

# PROGNOSTIČKI ZNAČAJ POLIMORFIZMA GENA BIRC5 I EKSPRESIJE NJегоVIH IZOFORMI U PLANOCELULARNIM KARCINOMIMA USNE ŠUPLJINE I OROFARINKSA

---

Mumlek, Ivan

Doctoral thesis / Disertacija

2025

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:782474>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Ivan Mumlek

**PROGNOSTIČKI ZNAČAJ POLIMORFIZMA GENA *BIRC5* I EKSPRESIJE  
NJEGOVIH IZOFORMI U PLANOCELULARNIM KARCINOMIMA USNE  
ŠUPLJINE I OROFARINKSA**

Doktorska disertacija

Osijek, 2024.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Ivan Mumlek

**PROGNOSTIČKI ZNAČAJ POLIMORFIZMA GENA *BIRC5* I EKSPRESIJE  
NJEGOVIH IZOFORMI U PLANOCELULARNIM KARCINOMIMA USNE  
ŠUPLJINE I OROFARINKSA**

Doktorska disertacija

Osijek, 2024.

Mentorica: prof. dr. sc. Ljubica Glavaš Obrovac, redovita profesorica u trajnom zvanju Medicinskog fakulteta Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Komentorica: naslovna doc. dr. sc. Vesna Musani, viša znanstvena suradnica, Institut Ruđer Bošković, Zagreb

Rad ima 118 listova.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za maksilofacijalnu i oralnu kirurgiju Kliničkog bolničkog centra Osijek, Laboratoriju za nasljedni rak Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu te Katedri za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Osijeku.

Predgovor radu:

Iznimne zahvale posvećujem mentorici prof. dr. sc. Ljubici Glavaš Obrovac i komentorici doc. dr. sc. Vesni Musani koje su svojim strpljenjem, bogatim znanjem i iskustvom i kontinuiranim podrškama uvelike potpomogle dovršetak ove disertacije.

Hvala vam što ste mi u svakom trenutku bili potpora i što ste me uvele u znanstveni svijet.

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

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Planocelularni karcinom usne šupljine .....	1
1.1.1. Anatomija usne šupljine .....	2
1.1.2. Topografsko anatomske regije vrata .....	3
1.1.3. Epidemiologija i etiologija .....	6
1.1.4. Prekancerozne lezije .....	9
1.1.5. Dijagnostika i TNM klasifikacija .....	11
1.1.6. Patohistološke karakteristike tumora .....	13
1.1.7. Liječenje .....	15
1.2. Planocelularni karcinom orofarinksa .....	18
1.2.1. Anatomija ždrijela i orofarinksa .....	18
1.2.2. Etiologija i epidemiologija .....	20
1.2.3. Dijagnostika, TNM klasifikacija i patohistološke karakteristike .....	21
1.2.4. Liječenje .....	24
1.3. Prognostički čimbenici .....	24
1.4. Prognostički i prediktivni biomarkeri .....	25
1.5. Protein survivin .....	28
1.5.1. Struktura, lokalizacija i alterantivno prekrajanje gena <i>BIRC5</i> .....	29
1.5.2. Polimorfizmi gena <i>BIRC5</i> .....	32
1.5.3. Survivin i tumori usne šupljine i orofarinksa .....	32
2. HIPOTEZA .....	34
3. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	35
4. MATERIJALI I METODE .....	36
4.1. Ustroj studije .....	36
4.2. Ispitanici .....	36
4.3. Određivanje ekspresije izoformi .....	38
4.3.1. Uzorkovanje tkiva .....	38
4.3.2. Izolacija RNK iz tkiva .....	38
4.3.3. Određivanje koncentracija RNK .....	39
4.3.4. Reverzna transkripcija .....	39
4.3.5. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. real time PCR, qRT-PCR) .....	40
4.4. Analiza polimorfizama gena <i>BIRC5</i> .....	41
4.4.1. Izolacija genomske DNK .....	41
4.4.2. Određivanje koncentracije genomske DNK .....	42

