

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU MEDICINSKI
FAKULTET OSIJEK

Mario Kordić

**PROGNOSTIČKA ULOGA MIRNA-21 I POVEZANOST S HPV
STATUSOM KOD KARCINOMA USNE ŠUPLJINE I OROFARINKSA**

Doktorska disertacija

Osijek, 2026.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU MEDICINSKI
FAKULTET OSIJEK

Mario Kordić

**PROGNOSTIČKA ULOGA MIRNA-21 I POVEZANOST S HPV
STATUSOM KOD KARCINOMA USNE ŠUPLJINE I OROFARINKSA**

Doktorska disertacija

Osijek, 2026.

Ova doktorska disertacija izrađena je u Klinici za kirurgiju lica, čeljusti i usta Kliničke bolnice Dubrava u Zagrebu, Klinici za ORL i MFK Sveučilišne kliničke bolnice Mostar te u Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu.

Mentor: doc. dr. sc. Željko Zubčić, dr. med., specijalist ORL, subspecijalist plastične kirurgije glave i vrata, Medicinski fakultet Sveučilišta u Osijeku, KBC Osijek

Komentor: izv. prof. dr. sc. Emil Dediol, dr. med., specijalist MFK, subspecijalist plastične kirurgije glave i vrata, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KB Dubrava, Zagreb

ZAHVALA

Izražavam veliku zahvalu mentoru doc. dr. sc. Željku Zubčiću, dr. med. i komentoru izv. prof. dr. sc. Emilu Dediolu, dr. med., koji su svojim strpljenjem, bogatim znanjem, iskustvom i svesrdnom podrškom uvelike pomogli dovršetak disertacije. Hvala vam što ste mi u svakom trenutku bili potpora i što ste me uveli u znanstveni svijet.

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj obitelji i prijateljima za njihovu bezuvjetnu podršku i razumijevanje tijekom svih izazova. Bez njihove pomoći ovaj rad ne bi bio moguć.

Možeš? Mogu!

SADRŽAJ

POPIS TABLICA.....	VI
POPIS SLIKA.....	VII
1. UVOD.....	1
1.1 Anatomija usne šupljine.....	1
1.2 Anatomija orofarinksa.....	2
1.3 Epidemiologija karcinoma usne šupljine i orofarinksa.....	3
1.4 Etiologija.....	5
1.5 Klinička prezentacija	8
1.6 Premaligne lezije.....	11
1.6.1 Leukoplakija	11
1.6.2 Eritroplakija	12
1.6.3 Oralni lichen planus	13
1.6.4 Oralna submukozna fibroza	14
1.7 Dijagnostika	14
1.8 TNM klasifikacija malignog tumora.....	16
1.8.1 Usna šupljina.....	16
1.8.2 Orofarinks	18
1.9 Liječenje.....	22
1.9.1 Kirurško liječenje.....	22
1.9.2 Rekonstrukcija usne šupljine i orofarinksa	25
1.10 MikroRNA	28
1.11 MiRNA-21	29
1.11.1 Stanična proliferacija	30
1.11.2 Epitelno-mezenhimalna tranzicija i invazivnost karcinoma	30
1.11.3 Pojačana angiogeneza i utjecaj na imunološku reakciju.....	31

1.12 HPV	31
1.12.1 Korelacija HPV-a i miRNA-21 u razvoju karcinoma	33
1.13 PCR.....	34
2. HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA	36
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	37
4. ISPITANICI I METODE	38
4.1 Ispitanici.....	38
4.1.1 Onkološka resekcija primarnog tumora	40
4.1.2 Disekcija vrata	41
4.2 Metode	41
4.3 Statistička analiza i prikazivanje podataka	44
5. REZULTATI.....	47
6. RASPRAVA	70
7. ZAKLJUČAK.....	79
8. SAŽETAK.....	80
9. SUMMARY	82
10. POPIS LITERATURE	84
11. ŽIVOTOPIS	105

POPIS KRATICA

AJCC	Američko zajedničko povjerenstvo za karcinom (engl. <i>The American Joint Committee on Cancer</i>)
ALT	Anterolateralni režanj (engl. <i>anterolateral thigh flap</i>)
AP-1	Aktivacijski protein 1 (engl. <i>activation protein 1</i>)
ASR-W	Dobno standardizirana stopa prema svjetskoj populaciji (engl. <i>age-standardized rate – world</i>)
CN XI	Akcesorni živac
C6	Šesti vratni kralježak
CD8	Diferencijacijski klaster (engl. <i>cluster of differentiation 8</i>)
DCIA	Režanj criste iliače (engl. <i>deep circumflex iliac artery flap</i>)
DNA	Deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxiribonucleic acid</i>)
DOI	Dubina invazije (engl. <i>depth of invasion</i>)
EBV	Epstein-Barr virus
ENE	Ekstranodalna ekstenzija (engl. <i>extranodal extension</i>)
FAMM	Režanj facijalne arterije (eng. <i>facial artery musculo mucosal flap</i>)
GLOBOCAN	Globalni opservatorij za karcinom (eng. <i>Global Cancer Observatory</i>)
HPV	Humani papilomavirus
HNSCC	Tumori glave i vrata (engl. <i>head and neck squamous cell carcinoma</i>)

IJV	Unutarnja jugularna vena (engl. <i>internal jugularvein</i>)
GIT	Gastrointestinalni trakt
IARC	Međunarodna agencija za istraživanje karcinoma (engl. <i>International Agency for Research on Cancer</i>)
MDT	Multidisciplinary team
miRNA	Mikro ribonukleinska kiselina (engl. <i>microribonucleic acid</i>)
mRDV	Modificirana radikalna disekcija vrata
MR	Magnetska rezonancija
MSCT	Višeslojna računalna tomografija (engl. <i>multi-slice computed tomography</i>)
NEJM	The New England Journal of Medicine
OPCC	Planocelularni karcinom orofarinksa (engl. <i>oropharyngeals quamouscell carcinoma</i>)
OPG	Ortopantomogram
OSCC	Planocelularni karcinom usne šupljine (engl. <i>orals quamous cell carcinoma</i>)
OLP	Oralni lihen planus
OSMF	Oralna submukozna fibroza
PCR	Lančana reakcija polimerazom (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)

PD-L1	Ligand programirane stanične smrti (engl. <i>program medcell death protein 1 ligand</i>)
PDCD4	Gen programirane stanične smrti (engl. <i>program medcell death 4</i>)
pTNM	Patološki stadij tumor, čvor, metastaza
PTEN	Homolog fosfataze i tensina (engl. <i>phosphatase and tensin homolog</i>)
PET/CT	Pozitronska emisijska tomografija s CT-om
PNAS	Zbornik radova Nacionalne akademije znanosti (eng. <i>Proceedings of the National Academy of Sciences</i>)
RDV	Radikalna disekcija vrata
pRb	Retinoblastomski protein
SDV	Selektivna disekcija vrata
SCM	Sternokleidomastoidni mišić
TGF- β	Transformirajući faktor rasta β (engl. <i>transforming growth factor β</i>)
TP53	Tumorski protein p53 (engl. <i>tumor protein p53</i>)
TNM	Tumor, čvor, metastaza (engl. <i>tumor, nodal, metastasis</i>)
UZV	Ultrazvuk
VEGF	Faktor rasta vaskularnog endotela (engl. <i>vascular endothelial growth factor</i>)
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organisation</i>)

POPIS TABLICA

Tablica 1. Simptomatologija različitih lokacija orofaringealnog karcinoma.....	11
Tablica 2. Stanje bolesti	21
Tablica 3. Početnice korištene za detekciju visokorizičnih tipova HPV 16 i 18 te sekvenciranje	43
Tablica 4. Karakteristike pacijenata i lokacija tumora.....	49
Tablica 5. Klinički stadij tumora i terapija.....	51
Tablica 6. Histopatološki podaci tumora glave i vrata.....	53
Tablica 7. Medijan i interkvartilni raspon promjena molekule miRNA-21 s obzirom na stadij i anatomske regije karcinoma	55
Tablica 8. Karakteristike pacijenta nakon liječenja	57
Tablica 9. Višestruki Coxov regresijski model rizika za preživljenje.....	62
Tablica 10. Višestruki Coxov regresijski model rizika za preživljenje specifično za bolest	65
Tablica 11. Višestruki Coxov regresijski model za preživljavanje bez bolesti	67

POPIS SLIKA

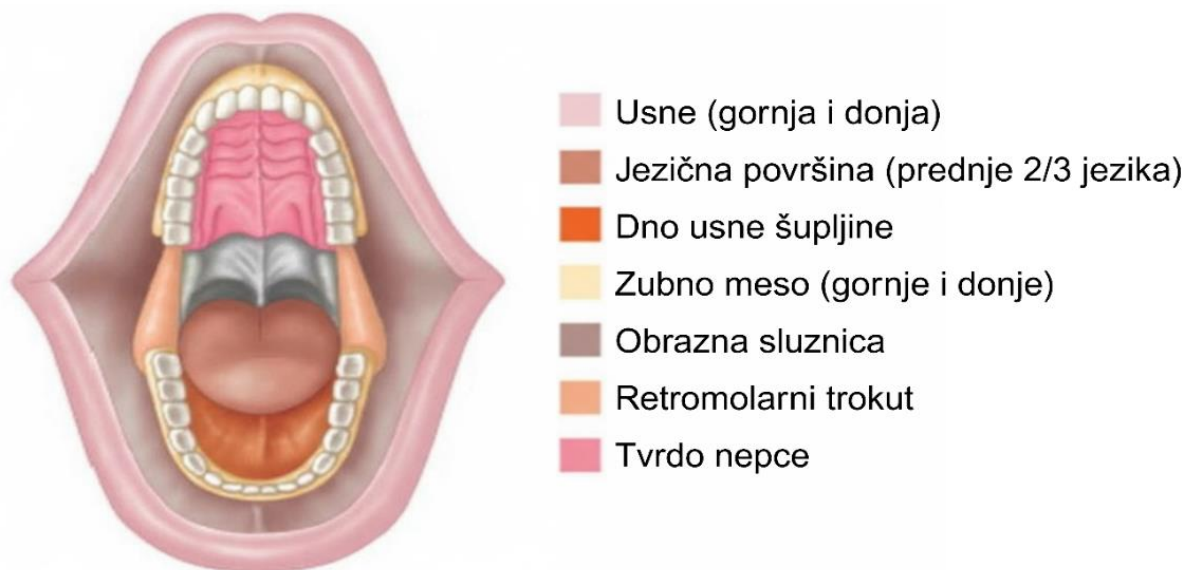
Slika 1. Anatomska mjesta usne šupljine.....	2
Slika 2. Anatomska podjela ždrijela	3
Slika 3. Klinička prezentacija bukalnog karcinoma	9
Slika 4. Tzv. bazen sline gdje se pojavljuje oko 80% karcinoma u usnoj šupljini a zahvaća sublingvalno područje, ventralnu i lateralne strane jezika te retromolarno područje.....	10
Slika 5. Razine limfnih čvorova vrata	24
Slika 6. Mogući indirektni sinergijski molekularni i stanični mehanizmi HPV-a i miRNA-21 koji utječu na karcinogenezu OSCC/OPSCC	34
Slika 7. Analiza snage za utvrđivanje veličine uzorka.....	38
Slika 8. Raspodjela uzorka prema spolu i konzumiranju cigareta i alkohola	47
Slika 9. Ukupno preživljenje (OS) pacijenata s različitim stadijima raka glave i vrata prema kliničkim TNM parametrima	58
Slika 10. Ukupno preživljenje (OS) pacijenata s različitim stadijima raka glave i vrata prema patološkim TNM parametrima.....	59
Slika 11. Ukupno preživljenje pacijenata s različitim vrstama invazija	60
Slika 12. Preživljenje specifično za bolest pacijenata s različitim vrstama invazija	60
Slika 13. Preživljenje bez bolesti pacijenata s različitim vrstama invazije	61
Slika 14. Povezanost ekspresije miR-21 s ukupnim preživljenjem bolesnika s obzirom na klinički stadij karcinoma glave i vrata	63
Slika 15. Povezanost ekspresije miR-21 s preživljenjem bolesnika s različitim stadijima raka glave i vrata prema preživljenju specifičnom za bolest	66
Slika 16. Povezanost ekspresije miR-21 s preživljenjem bolesnika s različitim stadijima raka glave i vrata prema preživljenju bez bolesti	68

1. UVOD

Planocelularni karcinomi glave i vrata (SCCHN) definiraju se kao zloćudni tumori koji nastaju na površini sluznice gornjeg dijela aerodigestivnog trakta (paranasalni sinusi, nazofarinks, orofarinks, hipofarinks, grkljan, usna šupljina, nosnice) (1). Oralni planocelularni karcinom (engl. oral squamous cell carcinoma, OSCC) čini gotovo 95% svih karcinoma glave i vrata (2). HNSCC je šesta najčešća zloćudna bolest i osma po smrtnosti u svijetu (3, 4). U Republici Hrvatskoj je 2022. godine dijagnosticiran karcinom usnice i usne šupljine kod 293 osobe te karcinom orofarinksa kod 159 osoba. Globalno, HNSCC predstavlja približno 550 000 slučajeva godišnje, dok je u Hrvatskoj procijenjeno 896 novih slučajeva 2015. godine (5). Glavni čimbenici rizika za karcinom glave i vrata (engl. head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) su duhan, prekomjerna uporaba alkohola i prisutnost humanog papilomavirusa (HPV) (6-8). HNSCC izazvan duhanom i alkoholom je u opadanju, dok HNSCC izazvan HPV-om, posebno orofaringealni, u porastu kod mlađih osoba (9–11). HPV tip 16 pronađen je u većini HNSCC-a povezanih s HPV-om i sposoban je transformirati zaražene stanice u kancerogene ekspresijom onkoproteina (10).

1.1 Anatomija usne šupljine

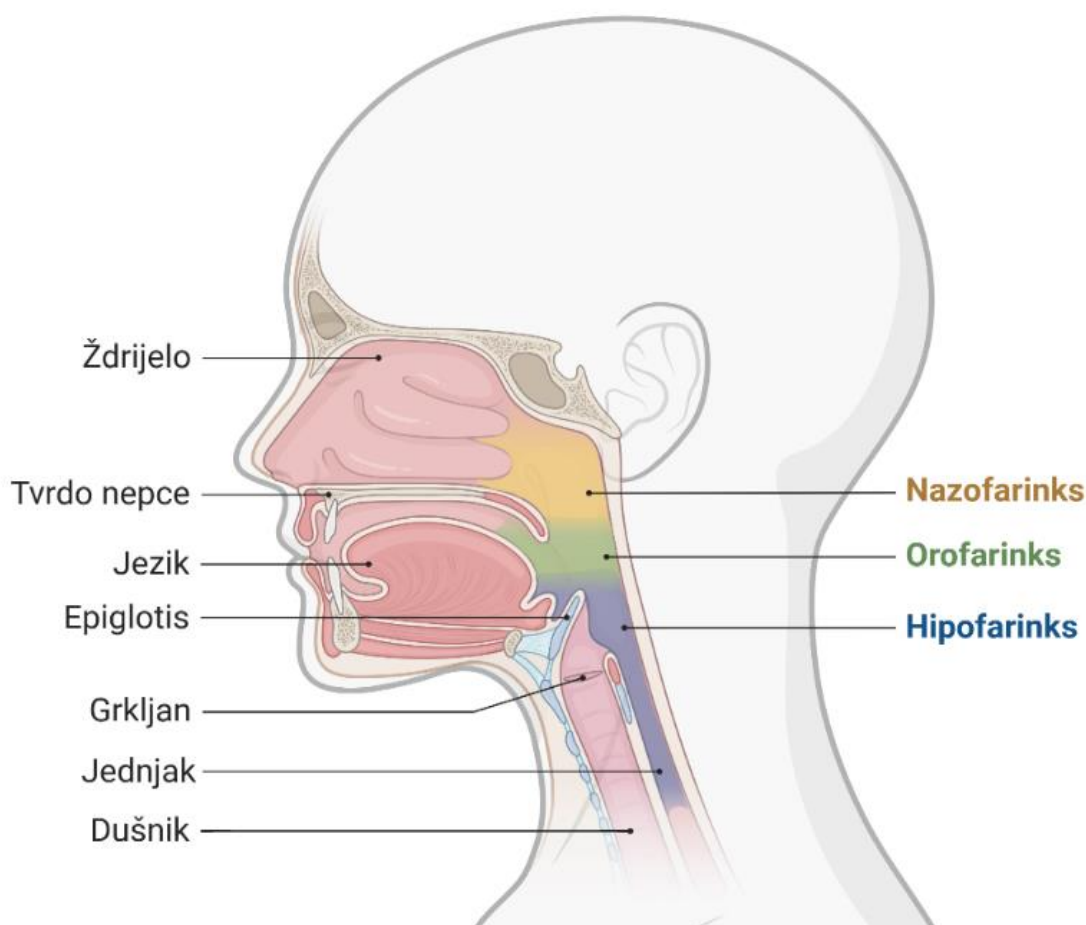
Usna šupljina proteže se od usana sprijeda do orofarinksa straga. Usna šupljina, poznatija i kao usta ili obrazna šupljina, služi kao prvi dio probavnog sustava. Sastoji se od nekoliko anatomski različitih dijelova (Slika 1). Ti dijelovi uključuju usne, jezik, nepce i zube. Iako malen anatomski odjeljak, usna je šupljina jedinstvena i složena struktura s nekoliko različitih živaca i krvnih žila unutar nje (12). Usna šupljina je okružena usnama i sastoji se od dvaju odvojenih područja: predvorja, koje je prostor između obraza, zuba i usana te same usne šupljine. Prava usna šupljina najvećim dijelom ispunjena je jezikom, a sprijeda i sa strane ograničena je alveolarnim nastavcima u kojima se nalaze zubi, dok sa stražnje strane graniči s tjesnacem ždrijela. Sprijeda krov usne šupljine čini tvrdo nepce, a straga meko nepce. Milohioidni mišići čine dno usne šupljine. Oralna sluznica sastoji se od slojevitog pločastog epitela i čini unutarnju sluznicu usta. Submandibularne i sublingvalne žlijezde slinovnice luče viskoznu i mukoidnu tekućinu koja podmazuje i održava usnu šupljinu vlažnom (13). Glavne anatomske strukture usne šupljine su: usne, zubi, tvrdo nepce, meko nepce, prednje dvije trećine jezika i dno usne šupljine.



Slika 1. Anatomska mjesta usne šupljine

1.2 Anatomija orofarinksa

Ždrijelo je vodljiva struktura smještena u središnjoj liniji vrata. To je glavna struktura, uz usnu šupljinu, koju dijele dva organska sustava, tj. gastrointestinalni trakt (GIT) i dišni sustav. Ljevkastog je oblika: gornji kraj je širi i nalazi se odmah ispod donje površine lubanje, dok je donji kraj uži i smješten u razini šestog vratnog kralješka (C6), gdje straga započinje jednjak, a sprijeda grkljan. Njegov mišićno-membranski integritet omogućuje posredovanje u nekoliko vitalnih funkcija povezanih s oba organska sustava, primjerice gutanje hrane, provođenje zraka i stvaranje glasa (14). Regionalno, ždrijelo se dijeli na tri dijela, koji su od gornjeg prema donjem raspoređeni u: nosno ždrijelo, smješteno iza stražnjih nosnih otvora (choanae), oralno ždrijelo, smješteno iza otvora usne šupljine, i laringalno ždrijelo, smješteno iza ulaza u grkljan (Slika 2). Oralno ždrijelo predstavlja nastavak usne šupljine i služi za provođenje bolusa prema laringealnom ždrijelu. Kako bolus prolazi iz usne šupljine, mišići mekog nepca kontrahiraju se kako bi zatvorili choane i spriječili ulazak hrane u nosnu šupljinu. Istodobno, epiglotis (pojedinačna hrskavica u gornjem dijelu grkljana) pomiče se prema naprijed kako bi zatvorio ulaz u grkljan te spriječio ulazak hrane u dišne putove (15–17). Anatomske strukture orofarinksa su: stražnja trećina jezika, tonzile te stražnja i bočne stijenke ždrijela.



Slika 2. Anatomska podjela ždrijela

1.3 Epidemiologija karcinoma usne šupljine i orofarinksa

Karcinomi usne šupljine i orofarinksa značajan su javnozdravstveni izazov zbog visoke učestalosti i smrtnosti. Karcinom usne šupljine šesnaesti je najčešći karcinom u svijetu (18–20), globalno odgovoran za 377.713 novih slučajeva i 177.757 smrtnih slučajeva u 2020. godini (21), što predstavlja porast u odnosu na 2018. godinu (354.864 novih slučajeva, 177.384 smrtna slučaja) (22). Prema podacima GLOBOCAN-a, 2022. godine diagnosticirano je 389.846 novih slučajeva karcinoma usne i usne šupljine, dok je umrlo 188.438 osoba. Zemlje s najvišim stopama su Šri Lanka, Indija, Pakistan, Bangladeš, Mađarska i Francuska (23). Postoji blagi uzlazni trend u incidenciji i mortalitetu, osobito u azijskim državama, gdje je ova bolest sedma

po učestalosti i osma po mortalitetu kod muškaraca, a četvrta kod muškaraca mlađih od 40 godina (24).

Podaci iz Tajvana, Indije i jugoistočne Azije pokazuju da je bukalna sluznica najčešće zahvaćeno mjesto bolesti, što se prvenstveno može pripisati visokoj konzumaciji betel oraha u tim područjima (2–527). U Nigeriji i Njemačkoj, desni i dno usta najčešće su zahvaćena podpodručja (28, 29), dok se u SAD-u najčešće navode jezik, dno usta i usne (30, 31). Stope karcinoma u nekim dijelovima usne šupljine (usnice, gingiva, dno usne šupljine) smanjile su se u SAD-u tijekom posljednjih desetljeća zbog smanjene konzumacije duhana i alkohola (32, 33). Međutim, učestalost orofaringealnih karcinoma porasla je u bazi jezika, stijenci ždrijela, krajnicima i mekom nepcu, što se povezuje s povećanjem učestalosti humanog papilomavirusa (HPV) (18, 33-37).

HPV, osobito tipovi 16 i 18, danas je dominantni uzrok orofaringealnih karcinoma u razvijenim zemljama (38). Promijenjene seksualne navike poput oralnog seksa i većeg broja partnera pridonijele su porastu bolesti, pri čemu su muškarci izloženi većem riziku. U SAD-u i Velikoj Britaniji HPV-pozitivni orofaringealni karcinomi čine 71% i 51,8% svih orofaringealnih karcinoma (39). Epidemiološki modeli predviđaju da će HPV-OPSCC nadmašiti HPV-cervikalne karcinome po učestalosti u SAD-u i Ujedinjenom Kraljevstvu (39). Globalna učestalost HPV-pozitivnih HNSCC varira od 25 do 35%, ovisno o regiji (SAD 37–72%, Europa 46%, Latinska Amerika 24%) (39).

Bolesnici s HPV-OPSCC uglavnom su muškarci bijele rase, u dobi od 50 do 65 godina, s minimalnim ili bez povijesti pušenja i pijenja. Prosječna dob pacijenata iznosi 59,1 godinu (raspon 51,9–66,2), 88% su muškarci, 91% bijele rase, 50% nisu nikad pušili, a tek 13% su aktualni pušači (40). U Južnoj Americi prevalencija HPV-a u oralnim i orofaringealnim karcinomima iznosi oko 24%, s većim udjelom u usnoj (23%) i nešto nižim u orofarinksu (18%) (41).

Istraživanja su pokazala da HPV-negativni bolesnici s visokim unosom duhana i alkohola imaju značajno povećan rizik od nastanka HNC-a u usporedbi s apstinentima i HPV-pozitivnim bolesnicima (42). Ovi čimbenici rizika povezani su s HPV-negativnim tumorima koji imaju više mutacija, agresivniji tijek bolesti i lošiju prognozu (42). Studija slučaja i kontrole iz Francuske Zapadne Indije (145 slučajeva, 405 kontrola) potvrdila je znatan sinergistički učinak izloženosti duhanu i alkoholu, osobito kod HPV-negativnih HNSCC (43).

Podaci iz Hrvatske iz „Global burden of disease“ (2014) pokazuju trend rasta incidencije orofarinksa, koji prati epidemiološke obrasce razvijenih zemalja, s porastom HPV-pozitivnih karcinoma (44). U uzorku iz Zadra, HPV je identificiran u 26,9% karcinoma usne šupljine i 18,2% orofarinksa, pri čemu je 60% HPV-pozitivnih nosilo tip 16, dok su drugi imali višestruke infekcije (44).

Velika multiregionalna studija provedena u razdoblju 1993–2012. u 42 zemlje pokazala je da je incidencija orofaringealnog karcinoma tri do četiri puta veća kod muškaraca nego kod žena u većini zemalja. U srednjoj i istočnoj Europi, uključujući Hrvatsku, ta je disproporcija znatno izraženija, pri čemu je omjer u Hrvatskoj 7,1 muškarac na 1 ženu (45).

1.4 Etiologija

Karcinomi usne šupljine i orofarinksa nastaju uslijed složene interakcije okolišnih, bioloških i molekularnih čimbenika koji dovode do malignih transformacija stanica. Ti čimbenici uključuju oštećenje DNA, upalne procese, promjene u signalnim putevima te imunološku evaziju, koji zajedno stvaraju povoljan mikrokoliš za rast i širenje tumora.

Najvažniji čimbenici rizika uključuju pušenje, konzumaciju alkohola, infekciju ljudskim papilomavirusom (HPV), konzumaciju betel oraščića, profesionalne izloženosti te mikrobiološke čimbenike poput bakterije *Porphyromonas gingivalis* (46). Oni mogu uzrokovati izravna oštećenja DNA ili aktivirati signalne puteve koji dovode do genetskih promjena. Te promjene mogu uključivati mutacije u genima koji reguliraju stanični ciklus, apoptozu i popravak DNA, što doprinosi malignoj transformaciji stanica (47).

Kancerogeni poput acetaldehida i radikalnih molekula iz duhana dovode do oštećenja DNA, mutacija u tumor-supresorskim genima (npr. TP53), te posljedično genetske nestabilnosti OSCC-a (48). Studija iz PNAS pokazala je da aldehidi kao što su akrolein i acetaldehid iz duhanskog dima formiraju γ OH PdG adukte u stanicama usta, uz istovremeno smanjenje aktivnosti popravka DNA (XPC, OGG1/2) (49). Autori zaključuju da ti aldehidi uzrokuju izravna mutagena oštećenja te smanjuju sposobnost popravka DNA – ključne mehanizme genetske nestabilnosti (50). Oralni mikrobiom može pojačati nakupljanje genotoksičnih tvari poput acetaldehida, dodatno narušavajući DNA. Studija je pokazala da oralna mikroflora iz uzoraka OSCC pacijenata, oralnih lezija i zdravih kontrola, kada se izlože etanolu, može proizvesti značajne koncentracije acetaldehida ($>100 \mu\text{M}$), što je u rasponu karcinogenog

djelovanja. Štoviše, mikrobi iz pušača proizveli su čak više acetaldehida (213 μ M) u odnosu na nepušače (141 μ M) (51).

Nadalje, od virusne etiologije je najvažniji HPV koji putem svojih onkoproteini E6 i E7 uzrokuju degradaciju p53 i pRb, čime narušavaju kontrolu staničnog ciklusa i potiču genomsku nestabilnost (52). Važno je spomenuti i Epstein-Barr virus (EBV) koji se također povezuje s kancerogeneom u ovoj regiji.

Također, dosadašnja istraživanja navode da bakterije poput *Streptococcus*, *Neisseria*, i kvasci poput *Candida* u prisutnosti etanola proizvode acetaldehid koji formira DNA-adukte, uzrokuje prekide lanca i inhibira popravak DNA, aktivira proliferacijske signale (MAPK, PI3K/Akt), te blokira apoptozu. Svi navedeni procesi doprinose malignoj transformaciji stanica u usnoj šupljini (53). Oralne bakterije značajno proizvode acetaldehid iz etanola/glukoze, dok zaslađivači poput ksilitola i sorbitola mogu inhibirati ovu proizvodnju, što sugerira potencijalne preventivne strategije (54).

Sama upala ima dvostruku ulogu u karcinogenezi usne šupljine. S jedne strane, kronična upala može potaknuti proliferaciju stanica i angiogenezu, dok s druge strane može dovesti do oštećenja tkiva i genetskih promjena. Upalni medijatori poput citokina i prostaglandina mogu inducirati ekspresiju molekula poput PD-L1 na površini tumorskih stanica, što omogućava tumoru da izbjegne imunološki nadzor. Na primjer, aktivirane imunološke stanice mogu stimulirati ekspresiju PD-L1 na Tca8113 stanicama OSCC-a, što dovodi do apoptoze CD8⁺ T stanica i smanjenja imunološke reakcije protiv tumora (55).

Aktivacija različitih signalnih puteva može doprinositi malignoj transformaciji stanica. Na primjer, upalni medijatori mogu aktivirati NF- κ B put, koji je povezan s upalom, preživljavanjem stanica i metastazama. Također, bakterije poput *Porphyromonas gingivalis* mogu inducirati aktivaciju ATR i NLRP3 inflammasoma, što dovodi do upalne reakcije i može promovirati karcinogenezu (56). *P. gingivalis* aktivira JAK1/Akt/Stat3, inhibira p53 i potiče izražavanje antiapoptičkih proteina (Bcl 2, HSP27), što smanjuje programski staničnu smrt (57).

Tumori razvijaju različite strategije kako bi izbjegli imunološki nadzor, uključujući ekspresiju PD-L1 na površini tumorskih stanica, što inhibira aktivaciju T stanica i omogućava tumoru da izbjegne imunološki odgovor. Upalni medijatori mogu inducirati ovu ekspresiju, čime se dodatno smanjuje učinkovitost imunološkog odgovora protiv tumora (55). Induciraju se

ekspresija PD L1/B7 H1 i B7 DC, uzrokujući apoptozu CD8⁺ T stanica i potičući stvaranje mijeloidnih supresornih stanica, što slabi imunološku obranu (57).

Konzumacija duhana i dalje je glavni čimbenik rizika za OC-SCC i OP-SCC. Na temelju dokaza, Međunarodna agencija za istraživanje karcinoma klasificira pušenje duhana kao karcinogen skupine 1 za usnu šupljinu i ždrijelo, a duhan bez dima kao karcinogen skupine 1 za usnu šupljinu. Pušenje cigareta doprinosi širenju tumora potiskivanjem imuniteta i tumor-supresorskih gena, najviše p53 i PTEN (58). Studija iz Kine (210 slučajeva) pokazala je jaku povezanost dugotrajnog pušenja i OSCC-a (59). Meta-analiza znanstvenika istaknula je relativni rizik od 6,76 za OP-SSC i 3,43 za OC-SCC kod trenutnih pušača duhana u usporedbi s nepušačima (59). Rizik ovisi o dozi i korelira s dnevnom ili kumulativnom konzumacijom cigareta. Rizik opada nakon prestanka pušenja, a nakon 10 ili više godina može se približiti riziku nepušača (60).

