-dependent Up-regulation of the RNA Binding Protein AUF1. *J Biol Chem* 289:30962-76.

126. Ataie-Kachoie P, Pourgholami MH, Richardson DR, Morris DL (2014) Gene of the month: Interleukin 6 (IL-6). *J Clin Pathol* 67:932-7.
127. Taniguchi K, Karin M (2014). IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer. *Semin Immunol* 26:54-74.
128. Yao X, Huang J, Zhong H i sur. (2014) Targeting interleukin-6 in inflammatory autoimmune diseases and cancers. *Pharmacol Ther* 2014;141:125-39.
129. Calabrese LH, Rose-John S. IL-6 biology: implications for clinical targeting in rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol*. 2014 Aug 19. doi: 10.1038/nrrheum.2014.127. [Epub ahead of print]
130. Oka M, Yamamoto K, Takahashi M i sur. (1996) Relationship between serum levels of interleukin 6, various disease parameters and malnutrition in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 56:2776-2780.
131. Jang JS, Choi SR, Han SY i sur. (2009) Predictive significance of serum IL-6, VEGF, and CRP in gastric adenoma and mucosal carcinoma before endoscopic submucosal dissection. *Korean J Gastroenterol* 54:99-107.
132. Medscape (2006) Cancer patients typically have increased interleukin-6 levels. Dostupno na: <http://www.medscape.com/viewarticle/537309>
133. Heimdal JH, Kross K, Klementsens B, Olofsson J, Aarstad HJ. (2008) Stimulated monocyte IL-6 secretion predicts survival of patients with head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 8:34.
134. Juretić M, Cerović R, Belušić-Gobić M i sur. (2013) Salivary levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 in patients with oral premalignant and malignant lesions. *Folia Biol (Praha)* 59:99-102.
135. Brailo V, Vucicevic-Boras V, Lukac J i sur. (2012) Salivary and serum interleukin 1 beta, interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in patients with leukoplakia and oral cancer. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 17:e10-5.
136. Mukai Y, Shibata H, Nakamura T i sur. (2009) Structure-function relationship of tumor necrosis factor (TNF) and its receptor interaction based on 3D structural analysis of a fully active TNFR1-selective TNF mutant. *J Mol Biol* 385:1221-9.
137. Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH (2012) Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood* 119:651-65.
138. Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK i sur. (2006) Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem Pharmacol* 72:1605-21.
139. Boyce EG, Halilovic J, Stan-Ugbene O (2010) Golimumab: review of the efficacy and tolerability of a recently approved tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibitor. *Clin Ther* 32:1681-703.



140. Schreiber S, Rutgeerts P, Fedorak RN i sur. (2005) A randomized, placebo-controlled trial of certolizumab pegol (CDP870) for treatment of Crohn's disease. *Gastroenterology* 129:807-18.
141. Yan B, Wang H, Rabbani ZN i sur. (2006) Tumor necrosis factor-alpha is a potent endogenous mutagen that promotes cellular transformation. *Cancer Res* 66:11565-70.
142. Wheeler SE, Shi H, Lin F i sur. (2013) Enhancement of head and neck squamous cell carcinoma proliferation, invasion, and metastasis by tumor-associated fibroblasts in preclinical models. *Head Neck* 36:385-92.
143. Kunz-Schughart LA, Kneuchel R (2002) Tumor-associated fibroblasts (part I): Active stromal participants in tumor development and progression? *Histol Histopathol* 17:599-621.
144. Marsh D, Suchak K, Moutasim KA i sur. (2011) Stromal features are predictive of disease mortality in oral cancer patients. *J Pathol* 223:470-81.
145. Leef G, Thomas SM (2013) Molecular communication between tumor-associated fibroblasts and head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 49:381-6.
146. De Wever O, Demetter P, Mareel M, Bracke M (2008) Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int J Cancer* 123:2229-38.
147. Duray A, Demoulin S, Hubert P, Delvenne P, Saussez S (2010) Immune suppression in head and neck cancers: a review. *Clin Dev Immunol* 2010:701657
148. Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P (2006) Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer* 42:717-27.
149. El-Rouby DH (2010) Association of macrophages with angiogenesis in oral verrucous and squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 39:559-64.
150. Marcus B, Arenberg D, Lee J i sur. (2004) Prognostic factors in oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer* 101:2779-87.
151. Liu SY, Chang LC, Pan LF, Hung YJ, Lee CH, Shieh YS (2008) Clinicopathologic significance of tumor cell-lined vessel and microenvironment in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 44:277-85.
152. Curry JM, Sprandio J, Cognetti D i sur. (2014) Tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma. *Semin Oncol* 41:217-34.
153. Galdeiro MR, Garlanda C, Jaillon S, Marone G, Mantovani A (2013) Tumor associated macrophages and neutrophils in tumor progression. *J Cell Physiol* 228:1404-12.