4.4.3.	Lančana reakcija polimerazom (PCR) .....	43
4.4.4.	Elektroforeza .....	45
4.4.5.	Analiza heterodupleksa .....	46
4.4.6.	Sekvenciranje .....	47
4.5.	Statističke metode .....	48
5.	<b>REZULTATI</b> .....	50
5.1.	Osnovna obilježja bolesnika i zdravih kontrola .....	50
5.2.	Određivanje ekspresije izoformi gena <i>BIRC5</i> .....	52
5.2.1.	Određivanje razina relativne ekspresije izoformi gena <i>BIRC5</i> u tumorskom i zdravom tkivu.....	52
5.2.2.	Korelacija između ekspresija različitih izoformi gena <i>BIRC5</i> u tumorskom tkivu i zdravim kontrolama.....	54
5.3.	Polimorfizmi gena <i>BIRC5</i> u bolesnika i zdravih kontrola .....	57
5.3.1.	Polimorfizmi u promotorskoj regiji .....	58
5.3.2.	Polimorfizmi u regiji 5'UTR.....	61
5.3.3.	Polimorfizmi u regiji introna 2 .....	61
5.3.4.	Polimorfizmi u eksonu 4 .....	62
5.3.5.	Polimorfizmi u regiji 3'UTR.....	63
5.4.	Povezanost polimorfizama gena <i>BIRC5</i> i ekspresije izoformi gena <i>BIRC5</i> u bolesnika i zdravih kontrola .....	67
5.5.	Povezanost ekspresijskih obrazaca s kliničko-patološkim parametrima .....	75
5.6.	Povezanost polimorfizama s kliničko patološkim parametrima .....	77
5.7.	Povezanost ekspresijskih obrazaca i polimorfizama s preživljenjem.....	82
6.	<b>RASPRAVA</b> .....	84
6.1.	Ekspresija izoformi gena <i>BIRC5</i> u tumorskom i zdravom tkivu.....	85
6.2.	Korelacije ekspresije različitih izoformi gena <i>BIRC5</i> između tumorskog i zdravog tkiva, kao i s kliničko patološkim obilježjima.....	87
6.3.	Polimorfizmi gena <i>BIRC5</i> u bolesnika i zdravih kontrola .....	88
6.4.	Povezanost ekspresija izoformi i polimorfizama gena <i>BIRC5</i> .....	89
6.5.	Povezanost polimorfizama i kliničko-patoloških parametara .....	90
7.	<b>ZAKLJUČAK</b> .....	94
8.	<b>SAŽETAK</b> .....	95
9.	<b>SUMMARY</b> .....	97
10.	<b>LITERATURA</b> .....	99
11.	<b>ŽIVOTOPIS</b> .....	115

## POPIS KRATICA

<b>3DCRT</b>	3D konformalna radioterapija (engl. <i>three-dimensional conformal radiation therapy</i> )
<b>AJCC</b>	Američko udruženje za rak (engl. <i>American Joint Committee on Cancers</i> )
<b>BIRC5</b>	bakulovirusni inhibitor apoptoze 5 (engl. <i>baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5</i> )
<b>CDT</b>	kronična dentalna trauma (engl. <i>chronic dental trauma</i> )
<b>CPS</b>	kombinirana pozitivna vrijednost (engl. <i>combined positive score</i> )
<b>cTNM</b>	klinički stadij tumor, čvor metastaza
<b>DNA</b>	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
<b>DOI</b>	dubina invazije (engl. <i>depth of invasion</i> )
<b>DPT</b>	drugi primarni tumor
<b>DSS</b>	preživljenje specifično za bolest (engl. <i>disease specific survival</i> )
<b>DV</b>	disekcija vrata
<b>ENE</b>	proboj kapsule limfnog čvora (engl. <i>extranodal extension</i> )
<b>FDA</b>	Američka agencija za hranu i lijekove (engl. <i>Food and drug association</i> )
<b>HNSCC</b>	tumori glave i vrata (engl. <i>head and neck squamous cell carcinoma</i> )
<b>HPV</b>	humani papilomavirus (engl. <i>human papillomavirus</i> )
<b>IAP</b>	obitelji proteina inhibitora apoptoze (engl. <i>inhibitor apoptosis protein</i> )
<b>IMRT</b>	radioterapija snopovima promjenjivog intenziteta (engl. <i>intensity modulated radiation therapy</i> )
<b>LSCC</b>	pločasti karcinom grkljana (engl. <i>laryngeal squamous cell carcinoma</i> )
<b>LVI</b>	limfovaskularna invazija (engl. <i>lymphovascular invasion</i> )
<b>MAF</b>	frekvencija rjeđeg alela (engl. <i>minor allele frequency</i> )
<b>mRDV</b>	modificirana radikalna disekcija vrata
<b>NCCN</b>	nacionalna sveobuhvatna mreža za rak (engl. <i>National comprehensive cancer network</i> )