Osim pušenja, duhan konzumiran žvakanjem i šmrkanjem također može uzrokovati oralni karcinom. Uživanje bezdimnog duhana najraširenije je u zemljama Južne Azije, ali raste i u Europi i SAD-u. Duhan se ponekad miješa s listom betela (*Piper betle*), nasjeckanim areka orahom (*Areca catechu*) i praškom gašenog vapna. Mali komadi areka oraha miješaju se s drugim sastojcima i motaju u list betela, stvarajući proizvod nazvan paan koji se žvače. Ti dodaci duhanu povećavaju genotoksičnost i pojačavaju psihotropni učinak nikotina. Važno je spomenuti i shishu koja je često dostupna u restoranima, kafićima i drugim ugostiteljskim objektima, te sadrži visoke koncentracije nikotina, katrana i ugljičnog monoksida. Nedavne studije povezuju pušenje vodene lule s karcinomom glave i vrata (61). Studija u Siriji i Libanonu pokazala je povezanost mutacija gena p53 i pušenja vodene lule u OSCC-u (62). Jordanska studija otkrila je da je 36% pacijenata s karcinom usne šupljine redovno pušilo vodenu lulu (63).

U literaturi je opisana snažna povezanost konzumacije alkohola s nekoliko vrsta karcinoma. Sinergijski učinci alkohola i duhanskog dima povećavaju rizik od OSCC-a time što alkohol čini oralni epitel propusnijim, olakšavajući prodiranje duhanskih kancerogenata (64). Većina studija iz SAD-a, Europe i Azije izvještava o povećanom riziku od karcinoma usne šupljine/ždrijela povezanim s teškim konzumiranjem alkohola (>60 g ili 4 pića dnevno ili >4 do 7 pića tjedno) (65). Velike multicentrične studije i objedinjene analize pripisuju više od polovice slučajeva oralnog i orofaringealnog karcinoma duhanu i/ili alkoholu (66-68).

Žvakanje betel oraščića često je u mnogim dijelovima Azije i migrantskim zajednicama diljem svijeta, s procjenama od 600 do 1200 milijuna korisnika (69). Ova navika proizvodi ugodne psihostimulativne učinke i duboko je ukorijenjena u mnogim kulturama (68). Konzumacija shammaha raste u mnogim zemljama; to je mješavina bezdimnog duhanskog praha sa sastojcima poput vapna, papra, pepela i aroma, koji se stavlja u bukalnu šupljinu dok okus ne prodre (70).

Nadalje, što se tiče mikrobioma usne šupljine najviše se ističe *P. gingivalis* kao važan rizični čimbenik. To je gram-negativna anaerobna bakterija, ključni patogen u kroničnom parodontalnom oboljenju, a nedavna istraživanja sugeriraju njezinu važnu ulogu u razvoju OSCC-a, najčešćeg malignog tumora usne šupljine (71).

1.5 Klinička prezentacija

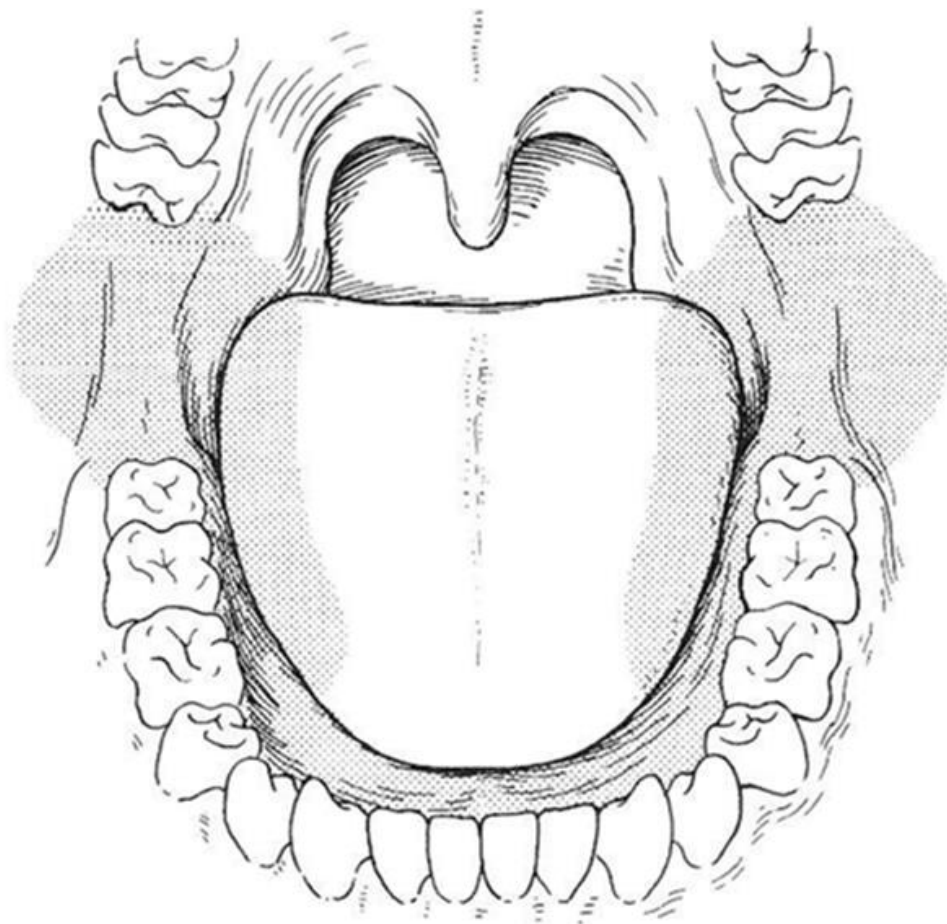
Prvi simptomi karcinoma usne šupljine su obično bol, pečenje, krvarenje, rana u ustima koja ne zacjeljuje, otežan govor ili gutanje, klimavost zubiju, otežano otvaranje usta, ili rjeđe ispad kranijalnih živaca. Simptomi često ovise o lokalizaciji tumora u usnoj šupljini (Slika 3). Tako otežan govor može biti prezentacija karcinoma jezika koji je infiltrirao miškulaturu jezika pa je jezik manje pokretan. Klimavost zubiju je česta prezentacija karcinoma gingive mandibule ili maksile, ili pak uznapredovalog sublingvalnog karcinoma koji je infiltrirao kost. Trizmus je karakterističan za retromolarne karcinome zbog tumorske infiltracije obližnje pterigoidne miškulature.



Slika 3. Klinička prezentacija bukalnog karcinoma

Unatoč jednostavnom samopregledu i fizičkom pregledu, bolesnici se često javljaju u uznapredovalom stadiju bolesti. Opsežan pregled glave i vrata obavezan je kod pacijenata kod kojih postoji sumnja na karcinom usne šupljine. Vizualni pregled i palpacija omogućuju procjenu proširenosti bolesti, treće dimenzije tumora, prisutnosti invazije u kost ili oštećenja kože (72). Klinička slika karcinoma usne šupljine izrazito je varijabilna. Najčešće se prezentira simptomima uzrokovanim primarnim tumorom, dok su znakovi cervikalnih ili udaljenih metastaza znatno rjeđi. Svaka oralna lezija koja se ne povuče u roku od 2 do 3 tjedna trebala bi pobuditi sumnju kod liječnika (73).

Oko 90% planocelularnog karcinoma u usnoj šupljini se javlja u takozvanom bazenu sline potkovastog oblika, tj. ventralnoj strani i lateralnom rubu jezika, sublingvalnom području i retromolarnom području koje zahvaća svega 20% površine usne šupljine (Slika 4).



Slika 4. Tzv. bazen sline gdje se pojavljuje oko 80% karcinoma u usnoj šupljini a zahvaća sublingvalno područje, ventralnu i lateralne strane jezika te retromolarno područje.

Najčešći simptomi uključuju ulcerirane lezije u usnoj šupljini. Bolesnici se također mogu javiti s pokretnim zubima, spontanom krvarenjem, bolom ili utrnulošću u ustima i licu te s lošim prijanjanjem zubne proteze (73). Nadalje, karcinomi orofaringealne regije mogu stvarati disfagiju, otalgiju i otežano disanje (Tablica 1) (74).

Tablica 1. Simptomatologija različitih lokacija orofaringealnog karcinoma

Tumor baze jezike	Tumor tonzila	Tumor zida ždrijela
Bol	Bol	Bol
Disfagija	Disfagija	Krvarenje
Gubitak težine	Gubitak težine	Gubitak težine
Otalgija	Otalgija	Masa u vratu
Trizmus	Masa u vratu	
Fiksacija jezika		

1.6 Premaligne lezije

Na radionici Svjetske zdravstvene organizacije, održanoj 2005. godine, raspravljalo se o terminologiji, definicijama i klasifikacijama oralnih lezija s predispozicijom za malignu transformaciju te je preporučeno korištenje izraza „potencijalno maligni poremećaji“ kako bi se uklonila terminološka zbrka (75). Najčešće opisane premaligne oralne lezije su leukoplakija, eritroplakija, lichen planus i submukozna fibroza (76–79).

1.6.1 Leukoplakija

Leukoplakija je najčešći premaligni poremećaj i dijagnosticirana je u 20,65% bolesnika (80). Najčešće opisane etiologije premalignih oralnih lezija uključuju pušenje cigareta, uporabu duhana i izloženost alkoholu (81, 82). Žvakanje betel oraha također je povezano s razvojem oralne leukoplakije (83). HPV identificiran je kao čimbenik rizika, pri čemu je HPV16 prevladavajući genotip i ujedno najčešći serotip pronađen u karcinomu orofarinksa (84, 85).

Oralne premaligne lezije zahvaćaju otprilike 1,5% do 4,5% svjetske populacije, a neproporcionalno češće pogađaju muškarce nego žene (86, 87).

Najviše stope bilježe se u azijskoj, južnoameričkoj i karipskoj populaciji, što se objašnjava zemljopisnim razlikama u konzumaciji duhana i alkohola. Premaligne lezije usne šupljine čine 17% do 35% svih novih slučajeva karcinoma usne šupljine, a podvrgavaju se malignoj transformaciji u 0,7% do 2,9% slučajeva godišnje (88).

Leukoplakija se definira kao „bijeli plak upitnog rizika, pri čemu se isključuju druge poznate bolesti ili poremećaji koji ne nose povećan rizik za razvoj karcinoma“ (75). Ovaj poremećaj javlja se šest puta češće među pušačima nego među nepušačima.

Klinički, leukoplakija može zahvatiti bilo koji dio usne i orofaringealne šupljine te se dijeli u dva podtipa: homogeni i nehomogeni tip. Homogene lezije karakterizira ravna, tanka, jednolika bijela površina s plitkim pukotinama keratina (76). Nekompatibilne lezije definiraju se kao kombinacija bijelih i crvenih područja (eritroleukoplakija), a mogu biti nepravilno ravne (točkaste) ili nodularne.

Oralna leukoplakija treba se razlikovati od drugih benignih i/ili potencijalno malignih poremećaja koji se također prezentiraju kao bijele ili pretežno bijele lezije oralne sluznice. U diferencijalnu dijagnozu uključuju se: oralna kandidijaza (pseudomembranozna i hiperplastična), linea alba, lupus erythematosus, lezije izazvane duhanom, nikotinski stomatitis te oralni lihen planus (OLP).

Dijagnoza oralne leukoplakije potvrđuje se biopsijom sluznice. Najčešće preporučene terapijske mogućnosti su kirurška ekscizija ili primjena CO₂ lasera. U slučaju umjerene do teške epitelne displazije indicira se kirurška ekscizija. Stope recidiva nakon kirurškog liječenja kreću se između 10% i 35% (89).

1.6.2 Eritroplakija

Eritroplakija se definira kao „vatrenocrvena mrlja koja se ne može klinički ni patohistološki okarakterizirati kao bilo koja druga poznata bolest“. Klinički izgled obilježen je ravnom ili blago udubljenom eritematoznom promjenom sluznice bez mrljaste površine. Kombinirane crvene i bijele promjene unutar iste lezije nazivaju se „eritroleukoplakija“.

Prevalencija eritroplakije kreće se između 0,02% i 0,83%. Najčešće se javlja u osoba srednje i starije životne dobi, a češća je kod muškaraca. Tipično se pojavljuje kao solitarna lezija na bilo kojem dijelu usne šupljine, no najčešće zahvaćena područja uključuju meko nepce, dno usne šupljine i bukalnu sluznicu (90, 91). Konzumacija duhana za žvakanje i alkohola smatra se mogućim etiološkim čimbenicima u razvoju eritroplakije.

Klinički, tipična lezija oralne eritroplakije manja je od 1,5 cm u promjeru, iako može biti i manja od 1 cm ili veća od 4 cm (90). Stopa maligne transformacije izrazito je visoka, varirajući od 14% do 50%, zbog čega je potrebno hitno i adekvatno liječenje (90, 91).

1.6.3 Oralni lichen planus

Bolest je kronična, autoimuna upalna bolest koja može zahvatiti kožu, oralnu sluznicu, sluznicu genitalija, vlasište i nokte (92). Prevalencija oralnog lihenplanusa (OLP) varira od 0,5% do 3%. Češće se javlja kod žena, a bolest obično započinje između trećeg i šestog desetljeća života (93, 94). Iako se OLP smatra autoimunom bolešću posredovanom T-stanicama, njegov uzrok u većini slučajeva nije u potpunosti razjašnjen (95).

Za etiologiju su predloženi brojni čimbenici, uključujući genetsku predispoziciju, dentalne materijale (amalgam, metale, zlato, kompozitne restauracije), lijekove (osobito antimalarike, kardiovaskularne agense, soli zlata, nesteroidne protuupalne lijekove, hipoglikemike), infektivne agense (herpes simplex virus, EBV, citomegalovirus, herpes virus tipa 6, hepatitis C virus i HPV), autoimunost, imunodeficijenciju, alergije na hranu, stres, loše navike, traume, dijabetes, hipertenziju, maligne neoplazme i bolesti crijeva (96, 97).

Iako OLP može zahvatiti bilo koji dio oralne sluznice, najčešće su pogođeni dorzum jezika, bukalna sluznica i gingiva (92). Klinički se OLP manifestira u šest oblika: papularni, retikularni, nalik plaku, atrofični, erozivni i bulozni (93). Najčešći je retikularni oblik koji se prezentira finim bijelim linijama poznatim kao Wickhamove strije. Ako postoje tipične Wickhamove strije, dijagnoza se može postaviti klinički, osobito kod retikularnog oblika OLP-a. Međutim, erozivni ili atrofični oblik zahtijeva potvrdu biopsijom radi točne dijagnoze (98). Bolesnike s retikularnim ili drugim asimptomatskim oblicima OLP-a moguće je pratiti bez liječenja. U slučajevima s prisutnim simptomima i/ili povećanim rizikom od maligne transformacije indicirano je liječenje.

1.6.4 Oralna submukozna fibroza

Oralna submukozna fibroza (OSMF), koju je prvi opisao Schwartz 1952., kronični je i potencijalno maligni poremećaj karakteriziran juxtaepitelijalnom fibrozom usne šupljine. Fibroelastična promjena laminae propriae i atrofija epitela nastaju kao posljedica juxtaepitelne upalne reakcije, što na kraju dovodi do ukočenosti oralne sluznice, trizmusa i nemogućnosti jedenja.

OSMF se najčešće viđa u azijskoj populaciji, osobito među Indijcima iz južnih država i Tajvancima. Bolest se pretežno javlja u drugom i trećem desetljeću života, a mogu biti zahvaćeni oba spola. Stopa maligne transformacije iznosi između 7% i 30%.

Etiologija OSMF-a nije u potpunosti poznata i smatra se multifaktorskom (99). Najvažniji čimbenik rizika jest žvakanje betel quida, koji sadrži areca orah. Drugi čimbenici, poput genetske i imunološke predispozicije, također imaju ulogu u razvoju OSMF-a, što je potkrijepljeno prijavama obiteljskih slučajeva kod kojih članovi nemaju naviku žvakanja betel quida ili areca oraha (100).

Simptomi kao što su peckanje i/ili netolerancija na začinjenu hranu najčešći su u početnoj fazi bolesti. S vremenom bolest postupno napreduje i razvija se fibroza koja može ograničiti otvaranje usta (99).

Za upravljanje OSMF-om dostupna su tri modaliteta liječenja: kirurški, fizikalni i medicinski. Kirurški zahvati koriste se za poboljšanje otvaranja usta i pokretljivosti. Fizikalni tretman uključuje režim vježbi, korištenje udloga ili drugih pomagala za otvaranje usta te mikrovalnu diatermiju, što može biti korisno kod nekih pacijenata. Medicinska terapija uključuje brojne alternative, kao što su steroidi, interferon gama, ekstrakti placentе, imunizirano mlijeko, pentoksifilin, buflomedilhidroklorid, nilidrin, izoksuprin, β -karoten, likopen, vitamini, mikronutrijenti, kolagenaza, hijaluronidaza, kimotripsin i aloe vera (99, 101–104).

1.7 Dijagnostika

Dijagnoza karcinoma usne šupljine temelji se na uzimanju uzorka tkiva iz lezije, odnosno biopsiji. U idealnim uvjetima, biopsiju bi trebao obaviti maksilofacijalni kirurg, jer kirurg koji liječi ima priliku obaviti potpuni pregled glave i vrata, uključujući precizna mjerenja, palpaciju

debljine lezije i klinički pregled cervikalnih limfnih čvorova uz eventualnu kliničku fotografiju (73).

Općenito postoje dvije vrste biopsija koje se mogu primijeniti: incizijska i ekscizijska. U gotovo svim situacijama preferira se incizijska biopsija uzeta s ruba lezije, uključujući i 'normalno' tkivo, na odgovarajućoj dubini kako bi patolog mogao procijeniti invaziju tumora (skvamozni karcinom) kroz laminu propriu (73).

Nakon postavljanja dijagnoze, kirurg će organizirati odgovarajuća radiološka snimanja radi stadifikacije tumora, odnosno procjene dimenzija primarnog tumora, invazije susjednih struktura, zahvaćenosti cervikalnih limfnih čvorova te prisutnosti udaljenih metastaza. Najčešće korišteni modaliteti snimanja u procjeni karcinoma usne šupljine su kompjutorizirana tomografija (CT), magnetska rezonancija (MRI), ultrazvuk (US) i pozitronska emisijska tomografija (PET) za određivanje stadija bolesti. Ortopantomogram (OPG) koristan je za procjenu denticije, kao i za evaluaciju visine mandibule u slučaju potrebe uklanjanja dijela mandibule zbog zahvaćenosti ili blizine tumora (73).

CT snimanja glave, vrata i prsnog koša rutinski se koriste u procjeni karcinoma usne šupljine. Izvrstan su alat za prikaz kortikalne destrukcije, moguće metastaze u cervikalnim limfnim čvorovima te plućnih metastaza. CT je danas uz klinički pregled važan i za procjenu ektranodalne ekstenzije tumora (engl. extranodal extension, ENE). MRI vrata idealan je za procjenu ekstenzije tumora u mekim tkivima, opsega infiltracije koštane srži mandibule ili maksile te intra- ili perineuralne invazije. Ultrazvuk se primjenjuje intraoralno za dostupne tumore ili češće za pregled cervikalnih limfnih čvorova. Može se kombinirati s aspiratom tankom iglom radi citološke analize sumnjivih čvorova. Također, MRI i UZV su važni za bolju procjenu dubine invazije (engl. depth of invasion, DOI). PET se često koristi u kombinaciji s anatomske orijentiranim snimanjima (CT ili MRI). Radi se o funkcionalnoj metodi snimanja pri kojoj se intravenozno primjenjuje radiotracer koji se preferencijalno nakuplja u stanicama s visokim metabolizmom, što je karakteristično za mnoge karcinome usne šupljine. Međutim, infekcije i upale također mogu dati slične prikaze na snimkama. PET skeniranje se najčešće koristi u uznapredovalim fazama bolesti (stadij III i IV) i u procjeni metastatskog širenja (73).

1.8 TNM klasifikacija malignog tumora

TNM pristup stadija karcinoma uzima u obzir tri parametra, a to su proširenost primarnog tumora (T), zahvaćenost lokoregionalnih limfnih čvorova (N) i prisutnost udaljenih metastaza (M). Prema posljednjoj 8. verziji TNM klasifikacije OPSCC se dijeli na HPV-pozitivne i HPV-negativne. Također, u navedenoj klasifikaciji uvedeni su kao prognostički faktori DOI i ENE.

1.8.1 Usna šupljina

Primarni tumor (cT)

Tx	Primarni tumor se ne može procijeniti
T0	Nema dokaza primarnog tumora
Tis	Karcinom in situ
T1	Tumor ≤ 2 cm i DOI ≤ 5 mm
T2	Tumor ≤ 2 cm, DOI > 5 mm i ≤ 10 mm ili tumor > 2 cm i ≤ 4 cm, DOI ≤ 10 mm
T3	Tumor > 4 cm ili tumor s DOI > 10 mm
T4a	Umjereno uznapredovala lokalna bolest. Tumor prodire samo u susjedne strukture (npr. kroz kortikalnu kost mandibule ili maksile ili zahvaća maksilarni sinus ili kožu lica)
T4b	Vrlo uznapredovala lokalna bolest. Tumor zahvaća žvačni prostor, pterigoidne ploče ili bazu lubanje i/ili obuhvaća unutarnju karotidnu arteriju

Regionalni limfni čvorovi (cN)

Nx	Regionalni limfni čvorovi ne mogu se procijeniti
N0	Nema metastaza u regionalnim čvorovima
N1	Metastaza u jednom ipsilateralnom limfnom čvoru ≤ 3 cm i ENE-
N2a	Metastaze u jednom ipsilateralnom limfnom čvoru > 3 cm i ≤ 6 cm i ENE-
N2b	Metastaze u više ipsilateralnih limfnih čvorova ≤ 6 cm i ENE-
N2c	Metastaze u bilateralnim ili kontralateralnim limfnim čvorovima ≤ 6 cm i ENE-
N3a	Metastaze u limfnom čvoru > 6 cm i ENE-
N3b	Metastaze u bilo kojem limfnom čvoru (limfnim čvorovima) s klinički ENE+

Udaljene metastaze (cM)

Mx	Udaljene metastaze se ne mogu procijeniti
M0	Nema udaljenih metastaza
M1	Udaljene metastaze

1.8.2 Oropharynx

Primarni tumor p16-negativan (HPV–) (cT)

Tx	Primarni tumor se ne može procijeniti
T0	Nema dokaza primarnog tumora
Tis	Karcinom in situ
T1	Tumor 2 cm ili manje u najvećoj dimenziji
T2	Tumor veći od 2 cm, ali ne veći od 4 cm u najvećoj dimenziji
T3	Tumor veći od 4 cm u najvećoj dimenziji ili ekstenzija na jezičnu stranu epiglotisa
T4a	Umjereno uznapredovala lokalna bolest. Tumor zahvaća larinks, ekstrinzične mišiće jezika, medijalni pterigoid, tvrdo nepce ili mandibulu
T4b	Vrlo uznapredovala lokalna bolest. Tumor zahvaća lateralni pterigoidni mišić, pterigoidne ploče, lateralni nazofarynx, ili bazu lubanje ili obuhvaća karotidnu arteriju

Primarni tumor p16-pozitivan (HPV+ (cT)

T0	Nema dokaza primarnog tumora
Tis	Karcinom in situ

T1	Tumor 2 cm ili manje u najvećoj dimenziji
T2	Tumor veći od 2 cm, ali ne veći od 4 cm u najvećoj dimenziji
T3	Tumor veći od 4 cm u najvećoj dimenziji ili ekstenzija na jezičnu stranu epiglotisa
T4	Umjereno uznapredovala lokalna bolest; tumor prodire u grkljan, vanjske mišiće jezika, medijalni pterigoid, tvrdo nepce ili mandibulu, ili dalje od toga.

Regionalni limfni čvorovi (HPV–) (cN)

Nx	Regionalni limfni čvorovi ne mogu se procijeniti
N0	Nema metastaza u regionalnim čvorovima
N1	Metastaza u jednom ipsilateralnom limfnom čvoru ≤ 3 cm i ENE–
N2	Metastaze u jednom ipsilateralnom limfnom čvoru > 3 cm i ≤ 6 cm i ENE–; ili metastaze u više ipsilateralnih limfnih čvorova ≤ 6 cm i ENE–; ili u bilateralnim ili kontralateralnim limfnim čvorovima ≤ 6 cm i ENE–
N2a	Metastaze u jednom ipsilateralnom limfnom čvoru > 3 cm i ≤ 6 cm i ENE–
N2b	Metastaze u više ipsilateralnih limfnih čvorova ≤ 6 cm i ENE–
N2c	Metastaze u bilateralnim ili kontralateralnim limfnim čvorovima ≤ 6 cm i ENE–
N3	Metastaze u limfnom čvoru > 6 cm i ENE– ili metastaze u bilo kojem limfnom čvoru (limfnim čvorovima) s klinički ENE+

N3a Metastaze u limfnom čvoru > 6 cm i ENE–

Udaljene metastaze (cM)

Mx Udaljene metastaze se ne mogu procijeniti

M0 Nema udaljenih metastaza

M1 Udaljene metastaze

Točno određivanje stadija tumora ključno je za izbor vrste liječenja (kurativnog ili palijativnog), definiranje opsega liječenja (veličina resekcije kod kirurgije i područje terapije zračenjem), kao i za pružanje važnih informacija kliničarima i bolesnicima u vezi s prognozom bolesti (Tablica 2) (73).

Tablica 2. Stanje bolesti

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

1.9 Liječenje

Svaki bolesnik s karcinomom trebao bi biti prezentiran na multidisciplinarnom sastanku o tumorima (MDT) kako bi mu se ponudio individualizirani i optimalan plan liječenja. Dokazano je da MDT značajno poboljšava ishode pacijenata. Takav okvir omogućuje sudjelovanje većeg broja stručnjaka i kliničara u planiranju liječenja, čime se poboljšava donošenje odluka, potiče pridržavanje smjernica najbolje kliničke prakse te ograničava negativan utjecaj liječenja na kvalitetu života bolesnika (govor, gutanje, žvakanje itd.) (73).

Prva odluka u svakom planu liječenja bolesnika odnosi se na to hoće li se bolesniku ponuditi kurativno ili palijativno liječenje. Kurativno liječenje nudi se ukoliko je bolest kirurški resektabilna i ograničena na primarno mjesto s ili bez zahvaćenosti cervikalnih limfnih čvorova. Potencijalno kurativno liječenje oralnog skvamoznog karcinoma uključuje kirurški zahvat s mogućom adjuvantnom terapijom (zračenje ili kemoradijacijska terapija) (105). Kada se bolest proširi na udaljena mjesta (npr. pluća) ili je kirurški neoperabilna zbog zahvaćenosti vitalnih struktura, nudi se palijativno liječenje. (73)

Liječenje započinje danom postavljanja dijagnoze. Osim vrste, stadija i lokalizacije tumora, na plan liječenja utječu i drugi čimbenici, posebice opće zdravstveno stanje bolesnika, prehrambeni status te je li riječ o liječenju recidiva ili novog primarnog tumora. (73).

1.9.1 Kirurško liječenje

Kirurgija je i dalje primarni način liječenja karcinoma usne šupljine. Može se podijeliti na dvije komponente: resekcijsku i rekonstruktivnu. Resekcijska kirurgija podrazumijeva uklanjanje primarnog tumora, uz eventualno liječenje cervikalnih limfnih čvorova i, ako je potrebno, uspostavljanje kirurškog dišnog puta (traheostomija). Rekonstruktivna kirurgija ima za cilj smanjiti morbiditet resekcije, primjerice zamjenu tkiva i minimiziranje utjecaja na govor, gutanje i žvakanje (105).

Cilj kirurga je ukloniti tumor s marginom zdravog tkiva u sve tri dimenzije. Trenutne kliničke smjernice preporučuju da mikroskopski rub zdravog tkiva oko tumora bude najmanje 5 mm. Da bi se postigao takav rub, u vrijeme operacije označava se makroskopski radijalni rub od 10 do 15 mm, a duboki rub određuje se preoperativnim snimkama i intraoperativnom palpacijom. Smanjenje tumora tijekom resekcije i patološke pripreme može varirati i dosežati do 50%, ovisno o lokalizaciji (73).

Uklanjanje cervikalnih limfnih čvorova naziva se disekcija vrata. Postoje različite vrste disekcija, koje se razlikuju prema uklonjenim razinama limfnih čvorova i očuvanju ili posećivanju određenih anatomskih struktura, poput sternokleidomastoidnog mišića, unutarnje jugularne vene i spinalnog pomoćnog živca. Većina pacijenata sa skvamoznim karcinomom usne šupljine indicirana je za disekciju vrata (106, 107).

Disekcija vrata može biti samostalni zahvat, najčešće izveden nakon konverzije negativnog u pozitivan vrat ili pridruženi zahvat primarnoj resekciji tumorskog procesa, poznat kao Commando operacija. Prema indikaciji, disekcija se dijeli na elektivnu, kod klinički negativnog nalaza na limfnim čvorovima vrata te na kurativnu, kada su metastaze u limfnim čvorovima vrata dokazane. Ovisno o opsegu, disekcije se dijele na radikalnu disekciju vrata (RDV), modificiranu radikalnu disekciju vrata (mRDV), proširenu radikalnu disekciju vrata (pRDV) i selektivnu disekciju vrata (SDV) (108).

Radikalna disekcija vrata uključuje uklanjanje limfnih čvorova razine I–V zajedno sa sternokleidomastoidnim mišićem (SCM), unutarnjom jugularnom venom (IJV) i akcesornim živcem (CN XI) (107).

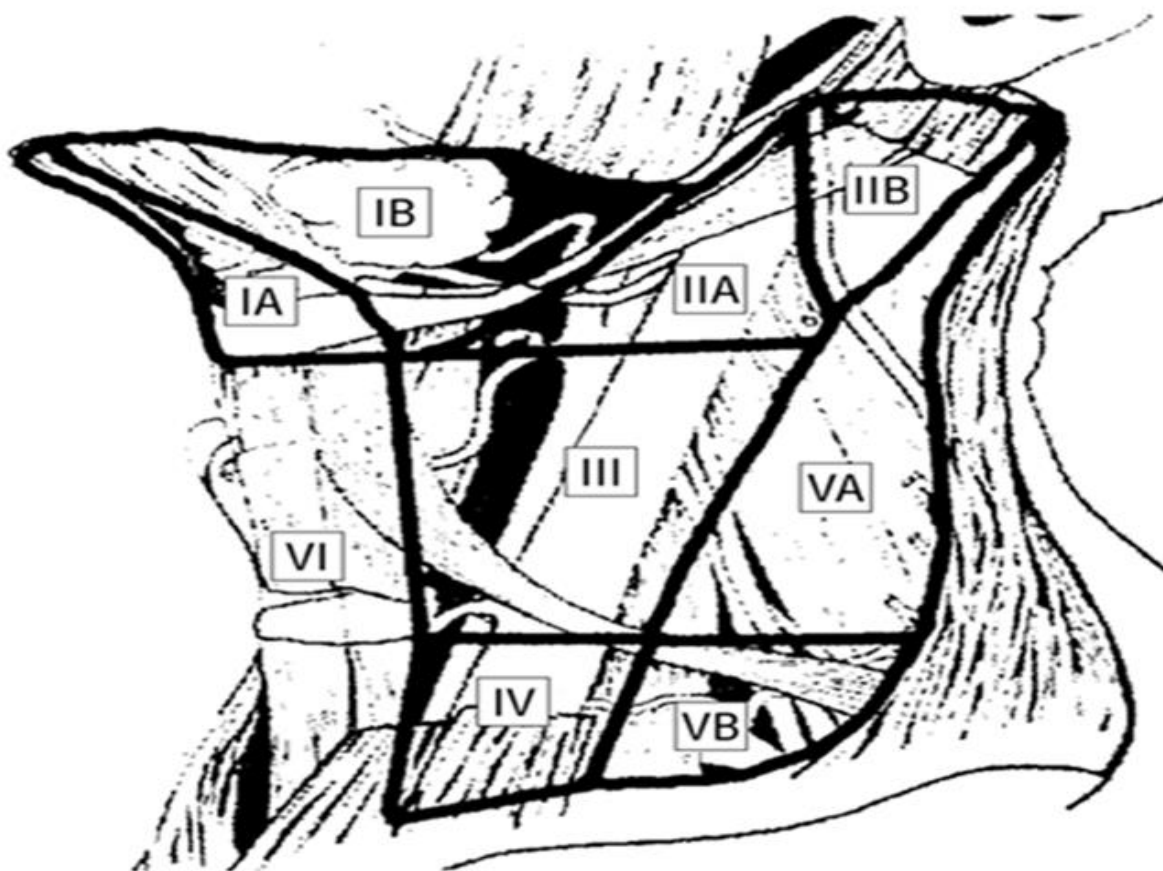
Modificirana radikalna disekcija vrata uklanja limfne čvorove razine I–V, ali pri tome štedi barem jednu od nelimfatičkih struktura: SCM, IJV ili CN XI.