154. Wang F, Arun P, Friedman J, Chen Z, Van Waes C (2009) Current and potential inflammation targeted therapies in head and neck cancer. *Curr Opin Pharmacol* 9:389-395.
155. Camacho M, Leon X, Fernandez-Figueras MT, Quer M, Vila L (2008) Prostaglandin E(2) pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 30:1175-81.
156. Ferris RL, Hunt JL, Ferrone S (2005) Human leukocyte antigen (HLA) class I defects in head and neck cancer: molecular mechanisms and clinical significance. *Immunol Res* 33:113-33.
157. Lopez-Albaitero A, Nayak JV, Ogino T i sur. (2006) Role of antigen-processing machinery in the in vitro resistance of squamous cell carcinoma of the head and neck cells to recognition by CTL. *J Immunol* 176:3402-9.
158. Maleki S, Schecht NF, Keller C i sur. (2011) Lymphocytic host response to oral squamous cell carcinoma: an adaptive T-cell response at the tumor interface. *Head Neck Pathol* 5:117-22.
159. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M (2010) Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140:883-99.
160. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F (2008) Cancer-related inflammation. *Nature* 454:436-44.
161. Dranoff G (2004) Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 4:11-22.
162. Karre K (2002) NK cells, MHC class I molecules and the missing self. *Scan J Immunol* 55:221-8.
163. Sharpe AH, Steinman R (2002) The B7-CD28 superfamily. *Nature Rev Immunol* 2:116-26.
164. Banchereau J, Steinman R (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-52.
165. Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ, Ferrone S (2000) Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol* 74:181-273.
166. Balkwill F, Mantovani A (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357:539-45.
167. Pikarsky E, Porat RM, Stein I i sur. (2004) NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 431:461-6.

168. Mantovani A, Dejana E (1989) Cytokines as communication signals between leukocytes and endothelial cells. *Immunol Today* 10:370-5.
169. Balkwill F (2009) Tumor necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer* 9:361-71.
170. Hagemann T, Wilson J, Kulbe H i sur. (2005) Macrophages induce invasiveness of epithelial cancer cells via NF-kappa B and JNK. *J Immunol* 175:1197-205.
171. Charles KA, Kulbe H, Soper R i sur. (2009) The tumor-promoting actions of TNF-alpha involve TNFR1 and IL-17 in ovarian cancer in mice and humans. *J Clin Invest* 119:3011-23.
172. Romano M, Sironi M, Toniatti C i sur. (1997) Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* 6:315-25.
173. Sepulveda H, Cerwenka A, Morgan T, Dutton RW (1999) CD28, IL-2-independent costimulatory pathways for CD8 T lymphocyte activation. *J Immunol* 163:1133-42.
174. Kaplanski G, Marin V, Montero-Julian F, Mantovani A, Farnarier C (2003) IL-6 regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol* 24:25-9.
175. Ainamo J, Barmes D, Beagrie G, Cutress T, Martin J, Sardo-Infirri J (1982) Development of the World Health Organization (WHO) Community Periodontal Index of Treatment Needs (CPITN). *Int Dent J* 32:281-91.
176. Wu-Wang CY, Patel M, Feng J, Milles M, Wang SL (1995) Decreased levels of salivary prostaglandin E2 and epidermal growth factor in recurrent aphthous stomatitis. *Arch Oral Biol* 40:1093-8.
177. Michalaki V, Syrigos K, Charles P, Waxman J (2004) Serum levels of IL-6 and TNF-alpha correlate with clinicopathological features and patient survival in patients with prostate cancer *Br J Cancer* 90:2312-6.
178. Sun GW, Shook TL, Kay GL (1996) Inappropriate use of bivariable analysis to screen risk factors for use in multivariable analysis. *J Clin Epidemiol* 49:907-16.
179. Sato Y, Takahashi S, Konouchi Y i sur. (2006) IL-10 deficiency leads to somatic mutations in a model of IBD. *Carcinogenesis* 27:1068-73.
180. Bielas JH, Loeb KR, Rubin BP, True LD, Loeb LA (2006) Human cancers express a mutator phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:18238-42.
181. Gungor N, Godschalk RWL, Pachen DM, Van Schooten FJ, Knaapen AM (2007) Activated neutrophils inhibit nucleotide excision repair in human pulmonary epithelial cells: role of myeloperoxidase. *FASEB J* 21:2359-67.