<b>NSND</b>	nepušači, nekonzumenti alkohola, (engl. <i>non smoker non drinker</i> )
<b>OPCC</b>	pločasti karcinom orofarinksa (engl. <i>oropharyngeal squamous cell carcinoma</i> )
<b>OPMD</b>	oralni potencijalno maligni poremećaji (engl. <i>oral potentially malignant disorders</i> )
<b>OS</b>	sveukupno preživljenje (engl. <i>overall survival</i> )
<b>OSCC</b>	pločasti karcinom usne šupljine (engl. <i>oral squamous cell carcinoma</i> )
<b>PCR</b>	lančana reakcija polimerazom (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
<b>PD-1</b>	protein programirane stanične smrti (engl. <i>programmed cell death protein 1</i> )
<b>PD-L1</b>	ligand programirane stanične smrti (engl. <i>programmed cell death protein 1 ligand</i> )
<b>PET/CT</b>	pozitronska emisijska tomografija s komjuteriziranom tomografijom (engl. <i>positron emission tomography/computed tomography scan</i> )
<b>PNI</b>	perineuralna invazija (engl. <i>perineural invasion</i> )
<b>pTNM</b>	patološki stadij tumor, čvor metastaza
<b>RNA</b>	ribonukleinska kiselina (engl. <i>ribonucleic acid</i> )
<b>SDV</b>	selektivna disekcija vrata
<b>SNP</b>	polimorfizam jednog nukleotida (engl. <i>single nucleotide polymorphism</i> )
<b>TB</b>	pupanje tumora (engl. <i>tumor budding</i> )
<b>TNM</b>	tumor čvor metastaza (engl. <i>tumor, nodal, metastasis</i> )
<b>WHO</b>	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organisation</i> )

## SLIKE

**Slika 1.1.** Anatomija usne šupljine (preuzeto i prilagođeno s <https://www.shutterstock.com/image-illustration/anatomy-mouth-digital-illustration-636022079>)

**Slika 1.2.** Prikaz regija limfnih čvorova vrata (dozvolom ©2016 Terese Winslow LLC, U.S. Govt.)

**Slika 1.3.** Shematski prikaz dubine invazije (DOI) i debljine tumora

**Slika 1.4.** Shematski prikaz funkcije gena *BIRC5* (modificirano prema Deveraux i sur. 1997.)

**Slika 1.5.** Struktura gena *BIRC5* i njegovih izoformi - shematski prikaz alternativno prekrojenih varijanti gena *BIRC5*

**Slika 4.1.** Elektroforeza na agaroznom gelu: PCR produkt eksona 4 (uređaj Image Alliance 4.7)

**Slika 4.2.** Krivulje mekšanja – krivulja derivacije za polimorfizam c.9809T>C, odnosno c.\*571T>C; jasna distribucija homozigota (CC), heterozigota (TC) i N (TT)

**Slika 5.1.** Usporedba relativnih ekspresija osam izoformi gena *BIRC5* u bolesnika i zdravih kontrola (crveni kvadratići označavaju medijan, zelene crte predstavljaju interkvartilni raspon) – (korišten je Mann-Whitneyev test)

**Slika 5.2.** Neravnoteža povezivanja u paru (od engl. *pairwise linkage disequilibrium LD*)

**Slika 5.3.** Povezanost polimorfizma c.-31G>C i relativnih ekspresija izoforme S 3γM u bolesnika na razini a) alela i b) genotipa

**Slika 5.4.** Povezanost polimorfizma c.221+209T>C i relativnih ekspresija izoforme S 3α u bolesnika na razini a) alela i b) genotipova (Mann-Whitney test)

**Slika 5.5.** Povezanost polimorfizma c.385G>A i relativnih ekspresija izoforme S 3γV u bolesnika na razini a) alela i b) genotipova (Mann-Whitney test)

**Slika 5.6.** Povezanost polimorfizma c.\*148T>C i relativnih ekspresija izoforme S 3α u bolesnika na razini a) alela (Mann-Whitney test) i b) genotipova (Kruskal-Wallis test)

**Slika 5.7.** Povezanost polimorfizma c.\*571T>C i relativnih ekspresija izoforme S 3γV u bolesnika na razini a) alela (Mann-Whitney test) i b) genotipova (Kruskal-Wallis test)