Selektivna disekcija vrata podrazumijeva uklanjanje jedne ili više skupina limfnih čvorova na temelju obrazaca proširenja metastaza.

Proširena disekcija vrata uključuje uklanjanje dodatnih skupina limfnih čvorova ili nelimfatičkih struktura koje nisu obuhvaćene radikalnom disekcijom. Primjeri dodatnih limfnih čvorova su parafaringealni (retrofaringealni), gornji medijastinalni i paratrahealni limfni čvorovi. Nelimfatične strukture koje se mogu ukloniti su karotidna arterija, hipoglosalni, vagusni živac i paraspinalni mišići (107, 108).

Razine limfnih čvorova vrata definirane su na sljedeći način (Slika 5):

- Regija I sastoji se od podregija IA (submentalni limfni čvorovi) i IB (submandibularni limfni čvorovi).
- Regija II (gornji jugularni limfni čvorovi) dijeli se na podregije IIA (čvorovi smješteni anteromedijalno u odnosu na akcesorni živac) i IIB (čvorovi smješteni posterolateralno u odnosu na akcesorni živac).
- Regija III obuhvaća srednje jugularne limfne čvorove.
- Regija IV uključuje donje jugularne limfne čvorove.
- Regija V podijeljena je na podregije VA (akcesorni spinalni limfni čvorovi) i VB (transverzalni cervikalni i supraklavikularni limfni čvorovi) (108).
- Regija VI predstavlja prednje vratne limfne čvorove, uključujući prednje jugularne, pretrahealne, paratrahealne, prekrikoidne i peritiroidne limfne čvorove (108).



Slika 5. Razine limfnih čvorova vrata

1.9.2 Rekonstrukcija usne šupljine i orofarinksa

U rekonstrukciji usne šupljine i orofarinska služimo se gotovo svim dostupnim rekonstruktivnim metodama od onih najjednostavniji poput sekundarnog cijeljenja pa do slobodnih režnjava koji predstavljaju najkompleksniji rekonstruktivni postupak. Glavni cilj rekonstruktivnog postupka nakon onkološke resekcije je vratiti pacijentu sve funkcije koje su mu samim ablativnim postupkom narušene a to su govor, žvakanje, gutanje, disanje ali i vratiti normalan izgled samog pacijenta obzirom da onkološka resekcija može sa sobom nositi veliki mutilirajući rezultat.

Ukoliko se radi o rekonstrukciji nakon intraoralne ekscizije manjih tumora (T1-T2) bez potrebe sa disekcijom vrata najčešće se mogu upotrijebiti jednostavne rekonstruktivne metode od sekundarnog cijeljenja, primarnog zatvaranja defekta pa do korištenja lokalnih režnjeva. Regije u usnoj šupljini koje se najčešće ostavljaju da cijele sekundarno su dno usne šupljine, tvrdo nepce ili područje tonzilarne lože. Eksponirani mišići dna usne šupljine, ili mišići ždrijela kroz nekoliko dana će se polagano prekrivati granulacijama koje će u narednim tjednima spontano epitelizirati te će na taj način defekt biti ponovno prekriven praktički sa sluznicom. Na ovaj način postizemo odličan i funkcionalan i estetski rezultat.

Zatvaranje defekta primarnim šavom moguće je samo za relativno male lezije usne šupljine/orofarinksa (dakle T1 tumore) odnosno za T2 tumore lateralnog ruba jezika. Intraoralnom ekscizijom može se odstraniti čak i polovica oralnog dijela jezika (ispred papila circumvalata) i primarno zašiti a da dobijemo zadovoljavajući i funkcionalni i estetski rezultat. Jezik je dio usne šupljine koji je skup mišića sa velikom mobilnosti i viškom tkiva te je zato moguće čak i veće defekt adekvatno primarno zatvoriti.

Lokalne režnjeve za rekonstrukciju usne šupljine danas relativno rijetko upotrebljavamo i uglavnom se također koriste nakon resekcije T1/T2 tumora sa ili bez disekcije vrata najčešće ako komorbiditet i opće medicinsko stanje pacijenta zahtijevaju da se operacija što jednostavnije i brže izvede.

Od lokalnih režnjeva koriste se:

- Nazolabijalni režanj – koji koristi kožu lica nazolabijalne regije baziran na a. facialis te je najpogodniji za rekonstrukciju dna usne šupljine, relativno je brz i pouzdan te nema potrebe za složenim i dugotrajnim zahvatima (109)
- FAMM (eng. facial artery musculo mucosal flap) režanj – načica je nazolabijalnog reznja koji se također bazira na perforatoru facijalne arterije ali se u ovom reznju ne koristi koža za rekonstrukciju već sluznica obraza i podležeći mišić obraza gdje prolazi ogranak facijalne arterije koji opskrbljuje taj dio sluznice. Pogodan je također za rekonstrukciju sublingvalnog područja te nepca ili alveolarnog grebena a prednost je jer korsiti sluznicu za rekonstrukciju (110)
- Jezični režanj – koristi dio jezika koji je opskrbljen preko lingvalne arterije i uglavnom se može koristiti za rekonstrukciju dna usne šupljine i gingive mandibule. Glavna mana je žrtvovanje dijela jezika te privremeno lošija funkcija govora i jela (111)
- Bukalni režanj – koristi se mišić bukcinator zajedno sa sluznicom najčešće za rekonstrukciju defekta na stražnjem dijelu tvrdog nepca ili alveolarnom grebenu maksile (112)
- Palatinalni režanj – koristi se sluznica tvrdog nepca i periost vaskularizirani od strane a. palatine major za pokrivanje defekta također na tvrdom nepcu ili alveolarnom grebenu maksile. Donorsko mjesto na tvrdom nepcu odakle je odignut palatinalni režanj ostaje ogoljeno i cijeli sekundarno (113)

Regionalni reznjevi su povijesno gledano donijeli veliki napredak u rekonstrukciji usne šupljine/orofarinksa jer su omogućili da se adekvatno može zatvoriti puno veći defekt pogotovo nakon resekcije većih tumora (T3 i T4) u bloku sa disekcijom vrata (tzv. commando operacije). Defekt koji nastaje na ovaj način ima komunikaciju usne šupljine/ždrijela sa vratom te je potrebno fizički odvojiti vodonepropusno vrat od usne šupljine/ždrijela kako bi pacijent mogao uredno funkcionirati odnosno jesti na usta, žvakati, govoriti. Režanj velikog pektoralnog mišića desetljećima je bio glavni režanj rekonstrukcijske kirurgije glave i vrata (114). Temelji se na torakoakromijalnoj arteriji, zbog čega je vrlo dobro prokrvljen i otporan na propadanje (nekrozu). Uključuje mišić (m. pectoralis major), pripadajuću fasciju i često otok kože iznad njega, iako se može koristiti i sam mišić bez kože. Odvaja se sa svog hvatišta na prednjoj stijenci prsnog koša, presjecu se tetiva prema humerusu i zatim provlači iznad klavikule ispod kože

vrata do usne šupljine/ždrijela. Glavne indikacije su mu bile rekonstrukcija velikih defekata dna usne šupljine, baze jezika, ždrijela ili prekrivanje izloženih velikih krvnih žila vrata nakon radikalne disekcije. Iako su danas slobodni mikrovaskularni reznjevi češći, pektoralni režanj ostaje i dalje vrijedna rekonstruktivna opcija, pogotovo kod pacijenata kod kojih mikrokirurški zahvat nije moguć ili kao spasilački zahvat (tzv. "salvage surgery").

Slobodni reznjevi, iako su na vrhu rekonstruktivne piramide kao najsloženiji kirurški rekonstruktivni postupak, danas su postali standard i svakodnevica u kirurgiji glave i vrata pogotovo za rekonstrukciju usne šupljine/ždrijela. Korištenjem slobodnih reznjeva dobili smo mogućnost prilagođavanja rekonstrukcije svakom pojedinom pacijentu tj. korištenje količine i vrste tkiva koje specifično treba (razne kombinacije kože, mišića i kosti).

Prvi slobodni režanj koji je korišten za rekonstrukciju usne šupljine bio je podlaktični režanj (115). I dan danas je to slobodni režanj koji se najčešće koristi u rekonstrukciji usne šupljine/ždrijela zbog svojih odličnih karakteristika koje su potrebne za rekonstrukciju a to su tanko i podatno tkivo distalnog dijela podlaktice koje je potrebno pogotovo kod rekonstrukcije dna usta, bukalne sluznice, mekog nepca ili zida ždrijela. Osim toga bazira se na a. radialis i pratećim venama a sam kailbar krvnih žila je odličan, peteljka je vrlo dugačka a sam promjer krvnih žila adekvatan za mikroanastomozu sa krvnim žilama na vratu. Anatomija je gotovo uvijek konstantna i pouzdana. Najčešće se koristi kao fasciokutani (koža i potkožje), ali može biti i osteokutani (ako se uzme dio kosti radijusa za rekonstrukciju čeljusti, iako se to danas rjeđe radi). Negativna strana je donorsko mjesto gdje se ostavljaju eksponirane fleksorne tetive podlaktice te je potrebno defekt rekonstruirati sa kožnim transplantatom te ostaje relativno vidljiv ožiljak na donorskoj regiji.

Kao alternativa za mekotkivnu rekonstrukciju usne šupljine/ždrijela se u 1990-ima pojavio perforatorski režanj sa anterolateralnog dijela natkoljenice (tzv. anetrolateral thigh flap ALT) (116). Ovaj režanj je pogotovo pogodan kada nam je potrebno puno mekog tkiva za rekonstrukciju, npr. nakon hemi- i subtotalnih glosektomija ili čak rekonstrukcije cijele usne šupljine/ždrijela. Može se odignuti i do 20 cm dugačak režanj sa 8-9 cm širine a da se defekt na natkoljenici primarno zatvori. Režanj se bazira na descedentnoj grani lateralne cikumfleksne femoralne arterije i pratećim venama i donorski ne ostavlja gotovo nikakav morbiditet. Najčešće su pošteđeni i mišići i motorički i senzorni živci natkoljenice te je konačni vertikalni ožiljak na natkoljnici najčešće sakriven odjećom. Ukoliko je potrebno još volumena za

rekonstrukciju zajedno sa kožom i fascijom može se odignuti i dio vastus lateralis mišića što ovaj režanj čini još pouzdanijim i robustnijim.

U sklopu onkološke resekcije ne tako rijetko je uključen i dio donje čeljusti. Danas je gotovo nezamislivo da se pacijentu ne rekonstruira donja čeljust. Zlatni standard u rekonstrukciji donje čeljusti je fibularni slobodni režanj (117). Opisan prvi puta 1989 godine, danas je postao rutina. Omogućava kao i ostali spomenuti slobodni reznjevi rad u dva tima, naima dok jedan tim resecira tumor drugi kirurški tim istovremeno odiže slobodni režanj sa potkoljenice. Fibula se odiže zajedno za peronealnom aretrijom i pratežim venama, u sam režanj često je uključen i dio mišića m. flexor hallucis longusa kao i kože sa fascijom. Što se tiče kosti može se uzeti i 20 cm kosti što je dovoljno za rekonstrukciju donje čeljusti od angulusa do angulusa, poštedi se obično 5-6 cm fibule kod gležnja radi stabilizacije samo zgloba. Često je potrebno fibulu koja je ravna kost ulomiti na više mjesta kako bismo dobili zakrivljeni oblik same donje čeljusti, što se danas može brzo i precizno napraviti koristeći kompjuterski planirane i isprintane vodilice za osteotomiju napravljene za svakog pacijenta individualno. Ova kost podržava postavljanje dentalnih implantata obzirom da je bikortikalna te se tako ispunjavaju uvjeti za kasniju implantoprotetsku rehabilitaciju takvih pacijenata.

Kao neka alternativa koštanoj rekonstrukciji čeljusti može poslužiti i vaskularizirani režanj criste iliace (tzv. DCIA) koji je pogodan za lateralne defekt donje čeljusti kada nije potrebno raditi osteotomije same kosti nego je potreban jedan solidni komad kosti za rekonstrukciju (118). Ovaj koštani režanj za razliku od fibule ima više spongioze a manje kortikalne kosti ali isto tako može poslužiti za implantoprotetsku rehabilitaciju. Glavni nedostatak ovog reznja je relativno kratka peteljka i nemogućnost osteotomija same kosti.

1.10 MikroRNA

MikroRNA (miRNA), izvorno otkrivena prije 30 godina u *Caenorhabditis elegans*, prisutna je u većini eukariota, uključujući ljude (119–121). Predviđa se da miRNA čini 1–5% ljudskog genoma i regulira najmanje 30% gena koji kodiraju proteine. Do danas je identificirano 940 različitih molekula miRNA unutar ljudskog genoma (122).

MiRNA su velika skupina malih jednolančanih, nekodirajućih endogenih RNK duljine približno 18–25 nukleotida, koje igraju značajnu ulogu u posttranskripcijskoj regulaciji gena kroz interakciju s 3' UTR dijelom ciljane mRNK (123). Nalaze se u biljkama, životinjama i

nekim virusima. One reguliraju ekspresiju gena utječući na stabilnost i translaciju mRNA, što može imati ključan utjecaj na procese povezane s karcinomom poput rasta stanica i apoptoze (114). Abnormalna ekspresija miRNA može pridonijeti progresiji karcinoma, pri čemu i onkogene i tumorsupresorske miRNA sudjeluju u tom procesu (124, 125). Određene miRNA, primjerice miRNA-21, miRNA-31 i miRNA-125b, identificirane su kao ključne u stvaranju tumora i njegovu metastaziranju (126).

Degradacija ili inhibicija translacije miRNA također igra važnu ulogu u regulaciji razvoja stanica, diferencijaciji, metabolizmu, proliferaciji, migraciji, indukciji angiogeneze i apoptozu. Postoje brojni dokazi koji povezuju promijenjeni profil miRNA s dobro definiranim stanjima koja utječu na početak, progresiju i pojavu metastaza tumora glave i vrata (127–129).

1.11 MiRNA-21

MiRNA-21 prepoznata je kao „oncomiR“ zbog široko rasprostranjene deregulacije u mnogim vrstama karcinoma. Prvo je bila identificirana kao važni inhibitor apoptoze u raznim staničnim linijama, a danas se prema najnovijim studijama smatra jednom od najistaknutijih prekomjerno eksprimiranih mikroRNA u karcinomima pluća, dojke, želuca, prostate, debelog crijeva i gušterače (130). Tako su nedavne velike studije pokazale da je miRNA-21 dosljedno prekomjerno eksprimirana u šest vrsta solidnih karcinoma (karcinoma dojke, debelog crijeva, pluća, želuca, prostate i gušterače), što ističe njezinu važnost kao onkogene miRNA (131).

Osim toga, miRNA-21 predložena je kao potencijalni biomarker za maligne bolesti jer se može detektirati u različitim tjelesnim tekućinama poput krvi, sputuma, cerebrospinalne tekućine i stolice, čime postaje korisna za neinvazivnu dijagnostiku karcinoma (132).

Važno je napomenuti da su recentne studije pronašle poveznicu između infekcije *P. gingivalis* i ekspresije miRNA-21. To uzrokuje smanjenje tumor supresorskog PDCD4, aktivaciju AP-1 i povećanu ekspresiju ciklina D1, što rezultira pojačanom proliferacijom tumorskih stanica. U kliničkim uzorcima razine *P. gingivalis* DNA pozitivno koreliraju s miRNA-21 i c-Jun, a negativno s ekspresijom PDCD4 (133). Sve navedeno upućuje da ova bakterija stvara proonkogeni mikrookoliš kroz imunomodulaciju, potiče proliferaciju i invaziju malignih stanica te doprinosi progresiji tumora.

1.11.1 Stanična proliferacija

MikroRNA-21 ostvaruje svoje onkogene učinke izravnim ciljanjem i smanjenjem više kritičnih gena supresora tumora. Najpoznatiji i funkcionalno značajni ciljevi uključuju homolog fosfataze i tensina (engl. phosphatase and tensin homolog, PTEN) i gen programirane stanične smrti 4 (engl. programmed cell death 4, PDCD4). Naime, miRNA-21 izravno cilja PTEN, što dovodi do kontinuirane aktivacije signalnog puta PI3K/AKT/mTOR (134). Supresija PTEN-a rezultira pojačanom transkripcijskom i ekspresivnom aktivnosti antiapoptotičkih proteina, dok deaktivira proapoptotičke proteine. Ova aktivacija rezultira poboljšanim preživljavanjem stanica, povećanom sintezom proteina, inhibicijom autofagije i promicanjem metaboličkog reprogramiranja koje podržava rast tumora. Omjer proapoptotičkih/antiapoptotičkih proteina se odgovarajuće povećava, što inhibira oslobađanje citokroma C iz mitohondrija i posljedično sprječavajući aktivaciju kaskade kaspaza čime se blokira apoptoza. Dakle, inhibicija PTEN-a potiče preživljavanje stanica, proliferaciju i otpornost na apoptozu (134). S druge strane, PDCD4 je tumorski supresor uključen u apoptozu i regulaciju translacije te predstavlja još jednu primarnu metu miRNA-21 (133). Ciljanjem PDCD4, miRNA-21 potiče translaciju mRNA i proliferaciju tumorskih stanica. Os miRNA-21/PDCD4 posebno je važna u regulaciji napredovanja staničnog ciklusa modulacijom ekspresije aktivacijskog proteina 1 (AP-1) i ciklina D1 (133).

1.11.2 Eitelno-mezenhimalna tranzicija i invazivnost karcinoma

Važnost miRNA-21 je pronađena i u invazivnosti karcinoma te epitelno-mezenhimalnoj tranziciji. Ta uloga miRNA-21 je multifaktorska. Aktivacijom transformirajućeg faktora rasta β (engl. Transforming growth factor β , TGF- β), miRNA-21 pojačava ekspresiju mezenhimalnih markera i transkripcijskih faktora, a istovremeno smanjuje ekspresiju epitelnih markera (135). Ova fenotipska promjena temeljno mijenja svojstva stanične adhezije i organizaciju citoskeleta. Nadalje, miRNA-21 olakšava preoblikovanje izvanstaničnog matriksa kroz povećanu aktivnost matriks metaloproteinaza, stvarajući idealno okruženje za migraciju i invaziju stanica. Studije pokazuju da prekomjerna ekspresija miRNA-21 u transformiranim keratinocitima daje metastatska svojstva, dok blokada miRNA-21 u visoko metastatskim stanicama dramatično smanjuje invazivni kapacitet i sprječava stvaranje metastaza pluća u mišjim modelima. Također, aktivacija PI3K/AKT puta posredovana miRNA-21 dodatno podržava epitelno-mezenhimalnu tranziciju moduliranjem ključnih transkripcijskih faktora i promoviranjem ekspresije gena povezanih s tranzicijom (134).

1.11.3 Pojačana angiogeneza i utjecaj na imunološku reakciju

MiRNA-21 koju stvaraju stanice karcinoma inducira proizvodnju faktora rasta vaskularnog endotela (engl. vascular endothelial growth factor, VEGF) u obližnjim stanicama putem STAT3-ovisnih mehanizama (136). U OSCC-u, miRNA-21 potiče stvaranje tubula u endotelnim stanicama i regulira razine angiopoetina-1 (ANG-1) i VEGFA modulacijom signalnog puta PDCD4/c-Jun. Aktivacija signalnih putova AKT i ERK1/2 posredovana miRNA-21 pojačava ekspresiju faktora-1 α induciranog hipoksijom (HIF-1 α) i VEGF-a, inducirajući snažnu tumorsku angiogenezu. Studije koje koriste egzosome izvedene iz stanica oralnog raka pokazuju da prijenos miRNA-21 u endotelne stanice aktivira put RMND5A potičući angiogenezu i podržavajući rast tumora.

Nadalje, miRNA-21 modulira antitumorske imunološke odgovore putem više mehanizama. U makrofazima visoka ekspresija miRNA-21 potiče protumorigeni fenotip. Također, miRNA-21 djeluje kao parakrini agonist receptora u imunološkim stanicama, pokrećući proupalne odgovore koji paradoksalno potiču rast i metastaze tumora (137). Osim toga, miRNA-21 je pojačano reguliran u mijeloidnim supresorskim stanicama, gdje povećava njihovo preživljavanje i proliferaciju ciljajući PTEN čime suzbija i urođene i adaptivne imunološke odgovore.

1.12 HPV

Kako je ranije spomenuto, glavni čimbenici rizika za OSCC uključuju alkohol, duhanske proizvode i betel oraščiće. Tu su i drugi čimbenici virusne etiologije koji mogu doprinijeti nastanku OSCC-a. Među njima, najviše se ističu HPV, Epstein-Barr virus i herpes simplex virus 1 (HSV-1) (138,139).

Humani papilomavirus (HPV) je dvolančani kružni DNA virus bez ovojnice iz obitelji Papillomaviridae. Virus ulazi u epitel kroz oštećenje kože ili sluznice te inficira bazalne matične stanice (140). HPV je uzročnik brojnih epitelnih lezija i karcinoma, najčešće na koži i sluznicama (141–143). Uloga HPV-a u karcinogenosti potvrđena je još 1983. godine, nakon kloniranja tipa HPV 16 iz tkiva karcinoma vrata maternice od strane Dursta i suradnika (144).

Poznato je više od 100 podtipova HPV-a. Osobe s perzistentnom HPV infekcijom i one s više spolnih partnera imaju veću mogućnost zaraze različitim podtipovima HPV-a. HPV se danas smatra uzročnikom karcinoma grkljana, usne šupljine, pluća i anogenitalnih karcinoma.

Podtipovi 6 i 11 smatraju se niskorizičnima te izazivaju kondilome i prekancerozne lezije niskog stupnja, dok su podtipovi 16 i 18 visoko rizični i odgovorni za intraepitelne lezije visokog stupnja koje mogu napredovati u maligni tumor. Važno je naglasiti da sam HPV ne uzrokuje karcinom; potrebni su dodatni čimbenici poput pušenja, nedostatka folata, izloženosti UV zračenju, imunosupresije i trudnoće (140).

Kožne bradavice na rukama i nogama, poput verruca vulgaris i verruca plantaris, uzrokuju HPV podtipovi 1, 2, 4, 27 i 57. Većina anogenitalnih bradavica, kao što je condyloma acuminatum, uzrokovana je HPV podtipovima 6 ili 11, koji su klasificirani kao niskorizični. Ti podtipovi povezani su i s juvenilnom i odraslom rekurentnom respiratornom papilomatozom. Pretkancerozne i kancerozne lezije cerviksa, ženske i muške anogenitalne regije te orofaringealnog područja najčešće su povezane s HPV podtipovima 16 i 18 (140, 144).

Podtipovi HPV-a su podijeljeni u umjereno i izuzetno opasne kategorije. Izuzetno opasni tipovi, prvenstveno HPV 16 i 18, povezani su s nastankom OSCC-a. Studije pokazuju da HPV značajno povećava rizik od karcinoma usne šupljine, neovisno o konzumaciji alkohola i pušenju (145,146). Vjerojatnost razvoja maligniteta s HPV-pozitivnim nalazom dva je puta veća kod osoba koje su imale između jednog i pet oralnih seksualnih partnera, a pet puta veća kod onih sa šest i više partnera (146, 147).

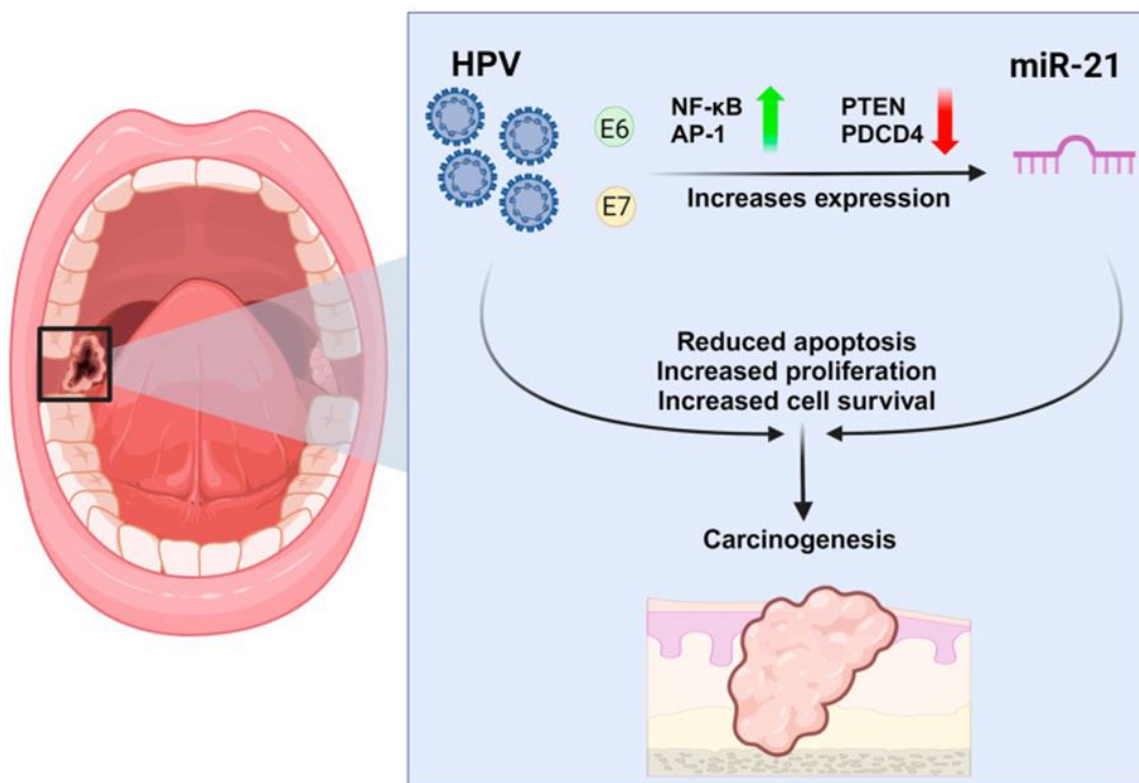
OSCC može histološki biti keratiniziranog i nekeratiniziranog tipa. Keratinizirani se češće javlja kod starijih muškaraca s pušenjem i konzumacijom alkohola, a HPV tu ne igra značajniju ulogu. Međutim, nekeratinizirani tip češći je u dobi od 40–55 godina, u muškaraca s malom izloženosti duhanu i alkoholu te je kod njega HPV izrazito važan u patogenezi (148–150). S druge strane, orofaringealni tumori češće su HPV-pozitivni (57%) u odnosu na usnu šupljinu (12%). HPV-pozitivni OPSCC primarno pogađa nepčane tonzile ili tonzile jezika, gdje je 62% tumora HPV-pozitivno, dok je u ostalim dijelovima orofarinksa HPV-pozitivnost 25% (151).

Iako integracija HPV genoma u genom domaćina nije nužna za viralni životni ciklus, ona predstavlja čest događaj u karcinogenezi. Integracija virusne DNA dovodi do raskida viralnog E2 gena, što rezultira deregulacijom i povećanom ekspresijom onkoproteina E6 i E7 (152). Studije su pokazale da bolesnici bez detektirane integracije pokazuju bolje preživljenje od onih s integracijom i od HPV-negativnih pacijenata te imaju jače eksprimirane imunološke potpise, uključujući CD4+, CD8+ T stanice, NK stanice i B stanice (153). Međutim, kako je prethodno već objašnjeno, pravi onkogeni potencijal HPV-a proizlazi iz ekspresije viralnih onkoproteina

E6 i E7, koji su ključni za malignu transformaciju stanica. E6 onkoprotein formira kompleks E6-AP koji se veže na p53 tumorski supresorski protein domaćina i potiče njegovu degradaciju. Ova inaktivacija p53 omogućava stanicama da izbjegnu apoptozu i nastave nekontroliranu proliferaciju unatoč genomskim abnormalnostima (154). E7 onkoprotein vezuje se i inaktivira retinoblastomski protein (pRb) i srodne proteinske obitelji, što dovodi do oslobađanja E2F transkripcijskih faktora i njihove aktivacije. Oslobođeni E2F aktivira ekspresiju gena uključenih u progresiju staničnog ciklusa i DNA sintezu, omogućavajući nereguliranu progresiju u S-fazu staničnog ciklusa. Zbog E7-posredovane inaktivacije pRb, dolazi do kompenzatorne prekomjerne ekspresije p16, što čini p16 markerom HPV infekcije (155).

1.12.1 Korelacija HPV-a i miRNA-21 u razvoju karcinoma

S obzirom na sve prethodno navedeno jasno je da bi mogla postojati sinergija djelovanja miRNA-21 i HPV-a u razvoju OSCC i OPSCC. HPV putem onkoproteina E6 i E7 i aktivacijom molekularnih signalnih puteva AP-1 i NF- κ B može neposredno povećavati ekspresiju miRNA-21 dok je njihovo zajedničko djelovanje reducirana apoptoza, stimulirana proliferacija i povećano stanično preživljenje (Slika 6). Međutim, nakon detaljnog proučavanja dostupne literature navedena moguća poveznica te predloženi neposredni ili neki drugi izravni učinak HPV-a na ekspresiju miRNA-21 je još uvijek nepoznat. Jedina dostupno istraživanje koje je direktno proučavalo ovu moguću poveznicu je studija Ko i suradnika iz 2014. godine. Oni su otkrili da miRNA-21 ima različitu prognostičku ulogu ovisno o HPV statusu. U HPV-stratificiranoj multivarijantnoj analizi, visoka ekspresija stromalne miRNA-21 bila je povezana s lošim preživljenjem specifičnim za karcinom u HPV-negativnim tumorima, ali ne i u HPV-pozitivnim tumorima. Taj rezultat sugerira da miRNA-21 može imati različite uloge ovisno o HPV statusu infekcije, iako razina ekspresije nije značajno različita (156).