182. Dally H, Gassner K, Jäger B i sur. (2002) Myeloperoxidase (MPO) genotype and lung cancer histologic types: the MPO -463 A allele is associated with reduced risk for small cell lung cancer in smokers. *Int J Cancer* 102:530-5.
183. Ishiguro Y, Ishiguro H, Miyamoto H (2013) Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibition up-regulates interleukin-6 in cancer cells and induces subsequent development of interstitial pneumonia. *Oncotarget* 4:550-9.
184. Gao H, Ward PA (2007) STAT3 and suppressor of cytokine signaling 3: potential targets in lung inflammatory responses. *Expert Opin Ther Targets* 11:869-80.
185. Kim SH, Lee JE, Yang SH i sur. (2013) Induction of cytokines and growth factors by rapamycin in the microenvironment of brain metastases of lung cancer. *Oncol Lett* 5:953-8.
186. Valles SL, Benlloch M, Rodriguez ML i sur. (2013) Stress hormones promote growth of B16-F10 melanoma metastases: an interleukin 6- and glutathione-dependent mechanism. *J Transl Med* 11:72.
187. Delhalle S, Deregowski V, Benoit V i sur. (2002) NF-kappaB-dependent MnSOD expression protects adenocarcinoma cells from TNF-alpha-induced apoptosis. *Oncogene* 21:3917-24.
188. Totzke G, Schulze-Osthoff K, Janicke RU (2003) Cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors sensitize tumor cells specifically to death receptor-induced apoptosis independently of COX-2 inhibition. *Oncogene* 22:8021-30.
189. Hoffmann, TK, Sonkoly E, Homey B i sur. (2007) Aberrant cytokine expression in serum of patients with adenoid cystic carcinoma and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 29:472-8.
190. St John MA, Li Y, Zhou X, i sur. (2004) Interleukin 6 and interleukin 8 as a potential biomarkers for oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 130:929-35.
191. Andersson BÄ, Lewin F, Lundgren J i sur. (2014) Plasma tumor necrosis factor  $\alpha$  and C-reactive protein as biomarker for survival in head and neck squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 140:515-9.
192. Czerninski R, Basile JR, Kartin-Gabay T, Laviv A, Barak V (2014) Cytokines and tumor markers in potentially malignant disorders and oral squamous cell carcinoma: a pilot study. *Oral Dis* 20:477-81.
193. Vučićević Boras V, Čikeš N, Lukač J, Virag M, Cekić-Arambasin A (2005) Salivary and serum interleukin 6 and basic fibroblast growth factor levels in patients with oral squamous cell carcinoma. *Minerva Stomatol* 54:569-73.