**Slika 5.8.** Povezanost polimorfizma c.\*571T>C i relativne ekspresije izoforme S 3 $\gamma$ M u bolesnika (Mann-Whitney test)

**Slika 5.9.** Povezanost polimorfizma c.-235G>A i relativne ekspresije izoforme S 2B u zdravih kontrola na razini a) alela i b) genotipa (Mann-Whitney test)

**Slika 5.10.** Povezanost genotipova polimorfizma c.221+209T>C i relativne ekspresije izoforme S 2 $\alpha$  u zdravih kontrola (Mann-Whitney test)

**Slika 5.11.** Povezanost polimorfizma c.-644T>C i relativne ekspresije izoforme S 3 $\alpha$  u zdravih kontrola na razini a) alela (Mann-Whitney test) b) genotipova (Kruskal- Wallis test)

**Slika 5.12.** Povezanost polimorfizma c.\*148T>C i relativne ekspresije izoforme S wt u zdravih kontrola (Mann-Whitney test)

**Slika 5.13.** Povezanost polimorfizma c.-625G>C i relativne ekspresije izoforme a) S 3  $\alpha$  i b) S 3B u zdravih kontrola (Mann-Whitney test)

**Slika 5.14.** Povezanost ekspresije izoforme S  $\Delta$ ex3 i tumorskog sijela (Mann-Whitney test)

**Slika 5.15.** Povezanost ekspresije izoforme S  $\Delta$ ex3 i kliničkog TNM stadija, 1- rani stadij I i II, 2- kasni stadij III i IV, (Mann-Whitney test)

**Slika 5.16.** Shematski prikaz polimorfizama i povezanosti s kliničko patološkim parametrima

**Slika 5.17.** Prikaz sveukupnog preživljenja (OS) za ispitivanu skupinu bolesnika;

**Slika 5.18.** Ovisnost preživljenja povezanog s bolesti o ekspresiji izoforme S wt

## TABLICE

**Tablica 1.1.** Anatomski stupnjevi proširenosti tumorske bolesti - TNM klasifikacija karcinoma usne šupljine

**Tablica 1.2.** TNM klasifikacija HPV (+) orofaringealnog karcinoma

**Tablica 1.3.** TNM klasifikacija HPV (-) orofaringealnog karcinoma

**Tablica 4.1.** Sekvence početnica korištene za određivanje ekspresije izoformi gena za survivin

**Tablica 4.2.** Sekvence početnica za genotipizaciju i uvjeti reakcije PCR

**Tablica 5.1.** Demografska obilježja ispitanika (dob, spol i status pušenja)

**Tablica 5.2.** Kliničkopatološka obilježja ispitanika

**Tablica 5.3.** Usporedba razina ekspresije izoformi gena *BIRC5* u tumorskom tkivu i zdravim kontrolama

**Tablica 5.4.** Korelacija između ekspresije pojedinih izoformi gena *BIRC5* u **tumorskim tkivima**

**Tablica 5.5.** Korelacija između ekspresije pojedinih izoformi gena *BIRC5* u **zdravih kontrola**

**Tablica 5.6.** Polimorfizmi u *BIRC5* regiji pronađeni u uzorcima krvi bolesnika i zdravih kontrola.

**Tablica 5.7.** Distribucija genotipova i alela polimorfizma promotorske regije kod zdravih kontrola i bolesnika

**Tablica 5.8.** Distribucija genotipova i alela polimorfizma c.-31G>C u 5'UTR regiji u zdravim kontrolama i bolesnicima

**Tablica 5.9.** Distribucija genotipova i alela polimorfizma u regiji introna 2: rs4789551 (c.221+209T>C) i rs4789551 (c.221+209T>C) u zdravim kontrolama i bolesnicima

**Tablica 5.10.** Distribucija genotipova i alela polimorfizma c.385G>A u zdravim kontrolama i bolesnicima (masnim slovima upisana je statistički značajna razlika)

**Tablica 5.11.** Distribucija genotipova i alela polimorfizama u regiji 3'UTR u zdravim kontrolama i bolesnicima (masnim slovima upisana je statistički značajna razlika)

**Tablica 5.12.** Zbirni prikaz p vrijednosti korelacija ekspresije pojedinih izoformi te genotipova i alela pojedinih polimorfizama.