Slika 6. Mogući indirektni sinergijski molekularni i stanični mehanizmi HPV-a i miRNA-21 koji utječu na karcinogenezu OSCC/OPSCC

1.13 PCR

Lančana reakcija polimeraze (PCR) laboratorijska je tehnika amplifikacije nukleinskih kiselina koja se temelji na denaturaciji i renaturaciji kratkih segmenata DNA pomoću enzima DNA polimeraze I, izolirane iz bakterije *Thermus aquaticus*, poznate kao Taqpolimeraza. Godine 1985. PCR su uveli Mullis i suradnici, koji su za svoj rad kasnije dobili Nobelovu nagradu (157).

Primjena visoko preciznih tehnologija stanične biologije, uključujući lančanu reakciju polimeraze (PCR), omogućuje prepoznavanje virusa u vrlo kratkom vremenu nakon infekcije. Također olakšava detekciju virusne infekcije u razdoblju između ulaska virusa u organizam i pojave simptoma bolesti. Time je PCR značajno proširio granice dijagnostike u medicini, posebice u onkologiji (146).

PCR je postupak kojim se selektivno umnaža odabrani segment DNA u epruveti. Sastoji se od triju glavnih faza: denaturacije, žarenja (hibridizacije) i elongacije (amplifikacije) (138).

Tijekom faze denaturacije DNA se zagrijava na 95 °C kako bi se raskinule vodikove veze između komplementarnih baznih parova u dvolančanoj DNA. Nakon toga slijedi faza žarenja, koja uključuje hlađenje denaturirane DNA na temperaturu između 37 i 72 °C, što omogućuje ponovno stvaranje vodikovih veza s oligonukleotidnim primerima. Optimalno žarenje odvija se na temperaturama između 55 i 72 °C (138).

Nakon PCR-a, umnoženi produkti najčešće se analiziraju elektroforezom na agaroznom gelu, pri čemu se za vizualizaciju DNA koristi etidijev bromid (138).

2. HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

Tri su hipoteze provedenog istraživanja:

- 1 miRNA-21 ima statistički značajno povećanu ekspresiju kod bolesnika s oralnim/orofarigealnim karcinomima
- 2 miRNA-21 ima statistički značajno negativan utjecaj na prognozu i preživljenje bolesnika s oralnim/orofaringealnim karcinomom
- 3 miRNA-21 nema statistički značajne povezanosti s HPV statusom.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ovo je istraživanje imalo sljedeće ciljeve:

- 1 Ispitati povezanost ekspresije miRNA-21 sa stadijem oralnog i/ili orofaringealnog karcinoma.
- 2 Utvrditi postoji li povezanost između ekspresije miRNA-21 i HPV statusa, odnosno genotipa HPV-a.
- 3 Procijeniti utjecaj ekspresije miRNA-21 na preživljenje i prognozu bolesnika s oralnim i/ili orofaringealnim karcinomom.
- 4 Analizirati povezanost ekspresije miRNA-21 s patohistološkim karakteristikama tumora (perineuralna i vaskularna invazija, stupanj diferencijacije).
- 5 Usporediti razinu ekspresije miRNA-21 u oralnom i orofaringealnom karcinomu.
- 6 Utvrditi razlikuje li se prognoza bolesnika ovisno o razini ekspresije miRNA-21 u oralnom i orofaringealnom karcinomu.
- 7 Ispitati povezanost između ekspresije miRNA-21 i navika bolesnika (konzumacija alkohola i pušenje) s oralnim i/ili orofaringealnim karcinomom.

4. ISPITANICI I METODE

4.1 Ispitanici

Ova je studija dizajnirana kao prospektivno kohortno istraživanje. Prije početka provedbe, urađena je analiza snage kako bi se utvrdila potrebna veličina reprezentativnog uzorka. Uz snagu testa od 80% te razinu statističke značajnosti od $p = 0,05$ utvrđeno je da je potreban uzorak od 64 ispitanika (Slika 7).

$$N = \frac{p_0 q_0 \left\{ z_{1-\alpha/2} + z_{1-\beta} \sqrt{\frac{p_1 q_1}{p_0 q_0}} \right\}^2}{(p_1 - p_0)^2}$$

$$q_0 = 1 - p_0$$

$$q_1 = 1 - p_1$$

$$N = \frac{0.15 * 0.85 \left\{ 1.96 + 0.84 \sqrt{\frac{0.285 * 0.715}{0.15 * 0.85}} \right\}^2}{(0.285 - 0.15)^2}$$

$$N = 64$$

Slika 7. Analiza snage za utvrđivanje veličine uzorka

Svi bolesnici podvrgnuti su standardnoj preoperativnoj obradi koja je uključivala:

- klinički pregled glave i vrata,
- fiberendoskopski pregled gornjeg aerodigestivnog trakta,
- patohistološka analiza,
- MSCT ili MR glave i vrata,
- CT prsnog koša,
- UZV vrata s citološkom punkcijom suspektnih limfnih čvorova,
- laboratorijsku obradu,
- anesteziološku procjenu.

Odluka o vrsti operativnog zahvata donesena je na multidisciplinarnom onkološkom konziliju (MDT), uzimajući u obzir TNM stadij prema AJCC 8. izdanju, HPV status, komorbiditete i funkcionalni status bolesnika.

U istraživanje su uključeni bolesnici s planocelularnim karcinomom čije je primarno sijelo u usnoj šupljini ili orofarinksu, a koji su primarno kirurški liječeni na Klinici za maksilofacijalnu kirurgiju Kliničke bolnice Dubrava te na Klinici za ORL i MFK SKB Mostar u razdoblju od siječnja 2017. do siječnja 2020. godine.

Uključeni su samo bolesnici s planocelularnim karcinomom usne šupljine (jezik, dno usne šupljine, bukalna sluznica, gingiva i retromolarno područje) ili orofarinksa (baza jezika, meko nepce, tonzila i stražnja stijenka ždrijela). Kirurški uklonjeni tumori upućeni su na patohistološku analizu, što predstavlja standardni postupak.

U istraživanje su uključeni svi histološki podtipovi planocelularnog karcinoma (akantolitički, verukozni, sarkomatoidni, bazaloidni, papilarni, kunikulatni, adenoplanocelularni, limfoepitelni karcinom), kao i svi stupnjevi diferencijacije. Ovisno o keratinizaciji, tumor se dijeli na dobro diferencirani (> 75%), srednje diferencirani (25–75%) i slabo diferencirani (< 25%), pri čemu posljednji ima najlošiju prognozu.

Tijekom operativnog zahvata uzet je uzorak tumora koji je potom obrađen na Institutu Ruđera Boškovića u svrhu epigenetske analize miRNA te izolacije HPV-a primjenom metode PCR.

Iz studije su isključeni bolesnici kod kojih tumor patohistološki nije bio planocelularni karcinom usne šupljine ili orofarinksa, oni koji su primarno liječeni radioterapijom ili

kemoterapijom, kao i bolesnici koji su ranije već imali operaciju karcinoma usne šupljine ili orofarinksa.

Studiju su odobrila sljedeća etička povjerenstva: Bioetičko povjerenstvo Instituta Ruđer Bošković (BEP-3748/2-2014), Etičko povjerenstvo Kliničke bolnice Dubrava (EP-KBD-10.06.2014), Etičko povjerenstvo SKB Mostar (Br. 1189/22-01.08.22) te Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Osijeku (16. rujna 2022., KLASA: 602-04/21-08/07, Ur. broj: 2158-61-07-21-174).

Svi postupci provedeni su u skladu s važećim etičkim smjernicama i propisima te je za sve uključene ispitanike dobiven informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju.

4.1.1 Onkološka resekcija primarnog tumora

Kirurški zahvat proveden je u općoj endotrahealnoj anesteziji. U odabranih bolesnika učinjena je preventivna traheostomija.

Cilj resekcije bio je:

- makroskopski sigurnosni rub 10–15 mm,
- mikroskopski negativan rub ≥ 5 mm.

Dubina resekcije određivana je prema:

- preoperativnom MR/ CT nalazu,
- intraoperativnoj palpaciji,
- procjeni dubine invazije.

Kod tumora jezika izvedena je:

- parcijalna glossektomija (T1–T2),
- hemiglossektomija,
- subtotalna glossektomija (uznapredovali stadij).

Kod tumora dna usne šupljine učinjena je široka ekscizija uz eventualnu segmentalnu/marginalnu mandibulektomiju kod koštane invazije.

Kod tumora gingive ili retromolarnog prostora primijenjena je kompozitna resekcija koja je uključivala:

- resekciju mekih tkiva,
- zahvaćeni segment mandibule.

Intraoperativno su slani uzorci na „frozen section“ analizu radi procjene rubova.

4.1.2 Disekcija vrata

Disekcija vrata provedena je istodobno s resekcijom primarnog tumora.

Indikacije za elektivnu disekciju (cN0):

- DOI > 4 mm,
- T2 i viši stadij,
- visokorizična lokalizacija (lateralni rub jezika, dno usne šupljine).

Kod klinički pozitivnog vrata (cN+) učinjena je kurativna disekcija.

Tipovi zahvata:

- selektivna disekcija razina I–III (najčešće kod OSCC),
- modificirana radikalna disekcija vrata,
- radikalna disekcija vrata (u slučaju opsežne metastatske bolesti).

Razine limfnih čvorova uklanjanje su prema obrascu metastatskog širenja.

4.2 Metode

Praćen je klinički status pacijenata nakon operativnog liječenja tijekom najmanje jedne godine od operacije, uključujući prisutnost ili odsutnost primarnog tumora, vrijeme pojave recidiva, vrijeme pojave regionalne metastaze, vrijeme pojave udaljene metastaze te ukupno preživljenje izraženo u mjesecima. Iz patohistoloških nalaza izdvajaju se podaci o postojanju perineuralne i perivaskularne infiltracije te stupnju diferencijacije tumora, ukoliko su isti prisutni u preparatu.

Svi bolesnici uključeni u istraživanje praćeni su od datuma operativnog zahvata do smrti, posljednje ambulantne kontrole ili završetka razdoblja praćenja.

Praćenje je provedeno prema standardiziranom protokolu KKLČU i Klinike za ORL i MFK, u suradnji s onkološkim timom.

Kontrolni pregledi organizirani su prema sljedećem rasporedu: svaka 3 mjeseca tijekom prve 2 godine, svaka 4–6 mjeseci od 3. do 5. godine, jednom godišnje nakon pete godine.

Na svakom kontrolnom pregledu provedeno je: detaljno uzimanje anamneze (bol, disfagija, promuklost, gubitak težine), inspekcija i palpacija operiranog područja, palpacija vrata, fleksibilna fiberendoskopija orofarinksa i hipofarinksa.

Radiološka evaluacija provedena je prema kliničkoj indikaciji ili prema standardnom protokolu za uznapredovale stadije.

Uključivala je: UZV vrata (svakih 6 mjeseci prve dvije godine), MSCT ili MR vrata (6 mjeseci nakon završetka liječenja), CT prsnog koša jednom godišnje, PET/CT kod sumnje na recidiv ili metastatsku bolest. Kod bolesnika liječenih adjuvantnom radioterapijom, prvo kontrolno slikovno praćenje provedeno je 10–12 tjedana nakon završetka terapije.

Ukupna RNA izolirana je iz svježih tumorskih uzoraka mase približno 20 mg pomoću miRNeasy mini kita (Qiagen). TaqMan Advanced miRNA Synthesis Kit korišten je za pripremu cDNA za kvantitativnu RT-PCR analizu. Razine ekspresije ciljnih miRNA molekula (miRNA-21-3p) ispitane su uporabom TaqMan Advanced miRNA Single Tube Assays (Applied Biosystems). Kao referentna vrijednost uzeta je srednja ekspresija triju referentnih miRNA (miRNA-16-5p, miRNA-191-5p i miRNA-181a-5p). Kombinirana RNA iz triju uzoraka zdrave sluznice usne šupljine i orofarinksa korištena je kao referentni uzorak, a ukupna razlika u ekspresiji određena je metodom $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Dobivene vrijednosti ekspresije miRNA potom su uspoređene s kliničkim praćenjem bolesnika i patohistološkim nalazima.

HPV status u uzorcima određen je PCR metodom. Korištene su univerzalne SP6 i T7 početnice za HPV te specifične PCR početnice za detekciju najčešćih tipova HPV-a 16 i 18 (**Tablica 3**).

Tablica 3. Početnice korištene za detekciju visokorizičnih tipova HPV 16 i 18 te sekvenciranje

Početnice	Naziv	Slijed nukleotida (5'–3')	Genomska regija	Namjena
HPV 16	16-U	CCG GTG TAA TCA TGC ATG GGA	E6/E7	PCR
HPV 16	16-N	GTC TGT CCA TTA CAG GTC CCA		PCR
HPV 18	18-U	CGA CAG GAA CGA CTC CAA CGA		PCR
HPV 18	18-N	GCT GGT AAA TGT TGA TGA TTA CT		PCR
Univerzalne	T7	TAATACGACTCACTATAGGG		Sekvenciranje
Univerzalne	SP6	ATTTAGGTGACACTATAG		Sekvenciranje

Početnice korištene u ovom istraživanju ciljaju E6/E7 regije genoma HPV-a, koje imaju ključnu ulogu u onkogenezi. Tip-specifične početnice omogućuju pouzdanu detekciju visokorizičnih tipova HPV 16 i 18 metodom PCR-a, dok su univerzalne početnice SP6 i T7 korištene za sekvenciranje PCR produkata.

Pet mikrolitara pročišćenog PCR produkta pomiješano je s 5 μ L početnica (koncentracija 5 μ M) radi određivanja nukleotidnog slijeda u oba smjera. Sekvenciranje je provedeno u MacroGen servisu za sekvenciranje (MacroGen Europe, Amsterdam, Nizozemska). Za vizualizaciju i analizu dobivenih sekvenci korišten je BioEdit programski paket (verzija 7.0.5.2, dostupan na <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). Pojedini tipovi HPV-a određeni su usporedbom dobivenih sekvenci s poznatim referentnim nukleotidnim slijedovima.

Sve molekularne analize provedene su na Zavodu za molekularnu medicinu, Institut „Ruđer Bošković“.

4.3 Statistička analiza i prikazivanje podataka

U svrhu preglednosti, počevši od strukture uzorka pa sve do rezultata statističkih analiza osnovni podaci i rezultati su prikazani u prikladnoj formi statističkih tablica.

Za prikaz i analizu strukture uzorka i raspodjele pacijenata prema izdvojenim karakteristikama i grupama korišteni su grafički prikazi u obliku histograma frekvencija.

Statistika uzorka kroz deskriptivne mjere statistike opisana je udjelima, odnosno relativnim frekvencijama iskazanim u postotcima za nominalne varijable.

Za numeričke varijable korištene su osnovne mjere centralne tendencije sa pratećim mjerama disperzije (aritmetička sredina ili prosjek sa standardnom devijacijom, položajne srednje vrijednosti: medijan, donji i gornji kvartil uz interkvartilni raspon kao mjeru disperzije).

S ciljem testiranja razlike kvantitativnih varijabli između dviju nezavisnih skupina pacijenata korišten je T-test.

Pacijenti su dihotomizirani prema medijanu ekspresije ispitivane miRNA u dvije skupine, odnosno na skupinu s ekspresijom iznad i ispod medijana. Također, ispitanici su stratificirani prema dobi na skupine mlađe od 65 godina i starije od 65 godina.

Varijable čije su kategorije sadržavale mali broja pacijenata grupirane su, tj. kombinirane skupine raka stadija I (n = 3) i stadija II (n = 18), kao i različite podskupine stadija IV (IVa, n = 32 i IVb, n = 4) kako bi se omogućile smislenije usporedbe. Zabilježeno je ukupno preživljenje (OS - pacijenti koji su umrli od bilo kojeg uzroka), preživljavanje

specifično za bolest (DSS - pacijenti koji su umrli od glavne bolesti) i preživljavanje bez bolesti (DFS - bilo koji recidiv, udaljene metastaze ili smrt od bilo kojeg razloga).

Vrijeme praćenja u mjesecima izračunato je od datuma uključivanja (operacije) do registriranog vremena smrti ili posljednjeg registriranog praćenja u slučaju OS-a ili DSS-a. Vrijeme praćenja u mjesecima od uključivanja do recidiva bolesti, metastaza ili smrti od bilo kojeg uzroka uzeto je u obzir za procjenu preživljavanja bez bolesti.

Za testiranje podudarnosti između dviju raspodjela pacijenata prema zabilježenim stadijima tumora računat/korišten je Kappa koeficijent podudarnosti i uz njega prateći interval povjerenja uz pouzdanost od 95%. Kappa koeficijent prima vrijednosti iz intervala od 0 do 1, a interpretacija stupnja podudarnosti je prema skali $\kappa = 0,00-0,20$ nema podudarnosti, $\kappa = 0,20-0,39$ minimalan stupanj podudarnosti, $\kappa = 0,40-0,59$ slab stupanj podudarnosti, $\kappa = 0,60-0,79$ umjeren stupanj podudarnosti, $\kappa = 0,80-0,90$ vrlo dobar stupanj podudarnosti i $\kappa = 0,90-1,00$ izvrstan stupanj podudarnosti. Veći kappa koeficijent znači da je podudarnost između dviju promatranih skupina rezultata bolja.

Utjecaj pojedinačnih parametara na preživljavanje procijenjen je Kaplan-Meierovom metodom i log-rank testom. Urađena je i Kaplan-Meierova krivulja preživljavanja s obzirom na težinu analiziranog karcinoma i njegov stadij kod pacijenta.

Coxova proporcionalna regresija rizika korištena je za procjenu utjecaja ispitivanih parametara na ishode koristeći iste kriterije vremena i događaja kao i za Kaplan-Meierovu metodu. U svrhu modeliranja funkcije preživljavanja pacijenata specifično za stanje bolesti i pretpostavke mogućeg uzroka bolesti urađen je višestruki Coxov regresijski model prema skupinama nezavisnih varijabli. Pristup koji koristi Coxov model je specifičan jer opisuje funkciju rizika. Sukladno tome izračunat je omjer rizika za svaku nezavisnu varijablu i intervalna procjena izračunatog omjera uz pouzdanost 95%. Svaki izračunati omjer prati empirijska razina značajnosti p-vrijednost. P-vrijednost $< 0,5$ smatra se statistički značajnim na razini značajnosti 5%.

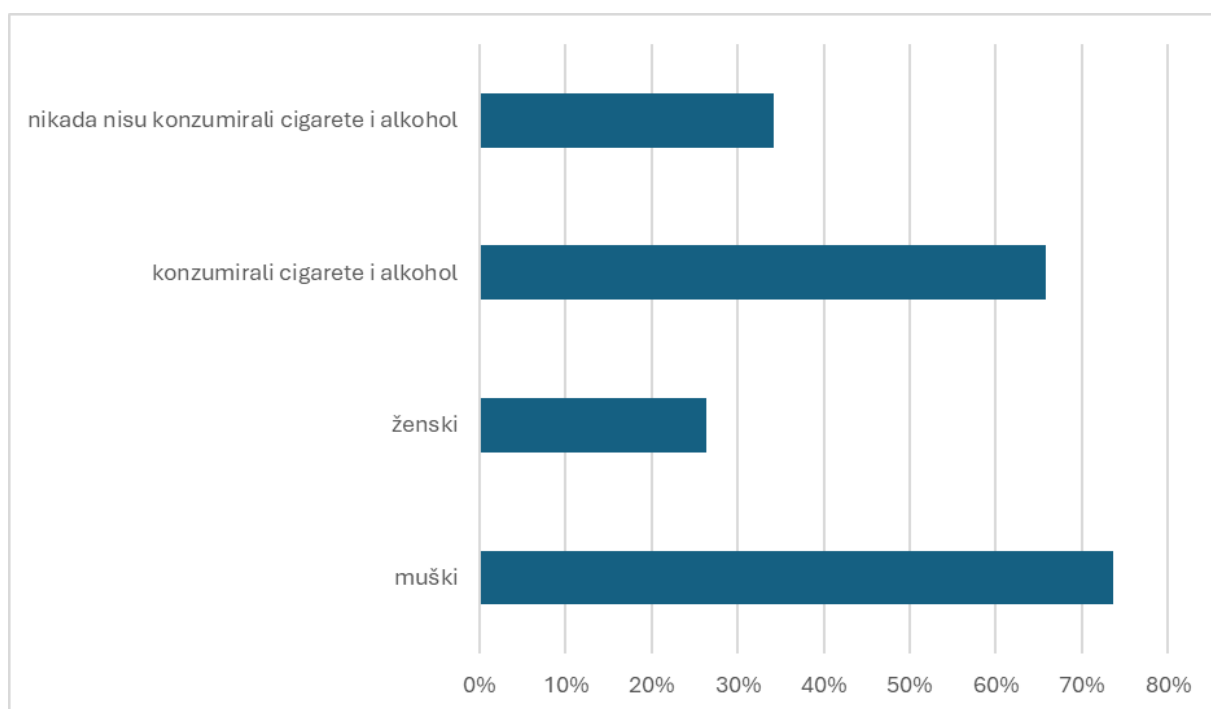
Konstruirani su i univarijatni i multivarijatni modeli s relevantnim varijablama. Konačni multivarijatni modeli konstruirani su korištenjem statistički značajnih varijabli s $p < 0,1$ u univarijatnoj analizi (tj. ako su i klinička i patološka varijabla TNM stadija imale $p < 0,1$, samo je klinička bila uključena u multivarijatni model). Učinak različitih miRNA

također je analiziran analizom ROC krivulje za ukupno preživljavanje. Sve p-vrijednosti ispod 0,05 smatrane su statistički značajnima.

Statističke analize provedene su u programu SPSS software (IBM SPSS Statistics Version 20).

5. REZULTATI

Istraživanje je provedeno u razdoblju od 2015. do 2019. godine na uzorku koji su oblikovali materijali prikupljeni od 87 pacijenata od čega je njih 76 konačno činilo istraživački uzorak. Dakle, uzeti su uzorci bolesnog tkiva kod 87 pacijenata od čega šest uzoraka nije bilo iz primarnog tumora, za tri uzorka bolesnog tkiva histopatološka dijagnoza pokazala je da tumor nije planocelularni karcinom, a dva pacijenta imala su neoperabilne tumore. Stoga je 11 pacijenata isključeno iz istraživačkog uzorka i konačni uzorak iznosi 76 pacijenata. Spolna struktura uzorka je raspodijeljena asimetrično u korist muškaraca njih 56 (74 %) uz 20 žena (26 %). Uz navedenu spolnu razdiobu, unutar uzorka su analizirani i specifični udjeli konzumenata alkohola te cigareta (Slika 8).



Slika 8. Raspodjela uzorka prema spolu i konzumiranju cigareta i alkohola

Starosna struktura uzorka kreće se rasponu od najmlađeg pacijenta starosne dobi 31 godine do najstarijeg pacijenta 87 godina. Prosječna dob svih pacijenata je približno 62 godine ($61,7 \pm 11,6$). **Od ukupnog broja pacijenata 50% pacijenata je staro 61 godina ili manje od 61 godine, a druga polovina 50% pacijenata koji su činili uzorak su stariji od 61 godine.**

Analiza starosne dobi u skupinama prema spolu pokazala je da su žene, odnosno pacijentice, bile nešto starije od muškaraca, odnosno muških pacijenata. Prosječna dob pacijentica je približno 63 godine ($63,4 \pm 14,1$), a pacijenata približno 61 godina ($61,1 \pm 10,6$).

U deskriptivnoj analizi uzorka raspodjela prema konzumiranju cigareta i alkohola je asimetrična pri čemu prevladavaju pušači i konzumenti alkohola. Samo 26 (približno 34%) pacijenata nikada nije konzumiralo cigarete i alkohol, dok su njih 50 (približno 66%) konzumirali cigarete i alkohol (Slika 8)

Za potrebe istraživanja važne su i druge demografske i kliničke karakteristike ispitanika unutar uzorka (Tablica 4).

Tablica 4. Karakteristike pacijenata i lokacija tumora

Karakteristike		Opseg uzorka (n = 76)	HPV-pozitivni (n = 18)	HPV-negativni (n = 58)
Spol	Ženski	20 (26%)	4 (22%)	16 (28%)
	Muški	56 (74%)	14 (78%)	42 (72%)
Starosna dob	Prosjek $\pm$ SD	61,7 $\pm$ 11,6	59,6 $\pm$ 15,5	62,4 $\pm$ 10,1
	Medijan	61	61,5	61
	Raspon	31–87	31–87	42–85
	0 – 64	46 (60%)	11 (61%)	35 (60%)
	65 +	30 (40%)	7 (39%)	23 (40%)
Stil života (cigarete i alkohol)	nisu konzumirali	26 (34%)	8 (44%)	18 (31%)
	samo cigarete	5 (7%)	1 (6%)	4 (7%)
	cigarete i alkohol	45 (59%)	9 (50%)	36 (62%)
Lokacija tumora	Usna šupljina	60 (79%)	12 (67%)	48 (83%)
	gingiva	17 (22%)	3 (17%)	14 (24%)
	jezik	16 (21%)	2 (11%)	14 (24%)
	sublingvalno područje	16 (21%)	5 (28%)	11 (19%)
	retromolar	9 (12%)	2 (11%)	7 (12%)
	sluznica	2 (3%)	0 (0%)	2 (3%)
	Orofarinks	16 (21%)	6 (33%)	10 (17%)
	baza jezika	8 (10%)	1 (6 %)	7 (12%)
	krajnik	7 (9%)	5 (28%)	2 (3%)
	stražnji zid	1 (1%)	0 (0%)	1 (2%)

U uzorku prevladavaju tumori u usnoj šupljini kojih je bilo 60 (79%), a drugi dio tumora je lokaliziran u orofarinksu kod 16 (21%) pacijenata.

Pacijenti u uzorku razvrstani su prema HPV statusu u dvije skupine i to HPV-pozitivni i HPV-negativni. U skupini HPV-pozitivnih bilo je 18 (24%) pacijenata, a HPV-negativnih bilo je 58 (76%) pacijenata. Prema starosnoj dobi HPV-pozitivni pacijenti su mlađi od HPV-negativnih pacijenata približno za 3 godine ($52,6 \pm 15,5$ godina u odnosu na $62,4 \pm 10,1$ godine). Ova razlika prosječne starosti jedne i druge skupine testirana je statističkim T-testom i razlika se pokazala statistički neznačajnom.

Odnosno razlika nije bila statistički značajna (t-test, $p = 0,4749$). Među HPV pozitivnim tumorima HPV16 nađen je u većini slučajeva (77,7%, 14/18).

Lokalizacija tumora i HPV status povezani su na sljedeći način. Status HPV-pozitivan i tumor u usnoj šupljini bio je kod 12 (67%) pacijenata, a 48 (83%) pacijenata je bilo sa statusom HPV-negativni i tumor u usnoj šupljini. Slična je slika i kod pacijenata sa tumorom u području orofarinksa, od njih ukupno 16, 6 (33%) je HPV-pozitivnih, a 10 (17%) je bilo HPV-negativnih.

Klinički stadij tumora kod analiziranih pacijenata i pridružena terapija ne pokazuju statistički značajne razlike s obzirom na HPV status (Tablica 5).

Tablica 5. Klinički stadij tumora i terapija

Karakteristike		Opseg uzorka (n = 76)	HPV-pozitivni (n = 18)	HPV-negativni (n = 58)
cT – klinički stadij primarnog tumora	1	6 (8%)	2 (11%)	4 (7%)
	2	26 (34%)	5 (28%)	21 (36%)
	3	21 (28%)	5 (28%)	16 (28%)
	4a	23 (30%)	6 (33%)	17 (29%)
cN Klinički stadij tumora koji je zahvatio limfne čvorove	0	35 (46%)	7 (39%)	28 (48%)
	1	20 (26%)	5 (28%)	15 (26%)
	2	17 (22%)	5 (28%)	12 (21%)
	3	4 (5%)	1 (5%)	3 (5%)
Ukupni klinički stadij	I	3 (4%)	0 (0%)	3 (5%)
	II	18 (24%)	2 (11%)	16 (28%)
	III	19 (25%)	6 (33%)	13 (22%)
	IV	IVa – 32 (42%) IVb – 4 (5%)	9 (50%) 1 (5%)	23 (40%) 3 (5%)
Terapija	kirurgija	45 (59%)	10 (56%)	35 (60%)
	kirurgija+RT	31 (41%)	8 (44%)	23 (40%)

Klinički stadij primarnog tumora klasificiran je kao T2 kod većine pacijenata najviše pacijenata, njih 26 (34%), zatim slijedi stadij T4a sa udjelom od 30% pacijenata, potom T3 i T1. U sve četiri skupine, prema kliničkom stadiju, HPV-pozitivnih je bilo približno trećina nasuprot dvije trećine HPV-negativnih. Klinički stadij cN tumora koji je zahvatio limfne čvorove zabilježen je u 41 pacijent što je približno 54% cijelog uzorka. Svi pacijenti su podvrgnuti kirurgiji. Kirurški zahvat kao jedina terapija proveden je kod 45 (59%) pacijenata, a 31 (41%) pacijent je nakon operativnog zahvata primio i radioterapiju (RT). Histopatološki podaci tumora glave i vrata za analizirani uzorak pacijenata upućuju na specifične karakteristike diferencijacije i proširenosti bolesti (Tablica 6).

Tablica 6. Histopatološki podaci tumora glave i vrata

Karakteristike		Opseg uzorka (n = 76)	HPV-pozitivni (n = 18)	HPV-negativni (n = 58)
pT - stadij primarnog tumora	1	6 (8%)	2 (11%)	4 (7%)
	2	30 (40%)	5 (28%)	25 (43%)
	3	15 (20%)	3 (17%)	12 (21%)
	4a	25 (33%)	8 (44%)	17 (29%)
pN - stadij tumora lokalno zahvaćeni limfni čvorovi	X	11 (14%)	5 (28%)	6 (10%)
	0	27 (36%)	3 (17%)	24 (41%)
	1	8 (11%)	1 (6%)	7 (12%)
	2	21 (28%)	5 (28%)	16 (28%)
	3	9 (12%)	4 (22%)	5 (9%)
Ukupni patološki stadij	I	4 (5%)	1 (6%)	3 (5%)
	II	17 (22%)	2 (11%)	15 (26%)
	III	12 (16%)	3 (17%)	9 (15%)
	IV	IVa – 34 (45%)	8 (44%)	26 (45%)
		IVb – 9 (12%)	4 (22%)	5 (9%)
Invazija	neinvazivno	26 (34%)	6 (33%)	20 (35%)
	perineuralno	32 (42%)	8 (44%)	24 (41%)
	angio+perine	18 (24%)	4 (22%)	14 (24%)
Odstranjeni limfni čvorovi	0	10 (13%)	4 (22%)	6 (10%)
	1–10	8 (11%)	1 (6%)	7 (12%)
	11–20	17 (22%)	2 (11%)	15 (26%)
	21 +	41 (54%)	11 (61%)	30 (52%)

Histopatološki stadij primarnog tumora (pT stadij) približno je jednako raspodijelio pacijente kao i klinički stadij primarnog tumora (cT stadij). Testirana je podudarnost raspodjele pacijenata prema zabilježenom pT stadiju i raspodjele prema cT stadiju i pokazalo se da je podudarnost izrazito visoka (Kappa = 0,68; 95% CI 0,55–0,81).