194. Allen C, Duffy S, Teknos T i sur. (2007) Nuclear factor-kB-related serum factors as longitudinal biomarkers of response and survival in advanced oropharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res* 13:3182-90.
195. Day GL, Blot WJ, Shore RE i sur. (1994) Second cancers following oral and pharyngeal cancers: role of tobacco and alcohol. *J Natl Cancer Inst* 86:131-7.
196. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM i sur. (1988) Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 48:3282-87.
197. De Schutter H, Landuyt W, Verbeke E i sur. (2005) The prognostic value of the hypoxia markers CA IX and GLUT 1 and the cytokines VEGF and IL 6 in head and neck squamous cell carcinoma treated by radiotherapy +/- chemotherapy. *BMC Cancer* 5:42.
198. Chang KP, Kao HK, Wu CC i sur. (2013) Pretreatment interleukin-6 serum levels are associated with patient survival for oral cavity squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 148:786-91.
199. Hao W, Zhu Y, Zhou H (2013) Prognostic value of interleukin-6 and interleukin-8 in laryngeal squamous cell cancer. *Med Oncol* 30:333.
200. Kinoshita A, Tajiri H (2013) Cancer and inflammation: suppress inflammation, suppress cancer? *J Transl Med Epidemiol* 1:1004.
201. Roxburgh CS, McMillan DC (2010) Role of systemic inflammatory response in predicting survival in patients with primary operable cancer. *Future Oncol* 2010 6:149-63.
202. Thomas GR, Chen Z, Leukinova E, Van Waes C, Wen J (2004) Cytokines IL-1 alpha, IL-6, and GM-CSF constitutively secreted by oral squamous carcinoma induce down-regulation of CD80 costimulatory molecule expression: restoration by interferon gamma. *Cancer Immunol Immunother* 53:33-40
203. Sriuranpong V, Park JI, Amornphimoltham i sur. (2003) Epidermal growth factor receptor-independent constitutive activation of STAT3 in head and neck squamous cell carcinoma is mediated by the autocrine/paracrine stimulation of the interleukin 6/gp130 cytokine system. *Cancer Res* 63:2948-56.
204. Park SJ, Nakagawa T, Kitamura H i sur. IL-6 regulates in vivo dendritic cell differentiation through STAT3 activation. *J Immunol* 2004; 173:3844-54.
205. Grandis JR, Drenning SD, Zeng Q i sur. (2000) Constitutive activation of Stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4227-32.
206. Kleer CG, Teknos TN, Islam M i sur. (2006) RhoC GTPase expression as a potential marker of lymph node metastasis in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Cancer Res* 12:4485-90.

207. Islam M, Sharma S, Teknos TN (2014) RhoC regulates cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma by overexpressing IL-6 and phosphorylation of STAT3. *PLoS One* 9:e88527.
208. Saheb Jamee M, Eslami M, Atarbash Moghadam F, Sarafnejad A (2008) Salivary concentration of TNF alpha, IL1 alpha, IL6, and IL8 in oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 13:E292-5.
209. Dawes C (1987) Physiological factors affecting salivary flow rate, oral sugar clearance, and the sensation of dry mouth in man. *J Dent Res* 66:648-53.
210. Linkov F, Lisovich A, Yurkovetsky Z i sur. (2007) Early detection of head and neck cancer: development of a novel screening tool using multiplexed immunobead-based biomarker profiling. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16:102-7.
211. Hsiao SH, Lee MS, Lin HY i sur. (2009) Clinical significance of measuring levels of tumor necrosis factor-alpha and soluble interleukin-2 receptor in nasopharyngeal carcinoma. *Acta Otolaryngol* 129:1519-23.
212. Lu X, Qian CN, Mu YG i sur. (2011) Serum CCL2 and serum TNF-alpha- two new biomarkers predict bone invasion, post-treatment distant metastasis and poor overall survival in nasopharyngeal carcinoma. *Eur J Cancer* 47:339-46.
213. Rhodus NL, Cheng B, Myers S i sur. (2005) The feasibility of monitoring NF-kappaB associated cytokines: TNF-alpha, IL1-alpha, IL-6, and IL-8 in whole saliva for the malignant transformation of oral lichen planus. *Mol Carcinog* 44:77-82.
214. Krishnan R, Thayalan DK, Padmanaban R, Ramadas R, Annasamy RK, Anandan N (2014) Association of serum and salivary tumor necrosis factor- $\alpha$  with histological grading in oral cancer and its role in differentiating premalignant and malignant oral disease. *Asian Pac J Cancer Prev* 15:7141-8.
215. van Horssen R, ten Hagen TL, Eggermont AM (2006) TNF- $\alpha$  in cancer treatment: molecular insight, antitumor effects, and clinical utility. *Oncologist* 11:397-408.
216. Gümüş P, Nizam N, Lappin DF, Buduneli M (2014) Saliva and serum levels of B-cell activating factors and tumor necrosis factor- $\alpha$  in patients with periodontitis. *J Periodontol* 85:270-80.
217. Leibovici D, Grossman HB, Dinney CP i sur. (2005) Polymorphism in inflammation genes and bladder cancer: from initiation to recurrence, progression, and survival. *J Clin Oncol* 23:5746-56.
218. Petrescu F, Voican SC, Silosi I (2010) Tumor necrosis factor- $\alpha$  serum levels in healthy smokers and nonsmokers. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 5:217-22.