**Tablica 5.13.** Povezanost polimorfizama u odnosu na spol

**Tablica 5.14.** Povezanost polimorfizama s pušenjem

**Tablica 5.15.** Povezanost polimorfizma c.385G>A s veličinom primarnog tumora

**Tablica 5.16.** Povezanost polimorfizama i statusa limfnih čvorova vrata, kliničkih (cN) ili patoloških (pN)

**Tablica 5.17.** Povezanost polimorfizama i kliničkog (cTNM) i patološkog (pTNM) stadija bolesti

## 1. UVOD

Većina zloćudnih tumora glave i vrata potiče od pločastog epitela sluznice gornjeg dišno-probavnog sustava, a objedinjeni su pod nazivom „karcinom pločastih stanica glave i vrata“ (od engl. HNSCC - *head and neck squamous cell carcinoma*) (1). Najčešća lokalizacija karcinoma pločastih stanica glave i vrata je usna šupljina (engl. *oral squamous cell carcinoma*, OSCC), usni dio ždrijela - orofarinks (engl. *oropharyngeal squamous cell carcinoma*, OPSCC) i grkljan (engl. *laryngeal squamous cell carcinoma*, LSCC), a rjeđa sijela su nazofarinks, hipofarinks, nosna šupljina i sinusi te žlijezde slinovnice (2). U preko 90 % slučajeva patohistološki se radi o karcinomu pločastih stanica, planocelularnom karcinomu. Među ostale rjeđe malignome spadaju tumori žlijezda slinovnica, sarkomi, sluznični melanom i ostali rijetki tumori (3). Karcinom glave i vrata šesti je najčešći maligni tumor u svijetu i godišnje se dijagnosticira više od 830 000 novih slučajeva, a više od 450 000 oboljelih umre (4). Ukupan broj novooboljelih od tumora glave i vrata u SAD-u u 2021. godini iznosio je nešto manje od 70 000 (5). U Europi su stope i incidencije i smrtnosti od karcinoma glave i vrata veće nego u SAD-u. U 2022. godini u Europskoj uniji dijagnosticirano je oko 105 000 novih slučajeva (6). U Hrvatskoj su 2022. godine dijagnosticirana 914 karcinoma glave i vrata, a broj smrtnih ishoda bio je 476 te nije primjetna značajnija promjena incidencije zadnjih deset godina (6). Unatoč agresivnom i multimodalnom liječenju, tehnološkom napretku i napretku dijagnostičkih i terapijskih postupaka petogodišnje doživljenje i dalje se nije značajno promijenilo desetljećima i ono iznosi za sve stadije ove bolesti oko 55 - 60 % (4). Iako je usna šupljina vrlo pristupačna kliničkom pregledu i dalje se gotovo polovica tumora otkrije u kasnom (III. i IV.) stadiju bolesti. Sve ove činjenice ukazuju na potrebu istraživanja molekularne podloge razvoja zloćudnih tumora glave i vrata kako bi se poboljšalo liječenje i prognoza bolesnika s ovom skupinom zloćudnih bolesti.

### 1.1. Planocelularni karcinom usne šupljine

Karcinom usne šupljine ili oralni karcinom (engl. *oral squamous cell carcinoma*, OSCC) najčešći je zloćudni tumor glave i vrata i predstavlja oko 2 – 3 % svih zloćudnih tumora u

Europi i SAD-u (4). Budući da je u preko 90% slučajeva riječ o planocelularnom karcinomu, naziv oralni ili intraoralni karcinom u kliničkoj se praksi odnosi na planocelularni karcinom.