Slaganje, odnosno podudarnost između raspodjele pacijenata prema cN i pN stadiju tumora bila je niža (Kappa = 0,48; 95% CI 0,56 – 0,61). Ako u histopatološkim podacima pacijente s pNX stadijem spojimo sa pN0 tada je podudarnost/sličnost visoka (Kappa = 0,65; 95% CI 0,52 – 0,77). Podudarnost između ukupnog patološkog i ukupnog kliničkog stadija postoji i izrazito je visoka (Kappa = 0,74; 95% CI 0,61–0,87).

Histološki je većina pacijenata 35 (46%) imala tumor II stupnja. Perineuralna ili angioperineuralna invazija bila je prisutna u natpolovičnoj većini tumora i to u njih 50 (66%). Kod 26 pacijenata nije bilo zabilježenih znakova invazije. Kod više od pola pacijenata, približno 54% njih odstranjeno je više od 21 limfni čvor (Tablica 6).

Promjene u ekspresiji analizirane molekule miRNA-21 u odnosu na kontrolni uzorak u ispitivanoj populaciji i podskupinama opisane su medijanom i interkvartilnim rasponom (Tablica 7).

Tablica 7. Medijan i interkvartilni raspon promjena molekule miRNA-21 s obzirom na stadij i anatomsku regiju karcinoma

miRNA 21 Stadij oralnog/orofaringealnog karcinoma	Medijan	Donji kvartil	Gornji kvartil	Interkvartilni raspon
Cijeli uzorak (n = 76)	3,6	2,3	5,5	3,2
HPV-negativni (n = 58)	3,8	2,5	5,5	3,0
HPV-pozitivni (n = 18)	3,0	1,7	7,5	5,8
Ukupno O (n = 60)	3,7	2,5	5,6	3,1
O- (n = 48)	3,7	2,6	5,3	2,7
O+ (n = 12)	3,5	2,1	9,7	7,6
Ukupno OP (n = 16)	3,3	1,9	4,3	2,4
OP- (n = 10)	4,0	2,4	7,6	5,2
OP+ (n = 6)	2,2	1,5	3,1	1,6

* O – tumor u oralnom stadiju; † O– – HPV-negativni tumor u oralnom stadiju; ‡ O+ – HPV-pozitivni tumor u oralnom stadiju; § OP – tumor u orofaringealnoj regiji; || OP– – HPV-negativni tumor u orofaringealnoj regiji; ¶ OP+ – HPV-pozitivni tumor u orofaringealnoj regiji.

Medijalna promjena miRNA 21 u cijelom uzorku je 3,6 što znači da je 50% svih pacijenata imalo promjene na molekuli miRNA 21 manje ili jednake 3,6 dok je 50% svih pacijenata imalo promjene veće ili jednake od 3,6. Donji kvartil je 2,3 što znači da je 25% pacijenata imalo promjenu na molekuli miRNA 21 manju ili jednaku 2,3 a 75% pacijenata je imalo promjenu na

molekuli miRNA 21 manju ili jednaku 2,3 a 75% pacijenata je imalo promjenu veću ili jednaku 2,3. Interkvartilni raspon je 3,2 i predstavlja mjeru raspršenosti što znači da je 50% pacijenata imalo vrijednost promjena miRNA 21 unutar intervala širine 3,2, odnosno veću od 2,3 i manju od 5,5.

U skupini HPV- negativnih medijalna vrijednost miRNA 21 bila je 3,8 dok je kod HPV-pozitivnih pacijenata medijan miRNA 21 bio manji i iznosio 3,0.

Kod pacijenata u stadiju oralnog karcinoma promjena miRNA 21 medijalna vrijednost je 3,7 za cijelu skupinu kao i za dio pacijenata koji su bili HPV-negativni sa stadijem oralnog karcinoma. Nešto manja promjena miRNA 21 u iznosu 3,5 bila je kod HPV-pozitivnih pacijenata sa oralnim karcinomom. Ovaj medijan (3,5) prati veći interkvartilni raspon (IQR) 7,6 što znači da je u ovoj skupini (O+) pacijenata bilo 25% onih koji su imali promjenu miRNA manju od 2,1 i pri tome 25% onih koji su imali primjenu miRNA 21 veću od 9,7.

Kod pacijenata sa orofaringealnim karcinomom promjena miRNA 21 je 3,3 što je nešto manje nego kod onih sa oralnim karcinomom. HPV-pozitivni pacijenti sa orofaringealnim karcinomom (OP+) imaju najmanju medijalnu promjenu miRNA 21 i iznosi 2,2 a prati je najmanji interkvartilni raspon 1,6.

Klinički status pacijenata nakon utvrđene bolesti i provedene terapije, kao i podaci o ukupnom preživljenju, ukazuju na ishode liječenja unutar ispitivanog uzorka (Tablica 8).

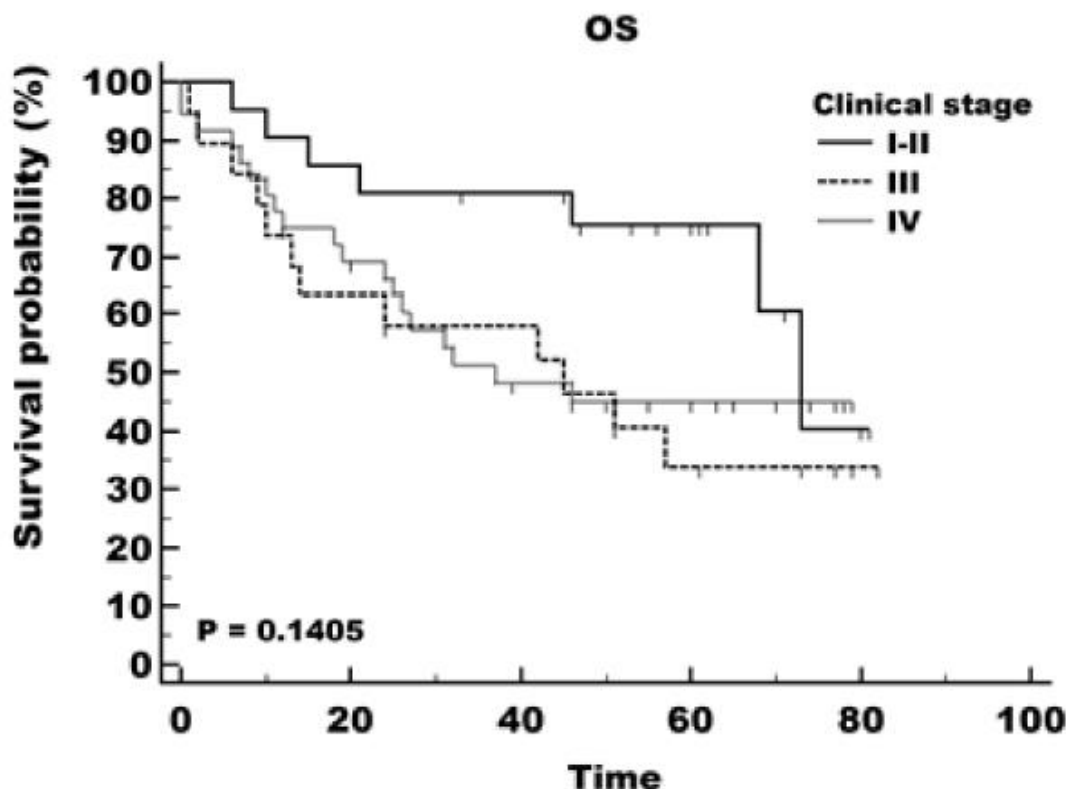
Tablica 8. Karakteristike pacijenta nakon liječenja

Karakteristike pacijenata		Opseg uzorka (n = 76)	HPV-pozitivni (n = 18)	HPV-negativni (n = 58)
Nakon liječenja	Preživjeli	38 (50%)	10 (56%)	28 (48%)
	Nema znakova bolesti	36 (47%)	9 (50%)	27 (47%)
	Živ sa znakovima bolesti	2 (3%)	1 (6%)	1 (2%)
	Umro od drugih uzroka	23 (30%)	3 (17%)	20 (34%)
	Umro od bolesti	15 (20%)	5 (28%)	10 (17%)
Događaji nakon liječenja	Ponavljanje bolesti	13 (17%)	4 (22%)	9 (15%)
	Udaljene metastaze	17 (22%)	4 (22%)	13(22%)
	Sekundarni maligni tumor	16 (21%)	3 (17%)	13 (22%)
	Medijalno vrijeme praćenja bolesti (u mjesecima)	45,5	40,5	46

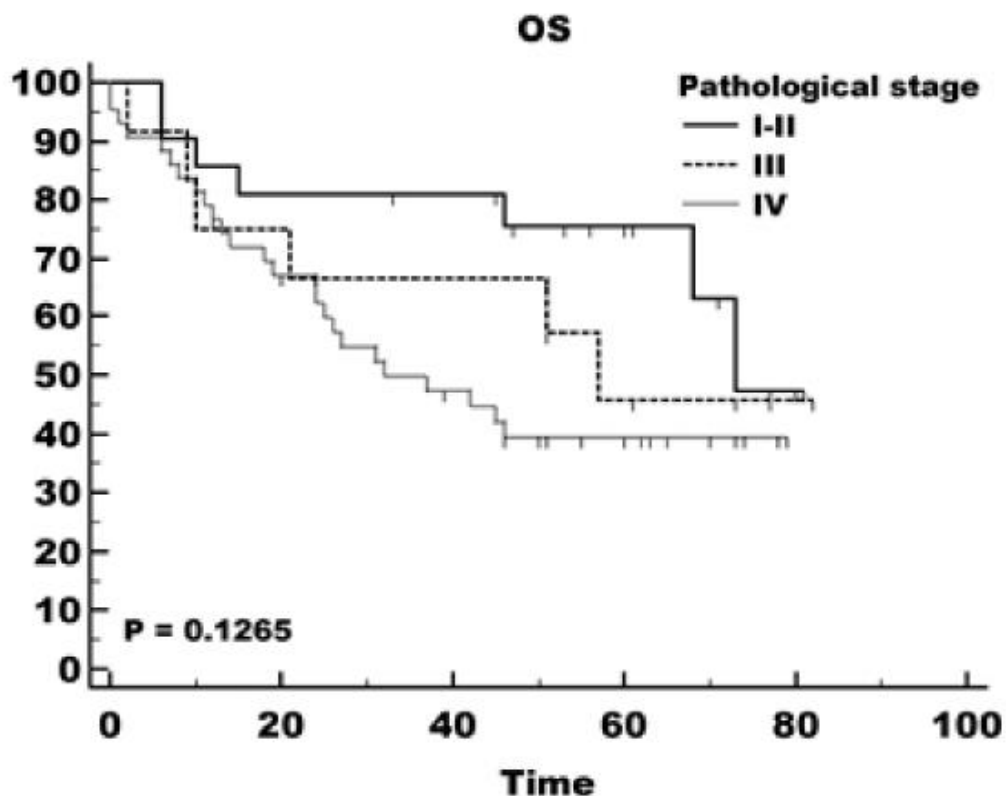
Medijalno vrijeme praćenja svih pacijenata je 45,5 mjeseci s rasponom od 0 do 82 mjeseca za cijelu populaciju. Drugim riječima 50% svih pacijenata je praćeno do konačnog ishoda manje ili točno 45,5 mjeseci, a za ostalih 50% pacijenata vrijeme praćenja je bilo 45,5 ili više mjeseci.

Medijan vremena praćenja živih pacijenata bio je 61 mjesec. Medijalno vrijeme praćenja HPV-pozitivnih pacijenata je 5 mjeseci kraće, a kod HPV-negativnih pacijenata je 1 mjesec duže medijalno vrijeme praćenja u odnosu na cijeli uzorak. Polovina pacijenata 38/76 (50%) je preživjela bolest, a većina preživjelih (36/38 = 95%) nije imala znakove bolesti, a polovina pacijenata 50% (38/76) nije preživjela. Razlika u stopi preživljenja između pacijenata s HPV-pozitivnim 10/18 (56%) i onih s HPV-negativnim tumorom 28/58 (48%) nije značajno velika, preživjelih u obje skupine približno 50%. **Ukupna stopa preživljenja bila je veća među ženama u odnosu na muškarce (70% naspram 42,9%). Ukupna stopa preživljenja u odnosu na stadij bila je sljedeća: 14/21 (67%) stadij I – II, 7/19 (37%) stadij III i 17/36 (47%) stadij IV.**

Procijenjeno petogodišnje preživljenje (Kaplan-Meierova analiza) bilo je 76% za stadij I–II, 34% za stadij III i 45% za stadij IV. Međutim, razlika između krivulja preživljenja kada je stadij određen prema kliničkim i patološkim TNM parametrima nije bila statistički značajna ($p = 0,1405$ i $p = 0,1265$) (Slika 9 i Slika 10).

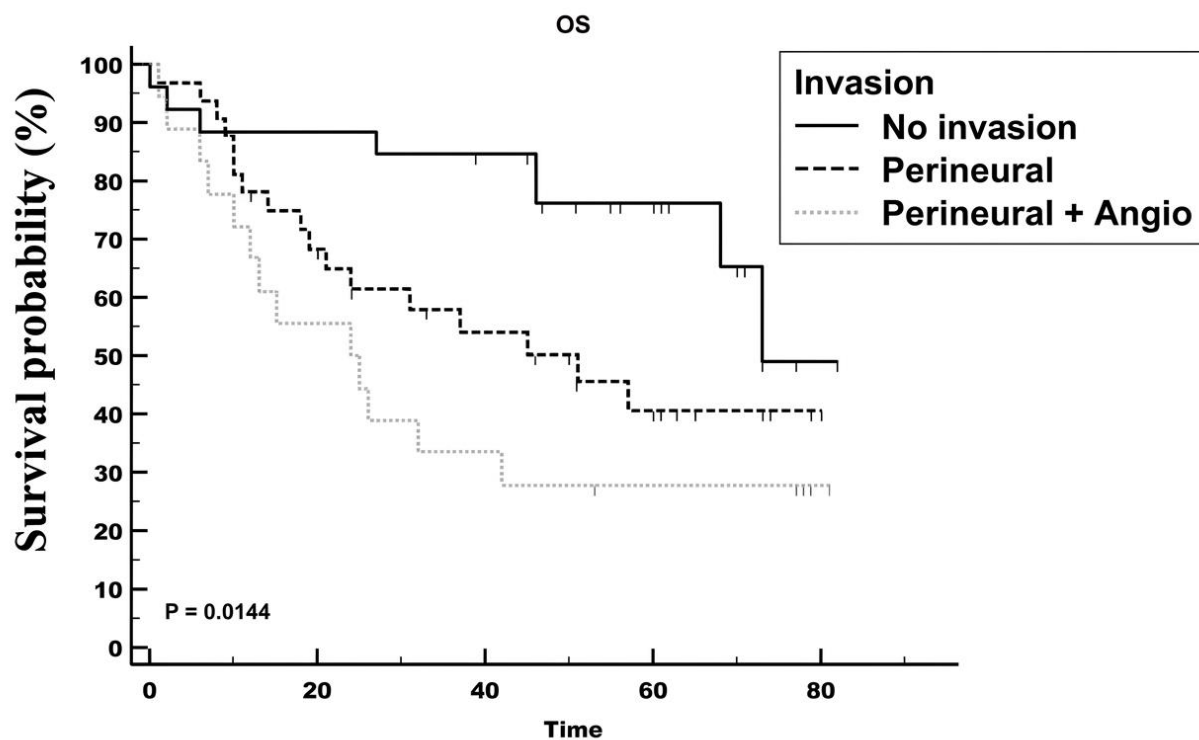


Slika 9. Ukupno preživljenje (OS) pacijenata s različitim stadijima raka glave i vrata prema kliničkim TNM parametrima

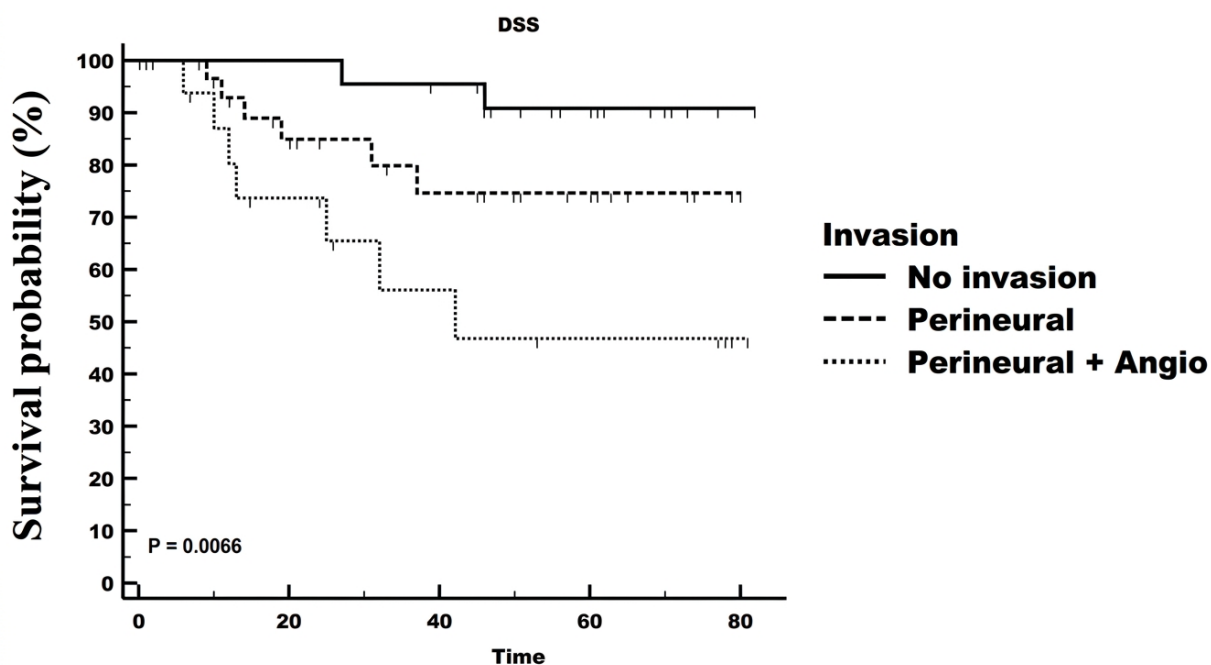


Slika 10. Ukupno preživljenje (OS) pacijenata s različitim stadijima raka glave i vrata prema patološkim TNM parametrima

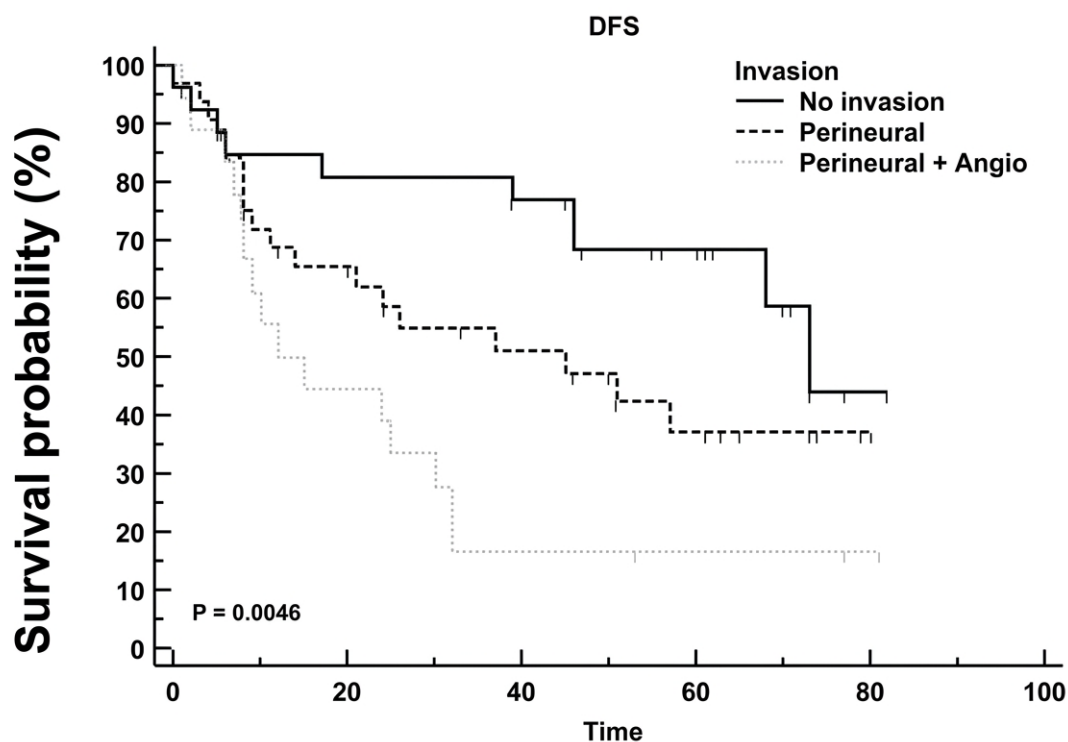
Kaplan-Meierova analiza provedena je za sve analizirane parametre prema preživljenju: ukupno preživljenje (OS) (Slika 11), preživljenje specifično za bolest (DSS) (Slika 12) i preživljenje bez bolesti (DFS) (Slika 13), a sve krivulje prikazane su u nastavku.



Slika 11. Ukupno preživljenje pacijenata s različitim vrstama invazija



Slika 12. Preživljenje specifično za boleš pacijenata s različitim vrstama invazija



Slika 13. Preživljenje bez bolesti pacijenata s različitim vrstama invazije

Zanimljivo je kako je prisutnost invazije dosljedno povezana sa značajno različitim krivuljama preživljenja za sva tri procijenjena ishoda (ukupno preživljenje – OS, preživljenje specifično za bolest – DSS i preživljenje bez bolesti – DFS). U svim slučajevima, bez invazije, perineuralne i angioinvazije bio je povezan s lošijim ishodima (OS $p = 0,0144$; DSS $p = 0,0066$; DFS $p = 0,0046$).

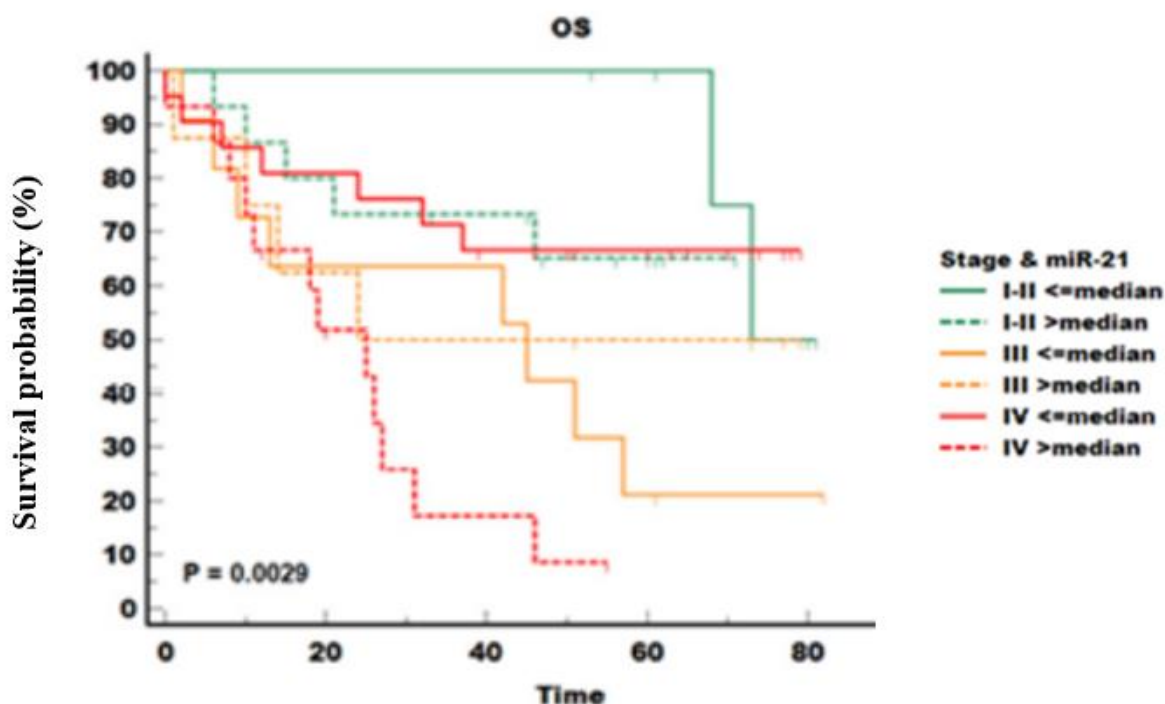
U svrhu testiranja značajnosti utjecaja miRNA-21 na ekspresiju i preživljavanje bolesnika s oralnim/orofaringealnim karcinomom urađena je višestruka Coxova regresijska analiza za ukupno preživljenje (OS), preživljenje specifično za bolest (DSS) i preživljenje bez bolesti (DFS). Sva tri modela su ukupno značajna. Sva tri modela su ukupno značajna (Tablica 9).

Tablica 9. Višestruki Coxov regresijski model rizika za preživljenje

	Ukupno preživljenje (OS)	
Pacijenti	38/76	
Značajnost cijelog modela	p < 0,001	
	Omjer rizika (95%-tni interval pouzdanosti)	p
Starosna dob 65+ vs <65	-	-
Spol M vs Ž	3,1 (1,1–8,7)	0,027
Cigarete vs nikad cigareta/nikad alkohol	2,1 (0,4 – 10,7)	0,360
Cigarete/alkohol vs nikad cigarete/alkohol	1,7 (0,7 – 4,1)	0,206
Stadij III vs I-II	1,6 (0,5–4,9)	0,419
Stadij IV vs I-II	1,1 (0,4–3,5)	0,839
Perivaskularno vs neinvazivno	2,8 (0,8 – 9,6)	0,099
Obje invazije vs neinvazivno	4,3 (1,4–13,6)	0,014
Resekcijski rub nije urađeno vs čisto (> 5 mm)	4,5 (1,5–13,6)	0,008
Resekcijski rub (< 5 mm) vs čisto (> 5 mm)	1,9 (0,7–4,7)	0,190
Odstranjeni limfni čvorovi (1 – 10) vs 0	11,6 (1,2–9,7)	0,033
Odstranjeni limfni čvorovi (11 – 20) vs 0	5,3 (0,6–46,9)	0,134
Odstranjeni limfni čvorovi (21 +) vs 0	4,7 (0,6–40,1)	0,156
miRNA 21	1,1 (1–1,2)	0,011

Model višestruke Coxove regresije za ukupno preživljavanje je značajan ($p < 0,001$), analizirano na cijelom uzorku pacijenata. Unutar modela kao statistički značajne varijable pokazale su se: varijabla „spol“ ($p = 0,027$), „obje invazije“: perineuralna i angioinvazija ($p = 0,014$), resekcijski rub ($p = 0,008$), odstranjeni limfni čvorovi (1–10) ($p = 0,033$) i ekspresija/promjene miRNA 21 ($p = 0,011$).

Varijabla ekspresija miRNA 21 je pokazala statističku značajnost u višestrukome modelu Coxove regresije pa je dodatno analiziran učinak miRNA-21 na preživljavanje u različitim kategorijama stadija karcinoma koristeći Kaplan-Meierovu analizu (OS, $p = 0,0029$) (Slika 14).



Slika 14. Povezanost ekspresije miR-21 s ukupnim preživljenjem bolesnika s obzirom na klinički stadij karcinoma glave i vrata

Ozbiljnost raka označena bojom: stadij I–II zeleno, stadij III narančasto i stadij IV crveno. Točkaste linije označavaju pacijente s vrijednostima iznad medijana ekspresije naznačene miRNA-21.

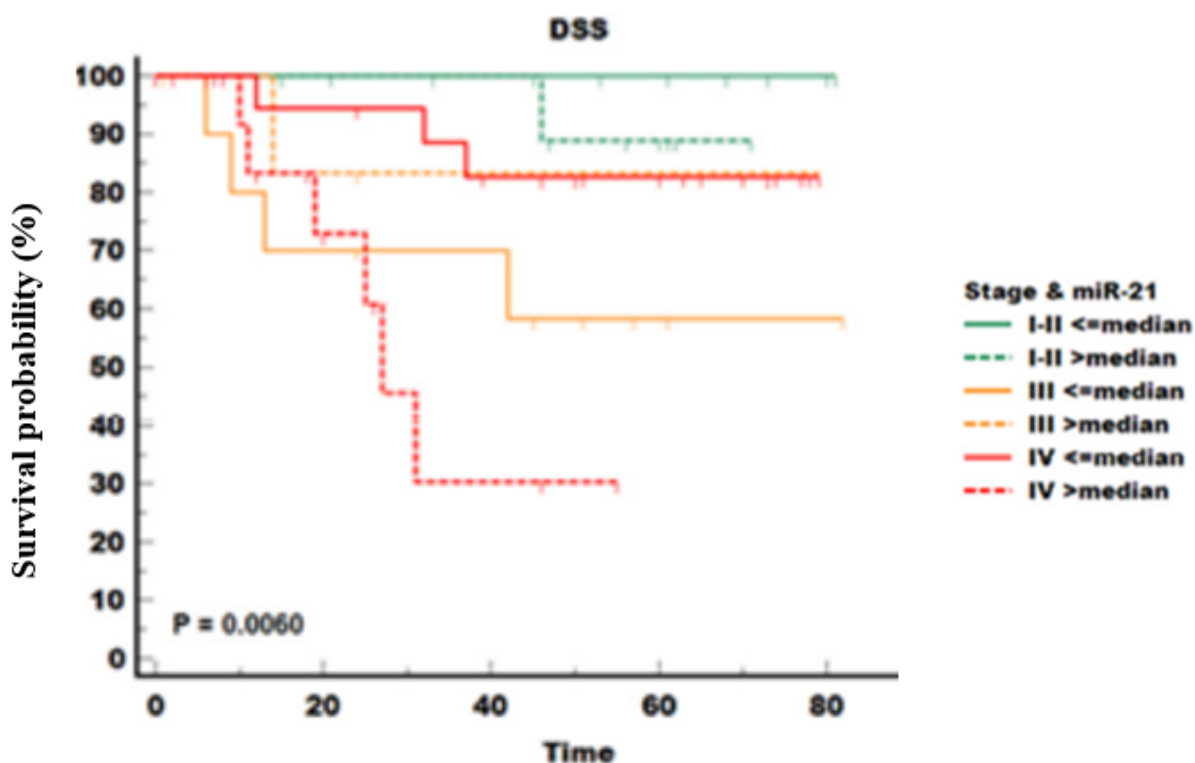
Model preživljenja specifično za bolest (DSS) također ima izračunati koeficijent značajnosti manji od 0,05 ($p=0,028$), što znači da je model u cijelosti statistički značajan iako ni jedna od neovisnih varijabli nije pokazala statističku značajnost u modelu (Tablica 10).

.