219. Edwards MR, Bartlett NW, Clarke D i sur. (2009) Targeting the NF-kappaB pathway in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Ther* 121:1-13.
220. Dunjic-Kostic B, Jasovic-Gasic M, Ivkovic M i sur. (2013) Serum levels of interleukin-6 and tumor necrosis factor- alpha in exacerbation and remission phase of schizophrenia. *Psychiatr Danub* 25:55-61.

## **8. POPIS KORIŠTENIH KRATICA**



5-LOX - 5- lipooksigenaza

ADC – adenomatozna polipoza (engl. *Adenomatous Polyposis Coli*)

AP2 - aktivacijski protein 2 (engl. *Activating Protein 2*)

BCL- xl - engl. *B-cell lymphoma-extra large*

C- FLIP - engl. *Cellular FLICE-like Inhibitory Protein*

CAFs - fibroblasti povezani s karcinomom (engl. *Cancer-associated Fibroblasts*)

CK19 - citokeratin 19

CK8 - citokeratin 8

COX2 – ciklooksigenaza 2

CPITN – procedura epidemiološkog probira za periodontne potrebe stanovništva (engl. *Community Periodontal Index of Treatment Needs*)

DD – proteinski motiv - način međudjelovanja proteina (engl. *Death Domain*)

DOC1 – engl. *Deleted in Oral Cancer-1*

ELISA - kemiluminiscentni enzimski imunotest (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

FHIT – engl. *Fragile Histidine Triad Protein*

gen *bcl-1* – B stanični limfom tipa 1 (engl. *B-cell leukemia/lymphoma 1*)

gen *bcl-2* - B stanični limfom tipa 2 (engl. *B-cell leukemia/lymphoma 2*)

GRO-1 - onkogen 1 povezan s rastom

HGF - čimbenik rasta hepatocita (engl. *Hepatocyte Growth Factor*)

HIF-1 $\alpha$  – hipoksijom inducirani čimbenik 1 $\alpha$  (engl. *Hypoxia-inducible Factor 1 $\alpha$* )

HIP – protein koji reagira s huntingtinom (engl. *Huntingtin Interacting Protein*)

HPV - humani papilopoma virus (engl. *Human Papilloma Virus*)

IAP-1 - protein inhibitor apoptoze -1 (engl. *Inhibitor of Apoptosis Protein-1*)

IAP-2 - protein inhibitor apoptoze - 2 (engl. *Inhibitor of Apoptosis Protein-2*)

IL-1 - interleukin 1

IL-10 – interleukin 10

IL-11 – interleukin 11

IL-12 – interleukin 12

IL-13- intereukin 13

IL-1 $\beta$  - interleukin 1 beta

IL-23 – interleukin 23

IL-4 – interleukin 4

IL-6 - interleukin 6

IL-8 - interleukin 8

ITF - invazivni tumorski front (engl. *Invasive Tumor Front*)

LOH – gubitak heterozigotnosti (engl. *Loss of Heterozigosity*)