Tablica 10. Višestruki Coxov regresijski model rizika za preživljenje specifično za bolest

	Preživljenje specifično za bolest (DSS)	
Pacijenti	14/69	
Značajnost cijelog modela	p = 0,028	
	Omjer rizika (95%-tni interval pouzdanosti)	p
Starosna dob 65+ vs <65	-	-
Spol M vs Ž	-	-
Cigarete vs nikad cigareta/nikad alkohol	-	-
Cigarete/alkohol vs nikad cigarete/alkohol	-	-
Stadij III vs I-II	3,9 (0,4–38,6)	0,244
Stadij IV vs I-II	3,5 (0,4–31,9)	0,265
Perivaskularno vs neinvazivno	3,9 (0,5–30,5)	0,192
Obje invazije vs neinvazivno	3,9 (0,6–27,8)	0,169
Resekcijski rub nije urađeno vs čisto (> 5 mm)	8,3 (0,7–96,1)	0,089
Resekcijski rub (< 5 mm) vs čisto (> 5 mm)	5 (0,6–42,1)	0,143
Odstranjeni limfni čvorovi (1 – 10) vs 0	-	-
Odstranjeni limfni čvorovi (11 – 20) vs 0	-	-
Odstranjeni limfni čvorovi (21 +) vs 0	-	-
miRNA-21	-	-

Učinak miRNA-21 na preživljenje specifično za bolest u različitim kategorijama stadija karcinoma koristeći Kaplan-Meierovu analizu (DSS, $p=0,0060$). Rezultati su pokazali da su povišene razine miRNA-21 nezavisna varijabla loše prognoze za preživljenje specifično za bolest s posebno jakim razlikama kod raka stadija IV (Slika 15).



Slika 15. Povezanost ekspresije miR-21 s preživljenjem bolesnika s različitim stadijima raka glave i vrata prema preživljenju specifičnom za bolest

Treći model višestruke Coxove regresije „preživljavanje bez znakova bolesti“ (DFS) pokazao se statistički značajnim ($p < 0,001$). U modelu statistički je značajno 6 nezavisnih varijabli (Tablica 11).

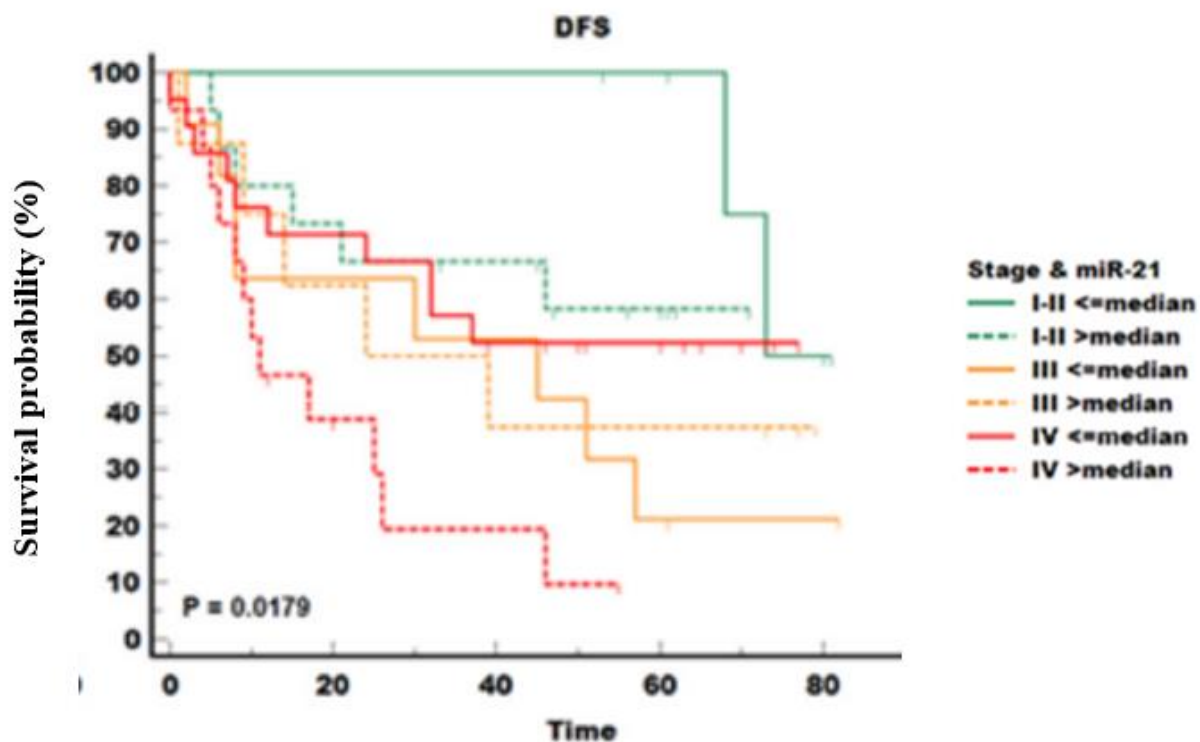
Tablica 11. Višestruki Coxov regresijski model za preživljavanje bez bolesti

	Preživljenje bez bolesti (DFS)	
Pacijenti	43/76	
Značajnost cijelog modela	p < 0,001	
	Omjer rizika (95%-tni interval pouzdanosti)	p
Starosna dob 65+ vs <65	3 (1,4–6,4)	0,0042
Cigarete vs nikad cigareta/nikad alkohol	-	-
Cigarete/alkohol vs nikad cigarete/alkohol	-	-
Stadij III vs I-II	1,2 (0,5–3,3)	0,674
Stadij IV vs I-II	1,4 (0,6–3,7)	0,464
Perivaskularno vs neinvazivno	2,8 (1–8)	0,049
Obje invazije vs neinvazivno	4 (1,5–10,9)	0,007
Resekcijski rub nije urađeno vs čisto (> 5 mm)	3,1 (1,2–8)	0,019
Resekcijski rub (< 5 mm) vs čisto (> 5 mm)	1,5 (0,6–3,7)	0,345
Odstranjeni limfni čvorovi (1 – 10) vs 0	10 (1,8–54,2)	0,008
Odstranjeni limfni čvorovi (11 – 20) vs 0	2,7 (0,6–13,4)	0,216
Odstranjeni limfni čvorovi (21 +) vs 0	5 (1,1–23,7)	0,041
miRNA 21	1,1 (1–1,2)	0,002

Među statistički značajnim varijablama su, ponovo kao i u modelu ukupno preživljavanje (OS), obje invazije, resekcijski rub, odstranjeni limfni čvorovi (1–10) i (21 +) i ekspresija miRNA21. Sve ove varijable su statistički značajne u modelu, pripadajući koeficijenti ($p < 0,05$) istaknuti u tablici.

Budući je varijabla ekspresija miRNA-21 pokazala statističku značajnost u višestrukom Coxovom regresijskom modelu, dodatno je analiziran učinak miRNA-21 na preživljenje u različitim kategorijama stadija karcinoma koristeći Kaplan-Meierovu analizu (DFS, $p = 0,0179$) (Slika 16).

Ekspresija miR-21 je jako utjecala na preživljenje bolesnika s različitim stadijima raka glave i vrata prikazana u odnosu na medijan prema preživljenju bez bolesti.



Slika 16. Povezanost ekspresije miR-21 s preživljenjem bolesnika s različitim stadijima raka glave i vrata prema preživljenju bez bolesti

Visoka ekspresija miRNA-21 snažno je utjecala na preživljenje pacijenta sa stadijem III ili stadijem IV karcinoma, dok krivulje preživljenja pacijenta stadija I–II gotovo nisu bile pogođene ekspresijom miRNA-21.

6. RASPRAVA

Karcinomi usne šupljine i orofarinksa predstavljaju značajan javnozdravstveni problem u cijelom svijetu, sa značajnim porastom incidencije i smrtnosti. Prema statistikama Svjetske zdravstvene organizacije (WHO), ovi tumori posebno su rasprostranjeni među muškarcima, a njihova povezanost s HPV-om dodatno ukazuje na potrebu za razumijevanjem molekularnih mehanizama koji pridonose njihovu razvoju (158). Glavni rezultati ovog istraživanja su pokazali da je ekspresija miRNA-21 statistički značajno povišena u uznapredovalim stadijima (III–IV) OSCC-a i OPSCC-a, pri čemu visoke razine miRNA-21 koreliraju s lošijim preživljenjem u tim stadijima prema Kaplan–Meier analizi. Međutim, nije uočena značajna razlika u ekspresiji miRNA-21 između HPV-pozitivnih i HPV-negativnih karcinoma, što ukazuje da prognostička uloga miRNA-21 djeluje neovisno o HPV statusu te iako se u drugim istraživanjima implicira moguća povezanost između HPV onkoproteina i miRNA-21 u ovom istraživanju nije pronađena statistički značajna korelacija (37).

Kako je već prethodno spomenuto u većini epidemioloških studija su OSCC i OPSCC učestaliji u muškaraca, a rezultati ove studije također imaju asimetrično raspodijeljenu spolnu strukturu uzorka u korist muškaraca, njih 56 (74%) te 20 (26%) žena, čime se potvrđuju rezultati studija u kojima se najčešće spominje omjer 3:1 (159). Nadalje, i prosječna dob ukupnog uzorka ove studije je bila 62 godine starosti što odgovara podacima iz literature za klasični HPV-negativni OSCC i OPSCC, posebno uzimajući u obzir da je HPV-pozitivnih ispitanika bilo tek 18 (24%) dok je HPV-negativnih bilo 58 (76%) (160). Dakle opći sociodemografski podatci našega uzorka su konzistentni s literaturom koja opisuje da su HNSCC učestaliji u muškaraca srednje i starije životne (161). Međutim, gledajući detaljnije analize prema starosnoj dobi, HPV-pozitivni bolesnici su bili mlađi od HPV-negativnih bolesnika tek za približno 3 godine što i nije sasvim u skladu s dosadašnjim uvriježenim mišljenjem da su bolesnici s HPV-pozitivnim OSCC-om i OPSCC-om uglavnom statistički značajno mlađi od bolesnika s HPV-negativnim OSCC-om i OPSCC-om (162). No, iako HPV-pozitivni bolesnici s HNSCC-om pokazuju tendenciju da budu mlađi od HPV-negativnih, novija epidemiološka istraživanja pokazuju da se dob pri dijagnozi HPV-pozitivnog OPSCC-a brzo povećava, uz istovremeno značajno povećanje proporcije OPSCC-a uzrokovanih HPV-om u svim dobnim skupinama, osobito među starijim odraslim osobama. Ova promjena u epidemiološkim karakteristikama potkopava prvobitnu pretpostavku da HPV-pozitivni OPSCC isključivo zahvaća mlađu populaciju. Ovo je posebno klinički važno jer je opažena i oslabljena prednost preživljenja koju daje HPV-

pozitivan status tumora među rastućom populacijom starijih osoba s OPSCC-om. Tako je nedavna studija pokazala da bolesnici s HPV-pozitivnim OPSCC-om imaju petogodišnju stopu preživljenja od 85,75% u usporedbi s 11,15% za HPV-negativni karcinom, no ova prognostička prednost manje je izražena u starijoj populaciji (163). Nadalje, nedavni sustavni pregledni rad pokazao je kako su HPV-pozitivni bolesnici prosječno dobi od 53,3 godine u odnosu na 60,8 godina starosti u bolesnika s HPV-negativnim OSCC-om i OPSCC-om što također potkrepljuje činjenicu da se ta dobna razlika između HPV-pozitivnih i HPV-negativnih rapidno smanjuje (164).

HPV status i njegov utjecaj na ekspresiju miRNA-21 bio je jedan od primarnih ciljeva ove studije. HPV je poznati faktor rizika za razvoj OSCC-a, a posebice OPSCC-a (164, 165). Tako je HPV tip 16 pronađen u većini HNSCC-a povezanih s HPV-om te je sposoban transformirati zaražene stanice u kancerogene ekspresijom svojih onkoproteina E6 i E7 (10). Rezultati lokalizacijske distribucije HPV-pozitivnih OSCC-a i OPSCC-a u ovoj studiji odgovaraju dosadašnjim podacima u literaturi (166). Tako je HPV-pozitivnih OSCC-a u usnoj šupljini bilo 12 (20%) dok je HPV-negativnih OSCC-a bilo 48 (80%). Slična je slika i kod pacijenata s OPSCC: od ukupno 16 bolesnika, njih 6 (37.5%) bilo je HPV-pozitivnih, a 10 (62.5%) HPV-negativnih. Ta raspodjela samo parcijalno odgovara dosadašnjim podacima u literaturi jer ovaj relativno visok udio HPV-pozitivnih OSCC-a (20%) premašuje globalno prijavljenu prevalenciju od približno 10% za OSCC, ali ostaje znatno niži od prevalencije HPV-a od 42-65% koja se obično opaža kod OPSCC (166, 167, 168). Naime, dobro je utvrđeno kako je HPV više povezan s razvojem OPSCC-om nego s OSCC-om te prema literaturi u nekim regijama HPV-pozitivni OPSCC čini čak i do 70% svih OPSCC-a (169, 170). Udio HPV-pozitivnog OPSCC-a posebno je u porastu u SAD-u i Europi što se objašnjava padom konzumacije alkohola i duhana, koji su primarni etiološki čimbenici rizika za HPV-negativni OPSCC. S druge strane, HPV-pozitivni OSCC nije toliko zastupljen u ukupnom broju OSCC-a (165).

Nekoliko važnih čimbenika utječe na ovaj nesrazmjer između HPV-pozitivnog OSCC-a i OPSCC-a. Prvo, HPV se spolno prenosi i posljedično se češće veže za orofarinks nego za usnu šupljinu. Drugo, HPV je mnogo prolazniji u usnoj šupljini zbog epitelne sluznice koja je manje pogodna za HPV, naime stratificirani epitel usne šupljine nema istu razinu kripti i limfoidnog tkiva u usporedbi s onima prisutnima u orofarinksu (171). Posljedično, HPV infekcija je mnogo perzistentnija u orofarinksu zbog retikularnog epitela i kripti koje zadržavaju virus. Stoga

epidemiološki profil našeg uzorka relativno odgovara globalnom obrascu incidencije ovih malignoma.

Poseban naglasak u ovom istraživanju je bio na miRNA-21. Naime, miRNA su zadnjih godina sve više u fokusu znanstvene zajednice zbog važnosti u karcinogenezi, ali i kao mogući prognostički i terapijski ciljevi. Tako nedavne studije ukazuju na to da bi ekspresija miRNA-21 mogla imati prognostičku vrijednost u pogledu preživljavanja pacijenata s OSCC/OPSCC, a najnovija meta-analiza pokazala je da je visoka ekspresija miRNA-21 karakterizirana pogoršanjem ukupnog preživljavanja (171). Štoviše, druga nedavna meta-analiza pokazala je da se čak i razine miRNA-21 u cirkulaciji mogu koristiti kao dijagnostički biomarker za OSCC/OPSCC (172). Molekularni mehanizmi preko kojih miRNA-21 utječe na staničnu biologiju povezani su s regulacijom apoptotskih i proliferacijskih puteva. Mi-RNA 21 može aktivirati proonkogenske faktore i inhibirati tumorsupresorske gene, što dodatno stvara povoljno mikrookruženje za preživljavanje i rast tumora (135). U skladu s prethodnim studijama, naša studija je pokazala da su povišene razine miRNA-21 neovisni prediktor loše prognoze, s posebno jakim razlikama u OSCC-u/OPSCC-u stadija IV (173, 174). Ovi rezultati ukazuju na potencijalnu ulogu miRNA-21 kao onkogenog biomarkera i sugerira da njezine visoke razine mogu biti povezane s agresivnijim fenotipom bolesti, što je u skladu s nalazima da je viši nivo miRNA-21 povezan s lošijim ishodom (175).

Kada se točno razjasne biološki i patofiziološki mehanizmi putem kojih miRNA-21 utječe na ishod bolesti tada će se potencijalno otvoriti i mogućnost za razvoj metodologije liječenja koja će osigurati bolju i ciljanu terapiju za bolesnike s ovim malignim oboljenjima (176). Međutim, pri detaljnijim subanalizama ekspresije miRNA-21 te njegove moguće poveznice s HPV statusom nije pronađena statistički značajna razlika. Naime, medijan promjene ekspresije miRNA-21 iznosio je 3,6 u cjelokupnom uzorku, s nešto višim medijanom u HPV-negativnih (3,8) nego u HPV-pozitivnih bolesnika (3,0) dok je u bolesnika s OSCC medijan iznosio 3,7, a uorofaringealnim slučajevima 3,3. Nadalje, pri usporedbi ovih ekspresija nije pronađena statistički značajna razlika u ekspresiji miRNA-21 između HPV-pozitivnih i HPV-negativnih pacijenata. Ovi rezultati impliciraju da potencijalno nema razlike u ekspresiji i aktivnosti miRNA-21 između HPV-pozitivnih i HPV-negativnih OSCC/OPSCC. Čini se da se mogući sinergijski učinak između HPV-a i miRNA-21 događa indirektno te da su ekspresija i aktivnost miRNA-21 neovisne o HPV statusu OSCC-a/OPSCC-a. Međutim, kako ovi mehanizmi još

uvijek nisu sasvim jasni i istraženi potrebne su dodatne studije s većim uzorkom kako bi se ovi rezultati dodatno potvrdili.

Osim HPV statusa, i drugi važni rizični čimbenici mogu utjecati na razvoj OSCC-a/OPSCC-a, poput pušenja duhanskih proizvoda, unosa alkohola i genetskih predispozicija. Pušenje i konzumacija alkohola dobro su utvrđeni čimbenici rizika za OSCC/OPSCC i pokazalo se da modificiraju profile ekspresije mikroRNA (177, 178). Štoviše, genetske predispozicije mogu utjecati na ekspresiju i funkciju miRNA, potencijalno zbunjujući uočene korelacije između ekspresije miRNA-21 i HPV statusa (179, 180).

Tako je u ovom radu raspodjela uzorka prema konzumiranju cigareta i alkohola bila asimetrična, s prevladavanjem pušača i konzumenata alkohola. Samo 26 pacijenata (približno 34%) nikada nije konzumiralo cigarete i alkohol, dok je njih 50 (približno 66%) bilo konzumenata cigareta i alkohola. Među konzumentima oba proizvoda rizici od karcinoma usne šupljine imali su tendenciju multiplikativnog kombiniranja i bili su povećani više od 14 puta među onima koji su konzumirali više od 15 cigareta i sedam ili više pića dnevno (181). Kod svih pacijenata s karcinomima glave i vrata gotovo 75% slučajeva može se povezati s kombinacijom pušenja i konzumiranja alkohola (182).

Što se tiče stadija bolesti, većina uključenih bolesnika imala je klinički stadij primarnog tumora klasificiran kao T2, njih 26 (34%), zatim slijedi stadij T4a s udjelom od 30% pacijenata, potom T3 i T1. Klinički stadij zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova (cN tumora) bio je zabilježen u 41 bolesnika, što je približno 54% cijelog uzorka te navedeni rezultati odgovaraju podacima drugih kohortnih studija provedenih na bolesnicima s OSCC/OPSCC (183-186). Patohistološki stadij primarnog tumora (pT stadij) približno je jednako raspodijelio bolesnike kao i klinički stadij primarnog tumora (cT stadij). Testirana je podudarnost raspodjele pacijenata prema zabilježenom pT stadiju i raspodjele prema cT stadiju i pokazalo se da je podudarnost izrazito visoka (Kappa = 0,68; 95% CI 0,55–0,81). Podudarnost između raspodjele pacijenata prema cN i pN stadiju tumora bila je niža (Kappa = 0,48; 95% CI 0,56–0,61). Ako se u histopatološkim podacima bolesnici s pNX stadijem spoje s pN0, tada je podudarnost/sličnost visoka (Kappa = 0,65; 95% CI 0,52–0,77). Podudarnost između ukupnog patološkog i ukupnog kliničkog stadija postoji i izrazito je visoka (Kappa = 0,74; 95% CI 0,61–0,87). Slična podudarnost pronađena je i u drugim studijama. Tako je jedno istraživanje provedeno na 182 bolesnika s OSCC-om/OPSCC-om, pokazalo podudarnosti između cT i pT u 59,9% pacijenata, dok je podudarnost za cN i pN iznosila 79,3%, uz umjerenu do visoku suglasnost (187). I uz cijeli napredak

dijagnostičkih metoda neslaganje između kliničkog i patološkog stadija ostaje značajan izazov u liječenju OSCC i OPSCC, sa stopama podudarnosti ispod 60–70%(188). Uvođenje dubine invazije kao kriterija za OSCC i zasebnog HPV-specifičnog stadija za OPSCC poboljšala se prognostička točnost, ali su se također uveli nove izvori kliničko-patološkog neslaganja. Nakon patohistološke analize okultne metastaze u limfnim čvorovima vrata i dalje predstavljaju primarni pokretač prelaska u viši N-stadij i nose lošiju prognozu od preoperativno otkrivene bolesti. Unatoč tehnološkom napretku u snimanju, patološki pregled ostaje zlatni standard za precizno određivanja stadija bolesti.

Kao terapijski model za OSCC/OPSCC i dalje je zlatni standard kirurška terapija, iako je važno naglasiti brzi razvoj kemoterapije i važnost radioterapije za HPV-pozitivne karcinome. Međutim, unatoč napretku dijagnostičkih i terapijskih algoritama, zabrinjava podatak da se stopa petogodišnjeg preživljenja za ove malignome nije značajno promijenila u zadnjih četrdesetak godina i ona iznosi oko 50% (189). Tako je i u ovom istraživanju polovina bolesnika, njih 38 (50%), preživjela bolest, a većina preživjelih (95%) nije imala znakove recidiva bolesti. Razlika u stopi preživljenja između pacijenata s HPV-pozitivnim tumorom (10; 56%) i onih s HPV-negativnim tumorom (28; 48%) nije bila statistički značajna te je bila približno 50% u obje skupine. Slične rezultate je prikazala i nedavna studija provedena na bolesnicima s OSCC-om/OPSCC-om gdje je trogodišnje preživljenje kod HPV-pozitivnih bilo 56,2%, a kod HPV-negativnih 53,9%, bez statistički značajne razlike (190).

U provedenom modelu višestruke Coxove regresije za ukupno preživljenje ($p < 0,001$) kao neovisni prediktori lošije prognoze izdvojile su se četiri varijable: istodobna prisutnost perineuralne i angioinvazije, pozitivan ili nejasan reseksijski rub, manji broj odstranjenih limfnih čvorova (1–10) te povišena ekspresija miRNA-21. Prisutnost obje invazije bila je povezana s većim rizikom smrtnog ishoda, što je u skladu sa studijama koje ukazuju na njihovu ulogu u agresivnijem biološkom ponašanju tumora i povećanom riziku od recidiva i metastaza (191).

Zanimljivo je da je i nedavno istraživanje kineskih autora povezalopovišenu ekspresiju miRNA-21 s perineuralnom invazijom te posljedično lošijom prognozom za bolesnike s oralnim karcinomom (192). Nadalje, pozitivan ili bliski rub resekcije također je negativan prognostički čimbenik stoga se uvijek mora uzeti u obzir kirurška radikalnost kod liječenja karcinoma glave i vrata (193). Uz sve navedeno i manji broj odstranjenih limfnih čvorova vrata predstavlja prediktor lošije prognoze. Studija Shayana Cheraghloa i suradnika pokazuje kako

je povećan broj odstranjenih limfnih čvorova vrata imao značajnu povezanost s poboljšanim preživljenjem (HR 0,833; 95% CI, 0,790–0,879) te kako veća gustoća limfnih čvorova ukazuje na lošiju prognozu (HR 1,916; 95% CI, 1,637–2,241) (194). U Coxovom modelu za preživljenje specifično za bolest nije se izdvojio nijedan statistički značajan prediktor, ali zato u modelu za preživljenje bez znakova bolesti izdvojili su se statistički značajni prediktori, ponovno kao i u modelu ukupnog preživljavanja, obje invazije, resekcijski rub, odstranjeni limfni čvorovi (1–10 i 21+) te ekspresija miRNA-21. Sve ove varijable bile su statistički značajne u modelu, s pripadajućim koeficijentima ($p < 0,05$).

Budući da je varijabla ekspresija miRNA-21 pokazala statističku značajnost u višestrukim modelima Coxove regresije, dodatno je ispitan učinak miRNA-21 na preživljenje u različitim kategorijama stadija karcinoma korištenjem Kaplan-Meierove analize. Navedeni rezultati vezani uz ekspresiju miRNA-21, koji potvrđuju da visoka ekspresija ima negativan prognostički učinak, slični su rezultatima druge slične studije (195). Oni su u svojim rezultatima pokazali da je petogodišnje preživljenje kod niske ekspresije miRNA-21 bilo 50,5%, a kod visoke samo 29,4%. U multivarijatnoj Cox analizi miRNA-21 bila je čimbenik sa HR=2,05, $p = 0,036$.

Dodatni uvid u ulogu miRNA-21 u ovom istraživanju dobiva se kada se rezultati promatraju u kontekstu tumorske stromalne komponente i remodeliranja mikrookoliša. U istraživanju Hedback i suradnika na 86 bolesnika s primarnim OSCC-om pokazano je da je miRNA-21 dominantno eksprimirana u stromi tumora, ponajprije u α -SMA-pozitivnim miofibroblastima i endotelu tumorskih žila, uz praktično odsustvo ekspresije u normalnoj oralnoj sluznici (196). Upravo je ta visoka stromalna ekspresija bila neovisni negativni prognostički čimbenik za preživljenje bez znakova bolesti, nakon korekcije za N-stadij i perineuralnu invaziju. Također, u drugom recentnom radu pokazalo se da egzosomi HNSCC stanica obogaćeni miRNA-21 potiču diferencijaciju humanih koštano-sržnih mezenhimalnih stanica u fibroblaste povezane s karcinomom (engl. cancer-associated fibroblasts, CAF) s promijenjenim profilom staničnog ciklusa, dok s druge strane inhibicija miRNA-21 u tumorskim stanicama značajno smanjuje ovu tranziciju (197). Takvi podaci podupiru interpretaciju da povišena miRNA-21 u uzorku ovoga istraživanja i disertacije nužno ne odražavaju samo potencijalne stanično-autonomne onkogene učinke u epitelu, nego je moguće da i aktivno doprinosi oblikovanju CAF-bogatog, proinvazivnog mikrookoliša koji pogoduje perineuralnoj i angioinvaziji te time logično korelira s lošijim preživljenjem koje je registrirano u višim stadijima bolesti. Međutim, ovo opažanje je

potrebno dodatno istražiti te bi u budućim analizama ove populacije bilo vrijedno razdvojiti tumorsku i stromalnu ekspresiju miRNA-21 kako bi se preciznije razjasnilo koja komponenta nosi većinu prognostičke vrijednosti.

Nadalje, iako je u ovom radu analizirana tkivna ekspresija miRNA-21, sve veći broj publikacija pokazuje da se miRNA-21 može pouzdano detektirati i u cirkulaciji, što otvara mogućnost „tekuće biopsije“ u OSCC/OPSCC (172, 198). Sustavni pregled i meta-analiza Dioguardija i suradnika koji su uključili sedam kliničkih studija, pokazali su da cirkulirajuća miRNA-21 u serumu/plazmi razlikuje bolesnike s OSCC-om od zdravih ispitanika s osjetljivošću 77% i specifičnošću 66% (162). U pojedinačnim OSCC studijama, Mahmood i suradnici našli su značajno povišene razine plazmatske miRNA-21 u 100 bolesnika u usporedbi s kontrolama, pri čemu je viša ekspresija bila povezana s većim tumorom, metastazama i lokalnom invazijom te su zapažene visoka osjetljivost (91%) i umjerena specifičnost (54%) testa (188). Također, Ren i suradnici su u serumu 58 OSCC bolesnika pokazali osjetljivost 62% i specifičnost 91%, dodatno potvrđujući da cirkulirajuća miRNA-21 odražava invazivnost bolesti, dok su Hsu i suradnici u HNSCC kohorti zabilježili AUC 0,741 (199, 200).

Posebno je zanimljiva nedavna studija na bolesnicima s lokalno uznapredovalim HNSCC-om liječenima platinskom kemoradioterapijom, u kojoj su pretretmanske plazmatske razine miRNA-21 bile više u bolesnika s recidivom, a skupina s visokom miRNA-21 imala je značajno lošije ukupno preživljenje (202). Nadalje, ista studija je in vitro pokazala da inhibicija miRNA-21 putem deregulacije PDCD4 pojačava apoptozu induciranu cisplatinom i zračenjem (201). Usporede li se ti ishodi s Cox-regresijskom analizom ovoga istraživanja, gdje je tkivna miRNA-21 neovisan prediktor lošijeg ukupnog preživljenja i preživljenja bez znakova bolesti, nameće se koncept složenog, ali klinički iskoristivog spoja tkivne i cirkulirajuće miRNA-21. Naime, bolesnici s visokim tkivnim i plazmatskim razinama mogli bi činiti podskupinu s izrazito rezistentnom bolešću, kojima bi bila indicirana intenzivnija adjuvantnu kemoradioterapija dok bi u bolesnika s niskom miRNA-21 razinom, osobito u HPV-pozitivnim OPSCC-ima, bila opravdano razmatranja terapijske deeskalacije. Također, u budućnosti je potrebno razmotriti i mogući terapijski potencijal inhibitora miRNA-21.

Odnos između miRNA-21 i HPV-statusa dodatno je razjašnjen nedavnim radovima koji nadopunjuju nalaze ove disertacije, prema kojima ekspresija miRNA-21 nije značajno različita između HPV-pozitivnih i HPV-negativnih tumora (156, 129). U nedavnoj HPV-stratificiranoj analizi na 167 bolesnika s OSCC-om i OPSCC-om pokazano je da je stromalna miRNA-21

prekomjerno eksprimirana u 40,6% HPV-negativnih i 28,3% HPV-pozitivnih tumora, ali je visoka ekspresija bila neovisno povezana s lošijim karcinom-specifičnim preživljenjem samo u HPV-negativnoj skupini, dok u HPV-pozitivnim tumorima takav učinak nije dokazan (156). Ujedno je u HPV-negativnih bolesnika zabilježena povezanost visoke miRNA-21 s citoplazmatskom prekomjernom ekspresijom PDCD4, što potvrđuje funkcionalnu os miRNA-21 i PDCD4 upravo u ovoj podskupini. Nasuprot tome, recentni sustavni pregledni rad koji je obuhvatio četiri studije i ukupno 621 bolesnika s OSCC/OPSCC-om, od čega 135 HPV-pozitivnih i 486 HPV-negativnih, pokazao je da tri od četiri uključene studije nisu našle statistički značajne razlike u tkivnoj ekspresiji miRNA-21 između HPV-pozitivnih i HPV-negativnih tumora, dok jedina studija koja je sugerirala višu ekspresiju u HPV-pozitivnim OPSCC-ima pati od metodoloških ograničenja poput višestruke biopsije „polja“ i izostanka post hoc analize (129, 202-205). Time se sugerira da je miRNA-21 bazalno povišena i u HPV-pozitivnim i u HPV-negativnim OSCC/OPSCC-ima te da sama po sebi nije pogodna za razlikovanje HPV posredovanih od karcinogeno induciranih tumora, iako bi možda njena prognostička uloga mogla potencijalno biti izraženija u HPV-negativnoj populaciji.

U kontekstu bioloških podataka da HPV onkoproteini E6 i E7 mogu preko AP-1, NF- κ B i PI3K/Akt signalizacije poticati transkripciju miRNA-21 te tako posredno pojačavati supresiju PTEN-a i PDCD4-a, nalazi ove disertacije i prethodno navedenih studija sugeriraju da u OSCC/OPSCC-u konačni „output“ miRNA-21 osi vjerojatno ovisi više o zajedničkim putovima tumorske progresije nego o samom HPV-statusu. Klinički gledano, to podupire zaključak da miRNA-21 treba interpretirati komplementarno s HPV/p16-statusom, stupnjem bolesti i histopatološkim pokazateljima agresivnosti poput perineuralne i vaskularne invazije te ENE i rubova resekcije. Za preciznije definiranje HPV-specifičnih razlika ostaje potreba za većim, standardiziranim studijama s odvojenom analizom stromalne i cirkulirajuće frakcije miRNA-21 i jasno definiranim metodološkim parametrima.

Limitacije ove studije uključuju relativno mali broj pacijenata i potencijalnu, ali neizbježnu spolnu pristranost. Druga ograničenja uključuju moguće pristranosti u izvještavanju zbog brojnih zbunjujućih čimbenika koji se nisu mogli sasvim isključiti. Također, limitacija je i nedovoljno izvještavanje o važnim značajkama OSCC-a i OPSCC-a, što se vidi iz varijabilnosti izvješća patologa, pri čemu neki opisuju rubove resekcije kao uske ili široke, umjesto da u nekim slučajevima pruže precizna mjerenja, dok neki izričito navode DOI ili prisutnost ENE. Zbog nedosljednosti u izvještavanju o dubini invazije, u većini slučajeva bilo je potpuno

nemoguće procijeniti to kao zaseban parametar. Nažalost, gotovo da nije provedeno bojenje p16, osim u 4 od 76 slučajeva, što ograničava procjenu ovog korisnog biomarkera u našoj populaciji. Implementacija i dovršetak jedinstvenog izvješća za HNC smanjili bi ovaj problem.

7. ZAKLJUČAK

Na temelju postavljenih hipoteza i dobivenih rezultata istraživanja mogu se izvesti sljedeći zaključci:

Potvrđena je hipoteza da je ekspresija miRNA-21 statistički značajno povećana kod bolesnika s oralnim i orofaringealnim karcinomima, osobito u uznapredovalim stadijima bolesti. Povišena razina miRNA-21 povezana je s agresivnijim biološkim ponašanjem tumora i lošijim kliničkim ishodom.

Potvrđena je hipoteza da visoka ekspresija miRNA-21 ima negativan prognostički utjecaj na preživljenje bolesnika. Analize ukupnog preživljenja (OS), preživljenja specifičnog za bolest (DSS) i preživljenja bez bolesti (DFS) pokazale su da je miRNA-21 neovisan prognostički čimbenik povezan s nepovoljnijim ishodom bolesti.

Potvrđena je hipoteza da ne postoji statistički značajna povezanost između ekspresije miRNA-21 i HPV statusa tumora. Razlike između HPV-pozitivnih i HPV-negativnih tumora nisu bile statistički značajne, što upućuje na to da prognostička uloga miRNA-21 djeluje neovisno o HPV statusu.

Dodatno je utvrđeno da je povišena ekspresija miRNA-21 povezana s nepovoljnim patohistološkim obilježjima, uključujući perineuralnu i vaskularnu invaziju, pozitivne reseksijske rubove te veći broj zahvaćenih limfnih čvorova, što dodatno potvrđuje njezinu ulogu biomarkera agresivnosti tumora.

Iako su medijani ekspresije miRNA-21 bili neznatno viši u oralnom nego u orofaringealnom karcinomu, razlika nije bila statistički značajna.

Pušenje i konzumacija alkohola nisu pokazali izravnu povezanost s razinom miRNA-21, no njihova kombinacija s visokom ekspresijom dodatno pogoršava ishod bolesti.

Rezultati istraživanja ukazuju da miRNA-21 može predstavljati važan dijagnostički i prognostički biomarker u karcinomima usne šupljine i orofarinksa te potencijalnu metu za razvoj personaliziranih terapijskih pristupa.

8. SAŽETAK

Disertacija “Prognostička uloga miRNA-21 i povezanost s HPV statusom kod karcinoma usne šupljine i orofarinksa” istražuje utjecaj prekancerogene mikroRNA-21 na klinički tijek i ishod bolesnika s oralnim i orofaringealnim skvamoznim karcinomom. Planocelularni karcinom glave i vrata (HNSCC) predstavlja šestu najčešću zloćudnu bolest i osmu po smrtnosti u svijetu, pri čemu oralni i orofaringealni tumori čine gotovo 95% svih HNSCC-a. Ključni čimbenici rizika su pušenje, konzumacija alkohola i infekcija visokorizičnim HPV tipovima, osobito HPV-16.

Hipoteza: miRNA-21 ima povišenu ekspresiju u karcinomu usne šupljine i orofarinksa, negativno utječe na prognozu i preživljenje bolesnika te nije ovisna o HPV statusu.

Ciljevi istraživanja:

1. Povezanost miRNA-21 sa stadijem bolesti
2. Vezu između miRNA-21 i HPV ekspresije/genotipa.
3. Utjecaj miRNA-21 na ukupno preživljenje i prognozu.
4. Korelaciju miRNA-21 s patohistološkim karakteristikama (perineuralna i vaskularna invazija, diferencijacija).
5. Razliku u ekspresiji miRNA-21 između oralnog i orofaringealnog karcinoma.
6. Razliku u prognozi prema ekspresiji miRNA-21 u obje lokalizacije.
7. Utjecaj pušenja i konzumacije alkohola na ekspresiju miRNA-21.

Metodologija: Prospektivna kohortna studija obuhvatila je 76 kirurški liječenih bolesnika u razdoblju od 1. siječnja 2017. do 1. siječnja 2020. na Klinici za maksilofacijalnu kirurgiju KBC-a Dubrava i Klinici za ORL i MFK SKB-a Mostar. Uzorci tumora podvrgnuti su patohistološkoj analizi i molekularnoj detekciji miRNA-21 i HPV-DNA pomoću PCR i qRT-PCR tehnika. Snaga studije određena je na 80% pri $\alpha=0,05$.

Očekivani doprinos: Identifikacija miRNA-21 kao neovisnog prognostičkog biomarkera mogla bi omogućiti raniju stratifikaciju bolesnika i primjenu personaliziranih terapijskih strategija. Analiza povezanosti s HPV statusom te životnim navikama (pušenje, alkohol) dodatno će razjasniti molekularne mehanizme koji oblikuju biološko ponašanje tumora. Takvi nalazi imaju potencijal unaprijediti dijagnostiku, prognozu i razvoj ciljane terapije kod karcinoma usne šupljine i orofarinksa.

Ključne riječi: miRNA-21; oralni planocelularni karcinom; orofariginealni planocelularni karcinom; prognostički biomarker; humani papilomavirus

9. SUMMARY

Dissertation “The prognostic pole of miRNA-21 and its association with HPV status in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma” investigates the impact of the oncomiR microRNA-21 on the clinical course and outcomes of patients with oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is the sixth most common malignancy and the eighth leading cause of cancer-related death worldwide, with oral and oropharyngeal tumors accounting for nearly 95% of all HNSCC. Major risk factors include tobacco use, alcohol consumption, and infection with high-risk human papilloma virus (especially HPV-16).

Hypothesis: miRNA-21 is over expressed in oral and oropharyngeal carcinoma, negatively influences patient prognosis and survival, and acts independently of HPV status.

Study objectives:

1. To assess the association between miRNA-21 expression and disease stage.
2. To determine the relationship between miRNA-21 expression and HPV presence/genotype.
3. To evaluate the impact of miRNA-21 on overall survival and prognosis.
4. To correlate miRNA-21 levels with histopathological features (perineural and vascular invasion, tumor differentiation).
5. To compare miRNA-21 expression between oral and oropharyngeal carcinomas.
6. To compare patient prognosis by miRNA-21 expression in both tumor locations.
7. To examine the influence of smoking and alcohol consumption on miRNA-21 expression.

Methodology: A prospective cohort study enrolled 76 surgically treated patients between January 1, 2017, and January 1, 2020, at the Department of Maxillofacial Surgery, Clinical Hospital Dubrava, and the Department of ENT and Maxillofacial Surgery, SKB Mostar. Tumor specimens underwent histopathological evaluation and molecular detection of miRNA-21 and HPV-DNA using PCR and qRT-PCR techniques. The study was powered at 80 % with $\alpha = 0.05$.

Expected Contribution: Identification of miRNA-21 as an independent prognostic biomarker could enable earlier patient stratification and the implementation of personalized therapeutic strategies. Analysis of its association with HPV status and lifestyle factors (smoking, alcohol) will further elucidate the molecular mechanisms underlying tumor behavior. The such findings have the potential to improve diagnosis, prognostic ation, and the development of targeted therapies for oral and oropharyngeal carcinoma.

Keywords: miRNA-21; oralsquamous cell carcinoma; oropharyngeal squamous cell carcinoma; prognostic biomarker; human papillomavirus.

10. POPIS LITERATURE

1. Mesia R, Iglesias L, Lambea J, Martinez-Trufero J, Soria A, Taberna M, et al. SEOM clinical guidelines for the treatment of head and neck cancer (2020). *Clin Transl Oncol*. 2021;23(5):913–21.
2. Priya NS, Nayak R, Bhat K, Kugaji M, Vijayalakshmi K, Rao K. Site specificity and expression profile of miR-21 in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2021;25(1):154–8.
3. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet*. 2008; 371(9625):1695–709.
4. Rajan C, Roshan VGD, Khan I, Manasa VG, Himal I, Kattoor J, et al. miRNA expression profile and emergence of new prognostic signature for oral squamous cell carcinoma. *Sci Rep*. 2021;11(1): 7298.
5. Bozinovic K, Sabol I, Dediol E, Milutin Gasperov N, Manojlovic S, Vojtechova Z, et al. Genome-wide miRNA profile in brain forces the importance of miR-9 in human papillomavirus-associated oral and oropharyngeal head and neck cancer. *Sci Rep*. 2019; 9(1):2306.
6. Ghantous Y, Schussel JL, Brait M. Tobacco and alcohol-induced epigenetic changes in oral carcinoma. *Curr Opin Oncol*. 2018;30(3):152–8.
7. Goldstein BY, Chang SC, Hashibe M, La Vecchia C, Zhang ZF. Alcohol consumption and cancers of the oral cavity and pharynx from 1988 to 2009: an update. *Eur J Cancer Prev*. 2010;19(6):431–65.
8. Schmitt NC. HPV in non-oropharyngeal head and neck cancer: does it matter? *Ann Transl Med*. 2020;8(18):1120.
9. Albers AE, Qian X, Kaufmann AM, Coordes A. Meta-analysis: HPV and p16 pattern determines survival in patients with HNSCC and identifies potential new biologic subtype. *Sci Rep*. 2017;7(1):16715.
10. Taberna M, Mena M, Pavon MA, Alemany L, Gillison ML, Mesia R. Human papillomavirus-related oropharyngeal cancer. *Ann Oncol*. 2017;28(10):2386–98.

11. Nichols AC, Theurer J, Prisman E, Read N, Berthelet E, Tran E, et al. Randomized trial of radiotherapy versus transoral robotic surgery for oropharyngeal squamous cell carcinoma: long-term results of the ORATOR Trial. *J Clin Oncol*. 2022;40(8):866–75.
12. Kamrani P, Sadiq NM. Anatomy, head and neck, Oral Cavity (Mouth). StatPearls. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Nazia Sadiq declares no relevant financial relationships with ineligible companies. 2024.
13. Dotiwala AK, Samra NS. Anatomy, head and neck, tongue. StatPearls. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Navdeep Samra declares no relevant financial relationships within eligible companies. 2024.
14. Albahout KS, Lopez RA. Anatomy, head and neck, pharynx. StatPearls. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Richard Lopez declares no relevant financial relationships with ineligible companies. 2024.
15. Heyd C, Yellon R. Anatomy, head and neck, pharynx muscles. StatPearls. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Robert Yellon declares no relevant financial relationships with ineligible companies. 2024.
16. Kagaya H, Yokoyama M, Saitoh E, Kanamori D, Susa C, German RZ, et al. Isolated pharyngeal swallow exists during normal human feeding. *Tohoku J Exp Med*. 2015; 236(1):39–43.
17. Shaw SM, Martino R. The normal swallow: muscular and neurophysiological control. *Otolaryngol Clin North Am*. 2013;46(6):937–56.
18. Rivera C. Essentials of oral cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(9):11884–94.
19. Sarode G, Maniyar N, Sarode SC, Jafer M, Patil S, Awan KH. Epidemiologic aspects of oral cancer. *Dis Mon*. 2020;66(12):100988.
20. Vigneswaran N, Williams MD. Epidemiologic trends in head and neck cancer and AIDS in diagnosis. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2014;26(2):123–41.
21. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209–49.

22. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394–424.
23. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010;127(12):2893–917.
24. Tarle M, Luksic I. Pathogenesis and therapy of oral carcinogenesis. *Int J Mol Sci*. 2024;25(12).
25. Tandon P, Dadhich A, Saluja H, Bawane S, Sachdeva S. The prevalence of squamous cell carcinoma in different sites of oral cavity at our rural health care centre in Loni, Maharashtra – a retrospective 10-year study. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2017;21(2):178–83.
26. Gupta N, Gupta R, Acharya AK, Patthi B, Goud V, Reddy S, et al. Changing trends in oral cancer – a global scenario. *Nepal J Epidemiol*. 2016;6(4):613–9.
27. Lin NC, Hsien SI, Hsu JT, Chen MYC. Impact on patients with oral squamous cell carcinoma in different anatomical subsites: a single-center study in Taiwan. *Sci Rep*. 2021;11(1):15446.
28. Effiom OA, Adeyemo WL, Omitola OG, Ajayi OF, Emmanuel MM, Gbotolorun OM. Oral squamous cell carcinoma: a clinicopathologic review of 233 cases in Lagos, Nigeria. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008;66(8):1595–9.
29. Sundermann BV, Uhlmann L, Hoffmann J, Freier K, Thiele OC. The localization and risk factors of squamous cell carcinoma in the oral cavity: A retrospective study of 1501 cases. *J Craniomaxillofac Surg*. 2018;46(2):177–82.
30. Jacobs CD, Barbour AB, Mowery YM. The relative distribution of oral cancer in the United States by subsite. *Oral Oncol*. 2019;89:56–8.
31. Farhood Z, Simpson M, Ward GM, Walker RJ, Osazuwa-Peters N. Does anatomic subsite influence oral cavity cancer mortality? A SEER database analysis. *Laryngoscope*. 2019;129(6):1400–6.

32. Ellington TD, Henley SJ, Senkomago V, O'Neil ME, Wilson RJ, Singh S, et al. Trends in incidence of cancers of the oral cavity and pharynx: United States 2007–2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2020;69(15):433–8.
33. Lingen MW, Abt E, Agrawal N, Chaturvedi AK, Cohen E, D'Souza G, et al. Evidence-based clinical practice guideline for the evaluation of potentially malignant disorders in the oral cavity: a report of the American Dental Association. *J Am Dent Assoc.* 2017; 148(10):712–27e10.
34. Conway DI, Purkayastha M, Chestnutt IG. The changing epidemiology of oral cancer: definitions, trends, and risk factors. *Br Dent J.* 2018;225(9):867–73.
35. Chi AC, Day TA, Neville BW. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma: an update. *CA Cancer J Clin.* 2015;65(5):401–21.
36. Walvik L, Svensson AB, Friberg J, Lajer CB. The association between human papilloma virus and oropharyngeal squamous cell carcinoma: reviewed according to the Bradford Hill criteria for causality. *Oral Oncol.* 2016;63:61–5.
37. Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, Hernandez BY, Xiao W, Kim E, et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol.* 2023;41(17):3081–8.
38. Kokkinis E, Bastas NS, Mega I, Tsironis C, Lianou AD. Association of HPV with Oral and oropharyngeal cancer: current evidence. *Maedica (Bucur).* 2024;19(4):801–6.
39. Ferris RL, Westra W. Oropharyngeal carcinoma with a special focus on HPV-related squamous cell carcinoma. *AnnuRevPathol.* 2023;18:515–35.
40. Gordis TM, Cagle JL, Nguyen SA, Newman JG. Human papillomavirus-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis of clinical trial demographics. *Cancers (Basel).* 2022;14(16).
41. Oliveira AC, Cavalcanti de Lima IC, Frez Marques VM, Alves de Araujo WH, de Campos Ferreira C. Human papillomavirus prevalence in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma in South America: a systematic review and meta-analysis. *Oncol Rev.* 2022;16(1):552.

42. Smith EM, Rubenstein LM, Haugen TH, Hamsikova E, Turek LP. Tobacco and alcohol use increases the risk of both HPV-associated and HPV-independent head and neck cancers. *Cancer Causes Control*. 2010;21(9):1369–78.
43. Auguste A, Deloumeaux J, Joachim C, Gaete S, Michineau L, Herrmann-Storck C, et al. Joint effect of tobacco, alcohol, and oral HPV infection on head and neck cancer risk in the French West Indies. *Cancer Med*. 2020;9(18):6854–63.
44. Bozinovic K, Sabol I, Rakusic Z, Jakovcevic A, Sekerija M, Lukinovic J, et al. HPV-driven oropharyngeal squamous cell cancer in Croatia: demography and survival. *PLoS One*. 2019;14(2):e0211577.
45. Zumsteg ZS, Luu M, Rosenberg PS, Elrod JK, Bray F, Vaccarella S, et al. Global epidemiologic patterns of oropharyngeal cancer incidence trends. *J Natl Cancer Inst*. 2023;115(12):1544–54.
46. Singh S, Singh AK. Porphyromonas gingival is in oral squamous cell carcinoma: a review. *Microbes Infect*. 2022;24(3):104925.
47. Li R, Xiao L, Gong T, Liu J, Li Y, Zhou X, et al. Role of oral microbiome in oral oncogenesis, tumor progression, and metastasis. *Mol Oral Microbiol*. 2023;38(1): 9–22.
48. Weng MW, Lee HW, Park SH, Hu Y, Wang HT, Chen LC, et al. Aldehydes are the predominant forces inducing DNA damage and inhibiting DNA repair in tobacco smoke carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018;115(27):E6152–E61.
49. Sharma V, Kumar D, Kumar S, Singh H, Sharma N, Gupta S. Impact of tobacco smoking on oral cancer genetics: a next-generation sequencing perspective. *Imeta*. 2022;1(3):e44.
50. Brennan JA, Boyle JO, Koch WM, Goodman SN, Hruban RH, Eby YJ, et al. Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 1995;332(11):712–7.
51. Marttila E, Uttamo J, Rusanen P, Lindqvist C, Salaspuro M, Rautemaa R. Acetaldehyde production and microbial colonization in oral squamous cell carcinoma and oral lichenoid disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2013;116(1):61–8.

52. Sukmana BI, Saleh RO, Najim MA, Al-Ghamdi HS, Achmad H, Al-Hamdani MM, et al. Oral microbiota and oral squamous cell carcinoma: a review of their relation and carcinogenic mechanisms. *Front Oncol.* 2024;14:1319777.
53. Mivehchi H, Eskandari-Yaghtbashtlo A, Pour Bahrami P, Elhami A, Faghihinia F, Nejati ST, et al. Exploring the role of oral bacteria in oral cancer: a narrative review. *Discov Oncol.* 2025;16(1):242.
54. Moritani K, Takeshita T, Shibata Y, Ninomiya T, Kiyohara Y, Yamashita Y. Acetaldehyde production by major oral microbes. *Oral Dis.* 2015;21(6):748–54.
55. Lu W, Lu L, Feng Y, Chen J, Li Y, Kong X, et al. Inflammation promotes oral squamous cell carcinoma immune evasion via induced programmed death ligand-1 surface expression. *Oncol Lett.* 2013;5(5):1519–26.
56. Yao Y, Shen X, Zhou M, Tang B. Periodontal pathogens promote oral squamous cell carcinoma by regulating ATR and NLRP3 inflammasome. *Front Oncol.* 2021;11: 722797.
57. Wang X, He X, Zhong B. Oral microbiota: the overlooked catalyst in cancer initiation and progression. *Front Cell Dev Biol.* 2024;12:1479720.
58. Gandini S, Botteri E, Iodice S, Boniol M, Lowenfels AB, Maisonneuve P, et al. Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis. *Int J Cancer.* 2008;122(1):155–64.
59. Wang X, Xu J, Wang L, Liu C, Wang H. The role of cigarette smoking and alcohol consumption in the differentiation of oral squamous cell carcinoma for the males in China. *J Cancer Res Ther.* 2015;11(1):141–5.
60. Humans IWGot Eo CRt. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Ingested nitrate and nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.* 2010;94:v-vii, 1–412.
61. Patil S, Awan KH, Arakeri G, Aljabab A, Ferrari M, Gomes CC, et al. The relationship of „shisha“ (water pipe) smoking to the risk of head and neck cancer. *J Oral Pathol Med.* 2019;48(4):278–83.

62. Zaid K, Azar-Maalouf E, Barakat C, Chantiri M. p53 Overexpression in Oral mucosa in relation to shisha smoking in Syria and Lebanon. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2018;19(7): 1879–82.
63. Al-Amad SH, Awad MA, Nimri O. Oral cancer in young Jordanians: potential association with frequency of narghile smoking. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2014;118(5):560–5.
64. Feller L, Chandran R, Khammissa RA, Meyerov R, Lemmer J. Alcohol and oral squamous cell carcinoma. *SADJ.* 2013;68(4):176–80.
65. Turati F, Garavello W, Tramacere I, Bagnardi V, Rota M, Scotti L, et al. A meta-analysis of alcohol drinking and oral and pharyngeal cancers. Part 2: results by subsites. *Oral Oncol.* 2010;46(10): 720–6.
66. Anantharaman D, Marron M, Laggiou P, Samoli E, Ahrens W, Pohlabein H, et al. Population attributable risk of tobacco and alcohol for upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncol.* 2011;47(8):725–31.
67. Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, Boccia S, Castellsague X, Chen C, et al. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the international head and neck cancer epidemiology consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(2):541–50.
68. Petti S, Mohd M, Scully C. Revisiting the association between alcohol drinking and oral cancer in nonsmoking and betel quid-nonchewing individuals. *Cancer Epidemiol.* 2012; 36(1):e1–6.
69. Petti S. Lifestyle risk factors for oral cancer. *Oral Oncol.* 2009;45(4–5):340–50.
70. Quadri MF, Alharbi F, Bajonaid AM, Moafa IH, Sharwani AA, Alamir AH. Oral squamous cell carcinoma and associated risk factors in Jazan, Saudi Arabia: a hospital-based case-control study. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(10):4335–8.
71. Lamont RJ, Fitzsimonds ZR, Wang H, Gao S. Role of *Porphyromonas gingivalis* in oral and orodigestive squamous cell carcinoma. *Periodontol 2000.* 2022;89(1):154–65.

72. Montero PH, Patel SG. Cancer of the oral cavity. *Surg Oncol Clin N Am*. 2015;24(3): 491–508.
73. Wong T, Wiesenfeld D. Oral cancer. *Aust Dent J*. 2018;63 Suppl 1:S91–S9.
74. Oropharyngeal Cancer Treatment (PDQ[R]): health professional version. PDQ Cancer Information Summaries. Bethesda (MD) 2002.
75. Van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol*. 2009; 45(4–5):317–23.
76. Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med*. 2007;36(10): 575–80.
77. Maymone MBC, Greer RO, Kesecker J, Sahitya PC, Burdine LK, Cheng AD, et al. Premalignant and malignant oral mucosal lesions: clinical and pathological findings. *J Am Acad Dermatol*. 2019;81(1):59–71.
78. McCormick NJ, Thomson PJ, Carrozzo M. The clinical presentation of oral potentially malignant disorders. *Prim Dent J*. 2016;5(1):52–63.
79. Wetzel SL, Wollenberg J. Oral potentially malignant disorders. *Dent Clin North Am*. 2020;64(1):25–37.
80. Phookan J, Saikia KP. A clinicopathological study of the premalignant conditions of oral cavity. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg*. 1998;50(3):246–9.
81. Kusiak A, Maj A, Cichonska D, Kochanska B, Cydejko A, Swietlik D. The Analysis of the frequency of leukoplakia in reference of tobacco smoking among Northern Polish Population. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(18).
82. Grady D, Greene J, Daniels TE, Ernster V L, Robertson PB, Hauck W, et al. Oral mucosal lesions found in smokeless tobacco users. *J Am Dent Assoc*. 1990;121(1): 117–23.
83. Thomas SJ, Harris R, Ness A R, Taalo J, MacLennan R, Howes N, et al. Betel quid not containing tobacco and oral leukoplakia: a report on a cross-sectional study in Papua New Guinea and a meta-analysis of current evidence. *Int J Cancer*. 2008;123(8):1871–6.

84. De la Cour CD, Sperling CD, Belmonte F, Syrjanen S, Kjaer SK. Human papillomavirus prevalence in oral potentially malignant disorders: systematic review and meta-analysis. *Oral Dis.* 2021;27(3):431–8.
85. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(2):467–75.
86. Mello FW, Miguel AFP, Dutra KL, Porporatti AL, Warnakulasuriya S, Guerra ENS, et al. Prevalence of oral potentially malignant disorders: A systematic review and meta-analysis. *J Oral Pathol Med.* 2018;47(7):633–40.
87. Petti S. Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. *Oral Oncol.* 2003;39(8):770–80.
88. Van der Waal I, Schepman KP, van der Meij EH, Smeele LE. Oral leukoplakia: a clinicopathological review. *Oral Oncol.* 1997;33(5):291–301.
89. Ribeiro AS, Salles PR, da Silva TA, Mesquita RA. A review of the nonsurgical treatment of oral leukoplakia. *Int J Dent.* 2010;2010:186018.
90. Van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; present concepts of management. *Oral Oncol.* 2010; 46(6):423–5.
91. Reichart PA, Philipsen HP. Oral erythroplakia: a review. *Oral Oncol.* 2005;41(6):551–61.
92. Ismail SB, Kumar SK, Zain RB. Oral lichen planus and lichenoid reactions: etiopathogenesis, diagnosis, management and malignant transformation. *J Oral Sci.* 2007;49(2):89–106.
93. Farhi D, Dupin N. Pathophysiology, etiologic factors, and clinical management of oral lichen planus, part I: facts and controversies. *Clin Dermatol.* 2010;28(1):100–8.
94. Manchanda Y, Rath SK, Joshi A, Das S. Oral Lichen Planus: An updated review of etiopathogenesis, clinical presentation, and management. *Indian Dermatol Online J.* 2024;15(1):8–23.

95. Nico MM, Fernandes JD, Lourenco SV. Oral lichen planus. *An Bras Dermatol*. 2011; 86(4):633–41; quiz 42–3.
96. Roopashree MR, Gondhalekar RV, Shashikanth MC, George J, Thippeswamy SH, Shukla A. Pathogenesis of oral lichen planus: a review. *J Oral Pathol Med*. 2010;39(10): 729–34.
97. Payeras MR, Cherubini K, Figueiredo MA, Salum FG. Oral lichen planus: focus on etiopathogenesis. *Arch Oral Biol*. 2013;58(9):1057–69.
98. Huber MA. White oral lesions, actinic cheilitis, and leukoplakia: confusions in terminology and definition: facts and controversies. *Clin Dermatol*. 2010;28(3):262–8.
99. Arakeri G, Brennan PA. Oral submucous fibrosis: an overview of the aetiology, pathogenesis, classification, and principles of management. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2013;51(7):587–93.
100. Auluck A, Rosin MP, Zhang L, Sumanth KN. Oral submucous fibrosis, a clinically benign but potentially malignant disease: report of 3 cases and review of the literature. *J Can Dent Assoc*. 2008;74(8):735–40.
101. Mehrotra R, Singh HP, Gupta SC, Singh M, Jain S. Pentoxifylline therapy in the management of oral submucous fibrosis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011;12(4): 971–4.
102. Bhadage CJ, Umarji HR, Shah K, Valimaa H. Vasodilator is oxsuprine alleviates symptoms of oral submucous fibrosis. *Clin Oral Investig*. 2013;17(5):1375–82.
103. Angadi PV, Rao S. Management of oral submucous fibrosis: an overview. *Oral Maxillofac Surg*. 2010;14(3):133–42.
104. Sudarshan R, Annigeri RG, Sree Vijayabala G. Aloe vera in the treatment for oral submucous fibrosis: a preliminary study. *J Oral Pathol Med*. 2012;41(10):755–61.
105. Gross ND, Patel SG, Carvalho AL, Chu PY, Kowalski LP, Boyle JO, et al. Nomogram for deciding adjuvant treatment after surgery for oral cavity squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2008;30(10):1352–60.

106. Tehzeeb H, Hande A, Patil S, Sonone A, Pakhale A, Chavhan A. Correlation of clinical and pathological TNM staging with histopathological grading in oral squamous cell carcinoma. *Cureus*. 2024;16(5):e60912.
107. Wistermayer P, Anderson KG. Radical neck dissection. *Stat Pearls*. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Kelly Anderson declares no relevant financial relationships with ineligible companies. 2025.
108. Robbins KT, Clayman G, Levine PA, Medina J, Sessions R, Shaha A, et al. Neck dissection classification update: revisions proposed by the American Head and Neck Society and the American Academy of Otolaryngology – Head and Neck Surgery. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2002;128(7):751–8.
109. Mitra GV, Bajaj SS, Rajmohan S, Motiwale T. Versatility of Modified Nasolabial Flap in Oral and Maxillofacial Surgery. *Arch Craniofac Surg*. 2017;18(4):243-48.
110. Raj S. The outcomes of Facial Artery Musculomucosal (FAMM) flaps in oral oncologic reconstructions. *Natl J Maxillofac Surg*. 2025;16(1):24-32.
111. Buchbinder D, St-Hilaire H. Tongue flaps in maxillofacial surgery. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2003;15(4):475-86.
112. Bianchi B, Ferri A, Ferrari S, Copelli C, Sesenna E. Myomucosal cheek flaps: applications in intraoral reconstruction using three different techniques. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;108(3):353-59.
113. Taghizadeh F, Slijepcevic AA, Colcord ME, Chodroff J, Wax MK. The Palatal Island Flap for the Reconstruction of Oral and Oropharyngeal Defects. *Laryngoscope*. 2024;134(6):2718-20.
114. Magee WP Jr, McCraw JB, Horton CE, McInnis WD. Pectoralis "paddle" myocutaneous flaps. The workhorse of head and neck reconstruction. *Am J Surg*. 1980;140(4):507-13.
115. Harii K, Ebihara S, Ono I. Radial forearm flap in reconstruction following surgery for head and neck cancers. *Auris Nasus Larynx*. 1985;12 Suppl 2:S44-47.
116. Chen CM, Chen CH, Lai CS, Lin SD, Huang IY, Shieh TY. Anterolateral thigh flaps for reconstruction of head and neck defects. *J Oral Maxillofac Surg*. 2005;63(7):948-52.