MCP-1 - monocitno kemotaktični peptid 1 (engl. *Monocyte Chemoattractant Protein-1*)

MHC-II - molekule tkivne podudarnosti II (engl. *Major Histocompatibility Complex II*)

MIF-1 – čimbenik inhibicije migracije makrofaga (engl. *Macrophage Migration Inhibitory Factor*)

miRNA - mikro RNA

Nfr2 – nuklearni čimbenik tipa 2 (eritroidnog podrijetla) (engl. *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*)

NF- $\kappa$ B - nuklearni čimbenik kappa B (engl. *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

NK stanice - prirodene stanice ubojice (engl. *Natural Killer*)

OC – oralni karcinom (engl. *Oral Cancer*)

RANKL - engl. *Receptor Activator of Nuclear Factor kappa-B Ligand*

RNS - reaktivni dušikovi spojevi (engl. *Reactive Nitrogen Species*)

ROS - reaktivni kisikovi spojevi (engl. *Reactive Oxigene Species*)

SNP – polimorfizam pojedinačnih nukelotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphisms*)

STAT 3 - engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*

TAM – makrofazi povezani s tumorom (engl. *Tumor-associated Macrophages*)

TGF- $\beta$  - transformirajući čimbenik rasta beta (engl. *Transforming Growth Factor Beta*)

TGF- $\beta$ R-II – receptor tipa II za transformirajući čimbenik rasta  $\beta$ -1 (engl. *Transforming Growth Factor Receptor-II*)

TNF- $\alpha$  - čimbenik nekroze tumora alfa (engl. *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* )

VEGF - vaskularni endotelni čimbenik rasta (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*)

VHL – engl. *Von-Hippel-Lindau*

XIAP - s X-kromosomom povezan inhibitor apoptoze (engl. *X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein*)

## **9. SAŽETAK**

Karcinom usne šupljine čini 2 % svih karcinoma u čovjeka. Bolest je srednje i starije životne dobi. Petogodišnje preživljenje bolesnika iznosi 80 % (s karcinomom stadija 1 i 2) i oko 30 % (s karcinomom stadija 3 i 4), a ovisi o prisutnosti regionalnih i udaljenih metastaza. Citokini, kao što su npr. IL-6 i TNF- $\alpha$ , imaju ključnu ulogu u regulaciji staničnog i humoralnog imunskog odgovora domaćina na tumor. IL-6 pojačava proliferaciju stanica tumora, a TNF- $\alpha$  može uzrokovati ili proliferaciju stanica ili apoptozu. Međutim, razine ovih citokina u serumu mogu biti posljedica lučenja citokina od strane stanica tumora, ali i kao odgovor imunskog sustava na tumor. Cilj istraživanja bio je utvrditi postoji li povezanost između razine IL-6 i TNF- $\alpha$  u serumu i slini bolesnika oboljelih od karcinoma usne šupljine s vremenom pojave recidiva bolesti, pojavom regionalnih i udaljenih metastaza i preživljenja bolesnika. Istraživanje je provedeno na 36 bolesnika koji su zaprimljeni tijekom 15 mjeseci (od studenog 2006. do siječnja 2008.) u Kliniku za kirurgiju lica, čeljusti i usta Kliničke bolnice Dubrava. Koncentracije IL-6 i TNF- $\alpha$  u serumu i slini određivane su kemiluminiscentnim enzimskim imunotestom. Podaci o bolesnicima čuvani su u kartonima bolesnika te u elektroničkoj bazi podataka. Kartoni i baza bolesnika ponovo su pregledani tijekom lipnja 2012. godine te su zabilježeni sljedeći podaci: dob, spol, pušenje, prisutni komorbiditeti, lokalizacija tumora, TNM klasifikacija, način liječenja osnovne bolesti, postojanje ili odsutnost lokoregionalnog recidiva i udaljenih metastaza i ishod bolesti. Povišena razina IL-6 u serumu prije liječenja pokazala se značajnim čimbenikom rizika za recidiv bolesti. Stoga bi se otkrivanje takvih bolesnika moglo iskoristiti za bolje praćenje i ranije otkrivanje recidiva i metastaza bolesti što bi moglo pridonijeti smanjenju stope smrtnosti od karcinoma usne šupljine.

## **10. SUMMARY**

Oral cancer makes 2% of all cancers. The disease is prevalent in a middle-aged and elderly men. Five-year survival rate of patients with oral cancer is 80% (cancer stages 1 and 2) and 30% (cancer stages 3 and 4), and depends on the presence of regional and distant metastases. Cytokines, such as e.g. IL-6 and TNF- $\alpha$  play a key role in the regulation of cellular and humoral immune response of the host to the tumor. IL-6 enhances the proliferation of tumor cells and TNF- $\alpha$  can cause both, proliferation or apoptosis. However, the levels of these cytokines in the serum may be a consequence of cytokine secretion by the tumor cells, but also as an immune response to the tumor. The aim of the study was to investigate the relationship between IL-6 and TNF- $\alpha$  in serum and saliva of patients with oral cancer and tumor recurrence, the presence of regional and distant metastases and survival of patients. The study included 36 patients who were referred during the 15 months (from November 2006 to January 2008) to the Department of Maxillofacial Surgery University Hospital Dubrava. The concentrations of IL-6 and TNF- $\alpha$  in serum and saliva were determined by chemiluminescent enzyme immunoassay. The patients data were kept in the files of patients and in the electronic database. Files and database of patients were reviewed again in June 2012 and the following data were recorded: age, gender, smoking, present comorbidities, tumor location, TNM classification, treatment of the underlying disease, the presence or absence of locoregional recurrence and distant metastases and disease outcome. Elevated levels of IL-6 in serum before treatment has proved to be a significant risk factor for disease recurrence. Therefore, the detection of such patients could be used for better monitoring and early detection of recurrence and metastatic disease that could contribute to reducing mortality from oral cancer.





Ivana Škrinjar (djevojačko Canjuga) rođena je 1. svibnja 1981. godine u Zadru. Završila je XV. prirodoslovno-matematičku gimnaziju u Zagrebu (MIOC) 1999. godine te je iste godine upisala Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirala je 28. siječnja 2005. godine s drugim najboljim prosjekom generacije. Od 1. ožujka 2007. godine započela je specijalizaciju iz oralne patologije na Klinici za stomatologiju KBC-a Zagreb. Specijalistički ispit položila je 30. kolovoza 2010. te je od tada stalno zaposlena na Klinici za stomatologiju kao liječnik specijalist.

Od 2008. godine student je Sveučilišnog poslijediplomskog interdisciplinarnog doktorskog studija Molekularne bioznanosti u Osijeku.

Objavila je više znanstvenih i stručnih radova te je predavala na tečajevima trajne edukacije za doktore dentalne medicine.

Članica je Hrvatske komore dentalne medicine, Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatskog društva za oralnu medicinu i patologiju, *European Association of Oral medicine*, *Multinational Association of Supportive Care in Cancer*, *International Society of Oral Oncology* i Udruge stipendista Hrvatske školske zaklade – CSF Hrvatska.

Udana je, majka jednog sina.

#### Objavljeni radovi i kongresni sažeci

- Skrinjar I, Vucicevic Boras V, Bakale I, Andabak Rogulj A, Brailo V, Vidovic Juras D, Alajbeg I, Vrdoljak DV. Comparison Between Three Different Saliva Substitutes in Patient with Hyposalivation. *Clin Oral Investig* 2015 Jan 25. DOI 10.1007/s00784-015-1405-8 [Epub ahead of print]
- Vučićević Boras V, Škrinjar I, Brailo V, Vidović Juras D, Andabak Rogulj A. Gingival Necrosis Caused by an Ill-Fitting Denture. *Acta Stomatol Croat* 2014;48:230-32.
- Vucicevic Boras V, Stanimirovic A, Music L, Pejakic M, Bakale I, Skrinjar I. Alopecia Areata of Nonodontogenic Origin. *Res J Pharm Biol Chem Sci* 2014;5:1035-8.