117. Hidalgo DA. Fibula free flap: a new method of mandible reconstruction. *Plast Reconstr Surg*. 1989;84(1):71-79.
118. Zheng L, Lv X, Zhang J, Zhang J, Zhang Y, Cai Z, Liu S. Deep circumflex iliac artery perforator flap with iliac crest for oromandibular reconstruction. *J Craniomaxillofac Surg*. 2018;46(8):1263-67.
119. Perron MP, Provost P. Protein interactions and complexes in human microRNA biogenesis and function. *Front Biosci*. 2008;13:2537-47.
120. Macfarlane LA, Murphy PR. microRNA: biogenesis, function and role in cancer. *Curr Genomics*. 2010;11(7):537-61.
121. Shang R, Lee S, Senavirathne G, Lai EC. microRNA sin action: biogenesis, function and regulation. *Nat Rev Genet*. 2023;24(12):816-33.
122. Griffiths-Jones S. miRBase: the microRNA sequence database. *Methods Mol Biol*. 2006;342:129-38.
123. Zhang Z, Qin YW, Brewer G, Jing Q. MicroRNA degradation and turnover: regulating the regulators. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2012;3(4):593-600.
124. Jaksic Karisik M, Lazarevic M, Mitic D, Milosevic Markovic M, Riberti N, Jelovac D, et al. MicroRNA-21 as a regulator of cancer stem cell properties in oral cancer. *Cells*. 2025;14(2).
125. Yoshida K, Yamamoto Y, Ochiya T. miRNA signaling networks in cancer stem cells. *Regen Ther*. 2021;17:1-7.
126. Lin CY, Hsieh PL, Liao YW, Peng CY, Lu MY, Yang CH, et al. Correction: Berberine-targeted miR-21 chemosensitizes oral carcinoma stem cells. *Oncotarget*. 2018;9(37):24870.
127. Dioguardi M, Spirito F, Sovereto D, La Femina L, Campobasso A, Cazzolla AP, et al. Biological prognostic value of miR-155 for survival outcome in head and neck squamous cell carcinomas: systematic review, meta-analysis and trial sequential analysis. *Biology (Basel)*. 2022;11(5).

128. Fu X, Han Y, Wu Y, Zhu X, Lu X, Mao F, et al. Prognostic role of microRNA-21 in various carcinomas: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Invest.* 2011; 41(11):1245–53.
129. Kordic M, Martinovic D, Puizina E, Bozic J, Zubcic Z, Dediol E. Impact of human papillomavirus on microRNA-21 expression in oral and oropharyngeal cancer: a systematic review. *Int J Mol Sci.* 2024;25(15).
130. Gao Z, Liu H, Shi Y, Yin L, Zhu Y, Liu R. Identification of cancer stem cell molecular markers and effects of hsa-miR-21-3p on stemness in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancers (Basel).* 2019;11(4).
131. Medina PP, Nolde M, Slack F J. OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell-lymphoma. *Nature.* 2010;467(7311):86–90.
132. Bourguignon LY, Earle C, Wong G, Spevak CC, Krueger K. Stem cell marker (Nanog) and Stat-3 signaling promote microRNA-21 expression and chemoresistance in hyaluronan/CD44-activated head and neck squamous cell carcinoma cells. *Oncogene.* 2012;31(2):149–60.
133. Chang C, Wang H, Liu J, Pan C, Zhang D, Li X, et al. *Porphyromonas gingivalis* infection promoted the proliferation of oral squamous cell carcinoma cells through the miR-21/PDCD4/AP-1 negative signaling pathway. *ACS Infect Dis.* 2019;5(8):1336–47.
134. Bai L, Liang R, Yang Y, Hou X, Wang Z, Zhu S, Wang C, Tang Z, Li K. MicroRNA-21 regulates PI3K/Akt/mTOR signaling by targeting TGF β I during skeletal muscle development in pigs. *PLoS One.* 2015;10(5):e0119396.
135. Ando Y, Yang GX, Kenny TP, Kawata K, Zhang W, Huang W, Leung PS, Lian ZX, Okazaki K, Ansari AA, He XS, Invernizzi P, Ridgway WM, Lu Q, Gershwin ME. Overexpression of microRNA-21 is associated with elevated pro-inflammatory cytokines in dominant-negative TGF- β receptor type II mouse. *J Autoimmun.* 2013;41:111–9.
136. Liu LZ, Li C, Chen Q, Jing Y, Carpenter R, Jiang Y, Kung HF, Lai L, Jiang BH. miR-21 induced angiogenesis through AKT and ERK activation and HIF-1 α expression. *PLoS One.* 2011;6(4):e19139.

137. Sheedy FJ. Turning 21: Induction of miR-21 as a key switch in the inflammatory response. *Front Immunol*. 2015;6:19.
138. Khehra N, Padda IS, Swift CJ. Polymerase Chain Reaction (PCR). Stat Pearls. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Inderbir Padda declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Cathi Swift declares no relevant financial relationships with ineligible companies. 2025.
139. Rivera C, Venegas B. Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (Review). *Oncol Lett*. 2014;8(1):7–11.
140. Luria L, Cardoza-Favarato G. Human papillomavirus. Stat Pearls. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Gabriella Cardoza-Favarato declares no relevant financial relationships with ineligible companies. 2024.
141. Bradbury M, Xercavins N, Garcia-Jimenez A, Perez-Benavente A, Franco-Camps S, Cabrera S, et al. Vaginal Intraepithelial Neoplasia: Clinical Presentation, Management, and Outcomes in Relation to HIV Infection Status. *J Low Genit Tract Dis*. 2019;23(1): 7–12.
142. Hirth J. Disparities in HPV vaccination rates and HPV prevalence in the United States: a review of the literature. *Hum Vaccin Immunother*. 2019; 15(1):146–55.
143. Menezes FDS, Fernandes GA, Antunes JLF, Villa LL, Toporcov TN. Global incidence trends in head and neck cancer for HPV-related and – unrelated subsites: A systematic review of population-based studies. *Oral Oncol*. 2021;115:105177.
144. Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. A papilloma virus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983;80(12):3812–5.
145. Ajila V, Shetty H, Babu S, Shetty V, Hegde S. Human papillomavirus associated squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Sex Transm Dis*. 2015;2015:791024.
146. Jeergal PA, Jeergal VA, Fatma S, Singh A, Sharma R, Sale MS. Evaluation of oral squamous cell carcinoma patients using polymerase chain reaction regarding the prevalence of human papillomavirus types 16 and 18. *Cureus*. 2024;16(1):e51938.

147. Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Klussmann JP, Lee JH, Wang D, et al. Age, sexual behavior, and human papilloma virus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer*. 2004;108(5):766–72.
148. El-Mofty SK, Lu DW. Prevalence of human papilloma virus type 16 DNA in squamous cell carcinoma of the palatine tonsil, and not the oral cavity, in young patients: a distinct clinicopathologic and molecular disease entity. *Am J Surg Pathol*. 2003;27(11):1463–70.
149. Chernock RD, El-Mofty SK, Thorstad WL, Parvin CA, Lewis JS Jr. HPV-related nonkeratinizing squamous cell carcinoma of the oropharynx: utility of microscopic features in predicting patient outcome. *Head Neck Pathol*. 2009;3(3):186–94.
150. Lewis JS, Jr., Khan RA, Masand RP, Chernock RD, Zhang Q, Al-Naief NS, et al. Recognition of nonkeratinizing morphology in oropharyngeal squamous cell carcinoma – a prospective cohort and interobserver variability study. *Histopathology*. 2012;60(3):427–36.
151. Kobayashi K, Hisamatsu K, Suzui N, Hara A, Tomita H, Miyazaki T. A Review of HPV-related head and neck cancer. *J Clin Med*. 2018;7(9).
152. Koneva LA, Zhang Y, Virani S, Hall PB, McHugh JB, Chepeha DB, Wolf GT, Carey T E, Rozek LS, Sartor MA. HPV integration in HNSCC correlates with survival Outcomes, immune response signatures, and candidate drivers. *Mol Cancer Res*. 2018; 16(1):90–102.
153. Buitrago-Pérez A, Garaulet G, Vázquez-Carballo A, Paramio JM, García-Escudero R. Molecular signature of HPV-induced carcinogenesis: pRb, p53 and gene expression profiling. *Curr Genomics*. 2009;10(1):26–34.
154. Vande Pol SB, Klingelutz AJ. Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology*. 2013;445(1–2):115–37.
155. McLaughlin-Drubin ME, Münger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology*. 2009;384(2):335–44.
156. Ko YH, Won HS, Sun DS, An HJ, Jeon EK, Kim MS, Lee HH, Kang JH, Jung CK. Human papillomavirus-stratified analysis of the prognostic role of miR-21 in oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Pathol Int*. 2014;64(10):499–507.

157. Ghannam MG, Varacallo MA. Biochemistry, polymerase chain reaction. Stat Pearls. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Matthew Varacallo declares no relevant financial relationships with ineligible companies. 2025.
158. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2024;74(3): 229–63.
159. Sankaranarayanan R, Ramadas K, Amarasinghe H, Subramanian S, Johnson N. Oral cancer: prevention, early detection, and treatment. In: Gelband H, Jha P, Sankaranarayanan R, Horton S, editors. *Cancer: Disease Control Priorities, Third Edition (Volume 3)*. Washington (DC) 2015.
160. Dhanuthai K, Rojanawatsirivej S, Thosaporn W, Kintarak S, Subarnbhesaj A, Darling M, et al. Oral cancer: a multicenter study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2018;23(1):e23–e9.
161. Tomo S, Neto SC, Collado FU, Sundefeld ML, Bernabe DG, Biasoli ER, et al. Head and neck squamous cell carcinoma in young patients: a 26-year clinicopathologic retrospective study in a Brazilian specialized center. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2020;25(3):e416–e24.
162. Zaravinos A. An updated overview of HPV-associated head and neck carcinomas. *Oncotarget*. 2014;5(12):3956–69.
163. Rettig EM, Zaidi M, Faraji F, Eisele DW, El Asmar M, Fung N, D'Souza G, Fakhry C. Oropharyngeal cancer is no longer a disease of younger patients, and the prognostic advantage of human papillomavirus is attenuated among older patients: Analysis of the National Cancer Database. *Oral Oncol*. 2018;83:147–153.
164. Ferreira CC. The relation between human papilloma virus (HPV) and oropharyngeal cancer: a review. *PeerJ*. 2023;11:e15568.
165. Sathish N, Wang X, Yuan Y. Human papillomavirus (HPV) – associated Oral Cancers and Treatment Strategies. *J Dent Res*. 2014;93(7 Suppl): 29S–36S.
166. Tezal M, Scannapieco FA, Wactawski-Wende J, Hyland A, Marshall JR, Rigual NR, et al. Local inflammation and human papilloma virus status of head and neck cancers. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2012;138(7):669–75.

167. Katirachi SK, Grønlund MP, Jakobsen KK, Grønhøj C, von Buchwald C. The prevalence of HPV in oral cavity squamous cell carcinoma. *Viruses*. 2023;15(2):451.
168. Stein AP, Saha S, Kraninger JL, Swick AD, Yu M, Lambert PF, Kimple RJ. Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal cancer: a systematic review. *Cancer J*. 2015; 21(3):138–46.
169. Yakin M, Seo B, Hussaini H, Rich A, Hunter K. Human papillomavirus and oral and oropharyngeal carcinoma: the essentials. *Aust Dent J*. 2019;64(1):11–8.
170. Senkomago V, Henley SJ, Thomas CC, Mix J M, Markowitz LE, Saraiya M. Human Papilloma virus-attributable cancers – United States, 2012–2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2019;68(33):724–8.
171. Dioguardi M, Spirito F, Sovereto D, Alovise M, Troiano G, Aiuto R, et al. MicroRNA-21 expression as a prognostic biomarker in oral cancer: systematic review and meta-analysis. *Int J Environ Res Public Health*. 2022;19(6).
172. Dioguardi M, Caloro GA, Laino L, Alovise M, Sovereto D, Crincoli V, et al. Circulating miR-21 as a potential biomarker for the diagnosis of oral cancer: a systematic review with meta-analysis. *Cancers (Basel)*. 2020;12(4).
173. Thomaïdou AC, Batsaki P, Adamaki M, Goulielmaki M, Baxevanis CN, Zoumpourlis V, Fortis SP. Promising Biomarkers in Head and Neck Cancer: The Most Clinically Important MiRNAs. *Int J Mol Sci*. 2022;23:8257.
174. Lubov J, Maschietto M, Ibrahim I, Mlynarek A, Hier M, Kowalski LP, Alaoui-Jamali M A, da Silva SD. Meta-analysis of microRNA expression in head and neck cancer: uncovering association with outcome and mechanisms. *Oncotarget*. 2017;8:55511–55524.
175. Shen M, Zhou Z, Li BB, Lv M, Feng C, Chen S, et al. Investigation of miR-21-5p key target genes and pathways in head and neck squamous cell carcinoma based on TCGA database and bioinformatics analysis. *Technol Cancer Res Treat*. 2022;21:15330338221081245.
176. Soga D, Yoshida S, Shiogama S, Miyazaki H, Kondo S, Shintani S. microRNA expression profiles in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2013;30(2):579–83.

177. Karabegovic I, Abozaid Y, Maas SCE, Labrecque J, Bos D, De Knecht RJ, et al. Plasma microRNA signature of alcohol consumption: the rotterdam study. *J Nutr.* 2023;152(12):2677–88.
178. Hajiasgharzadeh K, Naghipour B, Shahabi P, Dastmalchi N, Alipour MR. The role of microRNAs in nicotine signaling. *EXCLI J.* 2023;22:433–50.
179. Machowska M, Galka-Marciniak P, Kozłowski P. Consequences of genetic variants in miRNA genes. *Comput Struct Biotechnol J.* 2022;20:6443–57.
180. Sonehara K, Sakaue S, Maeda Y, Hirata J, Kishikawa T, Yamamoto K, et al. Genetic architecture of microRNA expression and its link to complex diseases in the Japanese population. *Hum Mol Genet.* 2022;31(11):1806–20.
181. Lissowska J, Pilarska A, Pilarski P, Samolczyk-Wanyura D, Piekarczyk J, Bardin-Mikollajczak A, et al. Smoking, alcohol, diet, dentition, and sexual practices in the epidemiology of oral cancer in Poland. *Eur J Cancer Prev.* 2003;12(1):25–33.
182. Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, et al. Alcohol drinking in never-users of tobacco, cigarette smoking in never-drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99(10):777–89.
183. Kuhlin B, Kramer B, Nefas V, Rotter N, Aderhold C. Indicators for secondary carcinoma in head and neck cancer patients following curative therapy: a retrospective clinical study. *Mol Clin Oncol.* 2020;12(5):403–10.
184. Moncrieff M, Sandilla J, Clark J, Clifford A, Shannon K, Gao K, et al. Outcomes of primary surgical treatment of T1 and T2 carcinomas of the oropharynx. *Laryngoscope.* 2009;119(2):307–11.
185. Thompson LDR, Burchette R, Iganej S, Bhattasali O. Oropharyngeal squamous cell carcinoma in 390 patients: analysis of clinical and histological criteria which significantly impact outcome. *Head Neck Pathol.* 2020;14(3):666–88.

186. Bauwens L, Baltres A, Fiani DJ, Zrounba P, Buiret G, Fleury B, et al. Prevalence and distribution of cervical lymph node metastases in HPV-positive and HPV-negative oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Radiother Oncol.* 2021;157:122–9.
187. Chloupek A, Kania J, Jurkiewicz D. Concordance between clinical and pathological T and N stages in Polish patients with head and neck cancers. *Diagnostics (Basel).* 2023; 13(13).
188. Choi N, Noh Y, Lee EK, Chung M, Baek CH, Baek KH, Jeong HS. Discrepancy between cTNM and pTNM staging of oral cavity cancers and its prognostic significance. *J Surg Oncol.* 2017;115(8):1011–1018.
189. Saka-Herran C, Jane-Salas E, Mari-Roig A, Estrugo-Devesa A, Lopez-Lopez J. Time-to-treatment in oral cancer: causes and implications for survival. *Cancers (Basel).* 2021; 13(6).
190. Tangthongkum M, Phisalmongkhon S, Leelasawatsuk P, Supanimitjaroenporn P, Kirtsreesakul V, Tantipisit J. Impact of human papillomavirus status on survival in patients with oral cancer. *Laryngoscope Investig Otolaryngol.* 2024;9(3):e1294.
191. Zhu J, Zhou R, Wang Y, Yu M. Perineural invasion as a prognostic factor in head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Acta Otolaryngol.* 2019;139(11):1038–43.
192. Yu EH, Tu HF, Wu CH, Yang CC, Chang KW. MicroRNA-21 promotes perineural invasion and impacts survival in patients with oral carcinoma. *J Chin Med Assoc.* 2017; 80(6):383–8.
193. Mendenhall WM, Hinerman RW, Amdur RJ, Malyapa RS, Lansford CD, Werning JW, et al. Postoperative radiotherapy for squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Med Res.* 2006;4(3):200–8.
194. Cheraghlou S, Otremba M, KuoYuP, Agogo GO, Hersey D, Judson BL. Prognostic value of lymph node yield and density in head and neck malignancies. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2018;158(6):1016–23.
195. Arantes LM, Laus AC, Melendez ME, de Carvalho AC, Sorroche BP, De Marchi PR, et al. MiR-21 as prognostic biomarker in head and neck squamous cell carcinoma patients undergoing an organ preservation protocol. *Oncotarget.* 2017;8(6):9911–21.

196. Hedbäck N, Jensen DH, Specht L, et al. MiR 21 Expression in the Tumor Stroma of Oral Squamous Cell Carcinoma: An Independent Biomarker of Disease Free Survival. *PLoS One*. 2014;9(4):e95193.
197. Wang H, Zhou Z, Lin W, et al. MicroRNA 21 promotes head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) induced transition of bone marrow mesenchymal stem cells to cancer associated fibroblasts. *BMC Cancer*. 2023;23:1135.
198. Mahmood N, Hanif M, Ahmed A, et al. Circulating miR 21 as a prognostic and predictive biomarker in oral squamous cell carcinoma. *Pak J Med Sci*. 2019;35(5):1408-1412.
199. Ren W, Wang X, Gao L, et al. Plasma miR 21 expression: an indicator for the severity of oral squamous cell carcinoma. *Biomarkers*. 2014;19(7):540-546.
200. Hsu CM, Lin PM, Wang YM, et al. Circulating miRNA is a novel marker for head and neck squamous cell carcinoma. *Tumour Biol*. 2012;33(6):1933-1942.
201. Ishinaga H, Okugawa Y, Hou B, et al. The role of miR 21 as a predictive biomarker and a potential target to improve the effects of chemoradiotherapy against head and neck squamous cell carcinoma. *J Radiat Res*. 2023;64(4):668-676.
202. Mehterov N., Sacconi A., Pulito C., Vladimirov B., Haralanov G., Pazardjikliev D., Nonchev B., Berindan-Neagoe I., Blandino G., Sarafian V. A novel panel of clinically relevant miRNAs signature accurately differentiates oral cancer from normal mucosa. *Front. Oncol*. 2022;12:1072579.
203. Orosz E., Gombos K., Petrevszky N., Csonka D., Haber I., Kaszas B., Toth A., Molnar K., Kalacs K., Piski Z., et al. Visualization of mucosal field in HPV positive and negative oropharyngeal squamous cell carcinomas: Combined genomic and radiology based 3D model. *Sci. Rep*. 2020;10:40.
204. Šimić I., Božinović K., Milutin Gašperov N., Kordić M., Pešut E., Manojlović L., Gree M., Dediol E., Sabol I. Head and Neck Cancer Patients' Survival According to HPV Status, miRNA Profiling, and Tumour Features-A Cohort Study. *Int. J. Mol. Sci*. 2023;24:3344.

205. Ko Y.H., Won H.S., Sun D.S., An H.J., Jeon E.K., Kim M.S., Lee H.H., Kang J.H., Jung C.K. Human papillomavirus-stratified analysis of the prognostic role of miR-21 in oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Pathol. Int.* 2014;64:499–507.

11. ŽIVOTOPIS

Opći podaci:

Radno iskustvo:

kolovoz 2020. god. – stalni sudski vještak medicinske struke iz područja maksilofacijalne i plastične kirurgije.

od 2018. god. – voditelj Odsjeka maksilofacijalne kirurgije na Klinici za ORL i MFK.

od rujna 2010. god.– u funkciji specijalista maksilofacijalne kirurgije.

od 2005. god. – zaposlen u SKB Mostar na Klinici za ORL i MFK najprije kao specijalizant, potom

2003–2005. god.– liječnik opće medicine, Dom zdravlja Mostar (HP, školska medicina).

2002–2003. god. – pripravnički staž, Dom zdravlja Mostar

Obrazovanje:

prosinac 2024. god. – završni rad iz zdravstvenog menadžmenta – SHCE 3.

lipanj 2022. god.– uspješno završena edukacija iz zdravstvenog menadžmenta – SHCE 2.

travanj 2021. god. – dodjeljuje se naziv primarijus za dugogodišnji uspješan rad i postignute posebne rezultate u zaštiti zdravlja stanovništva, kao i u razvoju zdravstva.

prosinac 2020. god. – PDDS Biomedicina i zdravstvo Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek.

studeni 2019. god. – položen subspecijalistički ispit iz plastične kirurgije glave i vrata, zvanje subspecijalist plastične kirurgije glave i vrata.

svibanj 2018. god.– uspješno završena edukacija iz zdravstvenog menadžmenta – SHCE 1.

listopad 2017. god. – početak subspecijalizacije iz plastične kirurgije glave i vrata.

prosinac 2013. god.– magistrirao na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Mostaru (tema magistarskog rada: “Učinak lokalne primjene deksametazona pri operacijama na licu na poslijeoperacijske kirurške ožiljke”).

rujan 2010. god.– položen specijalistički ispit (KB Dubrava) iz maksilofacijalne kirurgije, zvanje maksilofacijalni kirurg.

ožujak 2007. god. – specijalizantski staž u trajanju od trideset sedam mjeseci KKLČU, KB Dubrava, Zagreb (Hrvatska).

2006–2008. god. – poslijediplomski studij na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Mostaru pod nazivom „Medicinska skrb i javno zdravstvo“.

rujan 2005. god. – početak specijalizacije iz maksilofacijalne kirurgije KB Mostar.

1994–2001. god.– studij medicine na Medicinskom fakultetu Zagreb, studij u Splitu, Split.

1990–1994. god. – Srednja škola (gimnazija), Mostar.

1982–1990. god.– Osnovna škola, Mostar.

Nastavno iskustvo:

od 2019. god. – asistent na katedri Maksilofacijalne kirurgije na Studiju dentalne medicine.

od 2015. god. – viši asistent na katedri za Bolesti glave i vrata, polje kliničke medicinske znanosti, grana maksilofacijalna kirurgija na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Mostaru.

Publikacije:

1. Kordić M, Martinovic D, Puizina E, Bozic J, Zubcic Z, Dediol E. Impact of human papillomavirus on microRNA-21 expression in oral and oropharyngeal cancer – a systematic review. *Int J Mol Sci.* 2024 Jul 23;25(15):8038.

2. Sobrero F, Roccia F, Vilaplana V, Roig AM, Raveggi E, Ramieri G, Goetzinger M, Bottini GB, Rizvi AO, Laverick S, Knežević P, Dediol E, Kordić M, Sivrić A, Ganasouli D, Zanakis S N, Jelovac D, Konstantinovic VS, Birk A, Vesnaver A, Rabufetti A, Scolozzi P, Derkuş FE, Yilmaz UN, Politis C, Dubron K. Manual versus rigid intraoperative maxillo-mandibular fixation in the surgical management of mandibular fractures: a European prospective analysis. *Dent Traumatol.* 2023 Oct;39(5):448–454.

3. Šimić I, Božinović K, Milutin Gašperov N, Kordić M, Pešut E, Manojlović L, Grce M, Dediol E, Sabol I. Head and neck cancer patients' survival according to HPV status, miRNA profiling, and tumour features – a cohort study. *Int J Mol Sci.* 2023 Feb 7;24(4): 3344.

4. Roccia F, Sobrero F, Raveggi E, Rabufetti A, Scolozzi P, Dubron K, Politis C, Ganasouli D, Zanakis S N, Jelovac D, Konstantinovic V S, Birk A, Vesnaver A, Knežević P, Dediol E, Kordić M, Sivrić A, Rizvi AO, Laverick S, Vilaplana NV, Roig A M, Derkuş FE, Yilmaz U N, Goetzinger M, Bottini GB, Ramieri G. European multicenter prospective analysis of the use of maxillomandibular fixation for mandibular fractures treated with open reduction and internal fixation. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg.* 2023 Feb;124(1S):101376.

5. Sobrero F, Roccia F, Omedè M, Merlo F, Dubron K, Politis C, Rabufetti A, Scolozzi P, Ramieri G, Birk A, Vesnaver A, Rizvi AO, Laverick S, Jelovac D, Konstantinovic VS, Vilaplana V, Roig AM, Goetzinger M, Bottini GB, Knežević P, Dediol E, Kordić M, Sivrić A, Derkuş FE, Yilmaz UN, Ganasouli D, Zanakis SN. Current strategies for treatment of mandibular fractures with plate osteosynthesis: a European prospective study. *J Craniofac Surg.* 2024 Jun 1;35(4):1120–1124.

6. Roccia F, Sobrero F, Strada C, Bottini GB, Goetzinger M, Samieirad S, Vesnaver A, Birk A, de OliveiraGorla LF, Pereira-Filho VA, Dediol E, Kos B, Pechalova P, Sapundzhiev A, Lazić M, Konstantinovic VS, Dubron K, Politis C, Demo PG, Sivrić A, Kordić M, Rahman SA, Rahman T, Sohal K S, Aladelusi T, Rae E, Laverick S. Open reduction and internal fixation of paediatric maxillo-zygomatic complex fractures: An 11-year multicentric retrospective study. *Dent Traumatol.* 2024 Dec;40(6):680–687.

7. Bottini GB, Hitzl W, Götzinger M, Politis C, Dubron K, Kordić M, Sivrić A, Pechalova P, Sapundzhiev A, Pereira-Filho VA, de Oliveira Gorla LF, Dediol E, Kos B, Rahman T, Rahman SA, Samieirad S, Aladelusi T, Konstantinovic VS, Lazić M, Vesnaver A, Birk A, Sohal KS, Laverick S, Rae E, Rossi MB, Roccia F, Sobrero F. Management of mandibular condyle fractures in pediatric patients: a multicentric retrospective study with 180 children and adolescents. *J Clin Med.* 2024 Sep 14;13(18):5455.

8. Cena P, Raco I, Roccia F, Federica S, Dediol E, Kos B, Bottini GB, Goetzinger M, Samieirad S, Gorla LFO, Pereira-Filho VA, Pechalova P, Sapundzhiev A, Lazić M, Konstantinovic VS, Zavattero E, Sivrić A, Kordić M, Rahman S A, Rahman T, Sohal K S, Aladelusi T, Rae E, Laverick S, Vesnaver A, Birk A, Politis C, Dubron K. An 11-year multicentric surgical experience on pediatric orbital floor trapdoor fracture: a world oral maxillofacial trauma (WORMAT) project. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg.* 2024 Sep 3;126(1):102033.

9. Kraljevic D, Vukojevic K, Karan D, Rajic B, Todorovic J, Miskovic J, Tomic V, Kordic M, Soljic V. Proliferation, apoptosis and expression of matrix metalloproteinase-9 in human fetallung. *Acta Histochem.* 2015 May–Jun; 17(4-5):444–50.

10. Cremona G, Paione S, Roccia F, Samieirad S, Lazić M, Konstantinovic VS, Rae E, Laverick S, Vesnaver A, Birk A, de OliveiraGorla LF, Pereira-Filho VA, Dediol E, Kos B, Pechalova P, Sapundzhiev A, Dubron K, Politis C, Zavattero E, Bottini GB, Goetzinger M, Sivrić A, Kordić M, Rahman SA, Rahman T, Sohal KS, Aladelusi T, Sobrero F. Policy of fourteen maxillofacial divisions towards titanium plates removal after internal fixation of paediatric maxillofacial fractures: A World Oral Maxillofacial Trauma (WORMAT) project. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg.* 2024 Oct;125(5S2):101986.

11. Dediol E, Kordić M. Regarding incidence of inadequate perforators and salvage options for the anterior lateral thigh free flap. *Laryngoscope.* 2020 Jun;130(6):E387.

12. Sobrero F, Roccia F, Pereira-Filho VA, de OliveiraGorla LF, Sivrić A, Kordić M, Rahman S A, Rahman T, Aladelusi T, Sohal KS, Zavattero E, Bottini GB, Goetzinger M, Pechalova P, Sapundzhiev A, Dediol E, Kos B, Samieirad S, Lazić M, Konstantinovic VS, Rae E, Laverick S, Vesnaver A, Birk A, Politis C, Dubron K. Multicentre retrospective study on plate osteosynthesis for non-condylar mandibular fractures in paediatric patients with deciduous, mixed, and permanent dentition: A World Oral Maxillofacial Trauma (WORMAT) project. *J Craniomaxillofac Surg.* 2025 Feb 5: S1010–5182(25)00038-1.

13. Sobrero F, Roccia F, Bottini GB, Goetzinger M, Rae E, Laverick S, Strada C, Ramieri G, Politis C, Dubron K, Sivrić A, Kordić M, Rahman SA, Rahman T, Pereira-Filho VA, de Oliveira Gorla LF, Aladelusi T, Sohal KS, Lazić M, Konstantinović VS, Samieirad S, Pechalova P, Sapundzhiev A, Dediol E, Kos B, Vesnaver A, Birk A. Surgical management of paediatric frontal fractures with and without sinus pneumatisation: a multicentre study. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg.* 2025 Oct 10;127(2):102607.
doi:10.1016/j.jormas.2025.102607. Epub ahead of print. PMID: 41076083.

Kongresna priopćenja, sažetci i poster:

1. Sivrić A., Kordić M., Dediol E., Knežević P., Median cleft of lower lip and jaw – 11. Kongres Hrvatskog društva za oralnu kirurgiju 17. Kongres Hrvatskog društva za maksilofacijalnu, plastičnu i rekonstrukcijsku kirurgiju glave i vrata, 24–25. listopada 2025. Osijek.
2. Kordić M., Šimić G., Dediol E., Sivrić A., Pleomorphic adenoma involving deep lobe of parotid gland. – 16. Kongres Hrvatskog društva za maksilofacijalnu, plastičnu i rekonstruktivnu kirurgiju glave i vrata i 10. Kongres Hrvatskog društva za oralnu kirurgiju, 6–7. prosinca 2024. KB Dubrava, Zagreb.
3. Kordić M., Sivrić A., Petrović I., Knežević P., Dediol E., Frequency of cleft lip and palate in Herzegovina. – Kongres Hrvatskog društva za maksilofacijalnu, plastičnu i rekonstruktivnu kirurgiju glave i vrata i 10. Kongres Hrvatskog društva za oralnu kirurgiju, 6–7. prosinca 2024. KB Dubrava, Zagreb.
4. Kordić M., Sivrić A., Dediol E. Intraoral marginal zone lymphoma. U: Sažeci 15. kongresa Hrvatskog društva za maksilofacijalnu, plastičnu i rekonstrukcijsku kirurgiju glave i vrata i 9. kongresa Hrvatskog društva za oralnu kirurgiju s međunarodnim sudjelovanjem, 6–8. listopada 2022. Opatija, Hrvatska / Belušić-Gobič, Margita (ur.). Zagreb: Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2022. str. 439–439 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, stručni).