- Milenović A, Boras VV, Ilić I, Dotlić S, Aurer I, Kinda SB, Mayer M, Mikulić M, Tomasović-Loncarić C, Škrinjar I. Simultaneous Presentation of Oral and Skin Anaplastic Large T-cell Lymphoma. *Acta Clin Croat* 2014;53:246-51.
- Vučićević Boras V, Savage NW, Brailo V, Škrinjar I, Valter K, Alajbeg I, Dulčić N, Vidović Juras D. The Significance of Oral and Systemic Factors in Australian and Croatian patients with Oral Lichen Planus. *Acta Dermatovenerol Croat* 2014;22:97-102.
- Vučićević Boras V, Andabak Rogulj A, Alajbeg I, Škrinjar I, Lončar Brzak B, Brailo V, Vidović Juras D, Verzak Ž. The Prevalence of Oral Mucosal Lesions in Croatian Children. *Paediatr Croat* 2013;57:235-8.
- Brzak BL, Mravak-Stipetić M, Canjuga I, Baričević M, Balicević D, Sikora M, Filipović-Zore I. The Frequency and Malignant Transformation Rate of Oral Lichen Planus and Leukoplakia--a Retrospective Study. *Coll Antropol* 2012;36:773-7.
- Lončar Brzak B, Canjuga I, Baričević M, Mravak-Stipetić M. Dental Students' Awareness of Oral Cancer. *Acta Stomatol Croat* 2012;46:50-8.
- Picek P, Andabak Rogulj A, Vučićević-Boras V, Brailo V, Cigić L, Canjuga I, Ladika-Davidović B. Serum and Salivary Parameters in Patients with Recurrent Aphthous Ulcerations. *Acta Stomatol Croat* 2012;46:43-9.
- Vučićević-Boras V, Canjuga I, Brailo V, Vidović Juras D. The Effect of Topical Hyaluronic Acid in Patients with Burning Mouth Syndrome. *Acta Stomatol Croat* 2011;45:141.

- Canjuga I, Mravak-Stipetić M, Lončar B, Kern J. The Prevalence of Systemic Diseases and Medications in Patients with Oral Lichen Planus. *Acta Stomatol Croat* 2010;44:96-100.
- Vidović Juras D, Lukac J, Cekić-Arambasin A, Vidović A, Canjuga I, Sikora M, Carek A, Ledinsky M. Effects of Low-Level Laser Treatment on Mouth Dryness. *Coll Antropol* 2010;34:1039-43.
- Krhen J, Canjuga I, Jerolimov V, Krhen T. Implant Stability Measurement Six Weeks After Implantation. *Acta Stomatol Croat* 2009;43:45-51.
- Thongprasom K, Mravak-Stipetić M, Luckprom P, Canjuga I, Biočina-Lukenda D, Vidović-Juras D, Sikora M, Brailo V, Jirawechwongsakul S. Oral Lichen Planus: A Retrospective Comparative Study between Thai and Croatian Patients. *Acta Dermatovenerol Croat* 2009;17:2-8.
- Canjuga I, Mravak-Stipetić M, Kopic V, Galić J. Oral Acanthosis Nigricans: Case Report and Comparison with Literature Reports. *Acta Dermatovenerol Croat* 2008; 16:91-95.
- Canjuga I, Mravak-Stipetić M. Očitovanja Paraneoplastičkih Sindroma na Oralnoj Sluznici, *Medix*, travanj 2008.
- Canjuga I, Mravak-Stipetić M, Kern J, Sikora M, Lončar B, Biočina-Lukenda D. The Prevalence of Systemic Diseases and Medications in Croatian Patients with Oral Lichen Planus. *Oral Diseases* (2008) 14 (Suppl. 1) (abstract).
- Lončar B, Mravak-Stipetić M, Canjuga I, Baličević D. The Prevalence and Malignant Transformation Rate of Oral Lichen Planus (OLP) and Leukoplakia - a Retrospective Study. *Oral Diseases* (2008) 14 (Suppl. 1) (abstract).