### 1.1.1. Anatomija usne šupljine

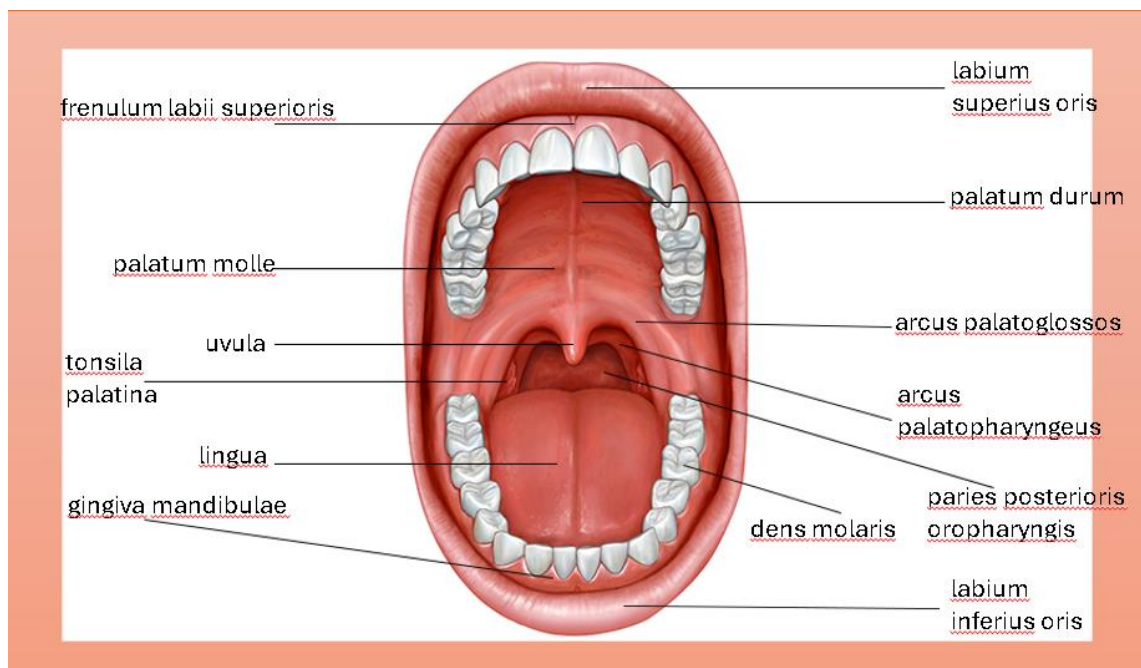
Usna šupljina obuhvaća prostor između usana, obraza i zubnih lukova, poznat kao usno predvorje (lat. *vestibulum oris*) te prostor između zubi i ždrijela, poznat kao prava usna šupljina (lat. *cavum oris proprium*). Usni otvor, poznat kao rima oris, nalazi se sprijeda i zatvaraju ga gornja i donja usna (lat. *labium oris*). Usne se sastoje od mnogo mišića prekrivenih kožom što ih čini iznimno pokretnima i omogućuje im sudjelovanje u raznim funkcijama, uključujući uzimanje hrane i oblikovanje glasova (7).

Prava usna šupljina prostire se od zubnih lukova te alveolarnih nastavaka gornje i donje čeljusti do početka ždrijela, gdje se nalazi ždrijelni tjesnac (lat. *isthmus faucium*) kojeg oblikuju meko nepce, nepčani lukovi i korijen jezika (Slika 1.1.) (8). Koštano osnovu usne šupljine čine gornja i donja čeljust. Krov usne šupljine čini nepce, koje je u prednjem dijelu koštano tvrdo nepce, (lat. *palatum durum*) sastavljeno od palatinalnog nastavka gornje čeljusti i horizontalnog nastavka palatinalne kosti, a stražnji mišićni dio meko nepce (lat. *palatum molle*). U dnu usne šupljine nalazi se jezik. Jezik se sastoji od četiri ekstrinzična (lat. *m. genioglossus*, *m. styloglossus*, *m. hyoglossus* i *m. palatoglossus*) i četiri intrinzična mišića (gornji i donji longitudinalni, transverzalni i vertikalni). Stražnji dio usne šupljine ograničen je sluzničkim naborima (lat. *arcus palatoglossus* i *palatopharyngeus*) koji pripadaju mekom nepcu, a ono je anatomski dio orofarinksa (7).

Najčešća lokalizacija oralnog karcinoma je područje ventralne strane i lateralnih rubova jezika, sublingvalno područje i retromolarni trigonum, a naziva se tzv. rezervoar ili „bazen sline“, gdje se na površini od svega jedne petine ukupne površine sluznice usne šupljine razvije gotovo 80 % karcinoma (9).

Usna šupljina predstavlja početni dio probavnog sustava i ima nekoliko ključnih funkcija. Prvenstveno, služi za unos hrane koja se tamo obrađuje putem žvakanja i inicijalne razgradnje ugljikohidrata uz pomoć enzima amilaza (ptijalin). Nakon toga, hrana se gura prema ždrijelu u procesu gutanja. Usna šupljina također ima važnu ulogu u procesu disanja i formiranju glasova. U usnoj šupljini nalaze se osjetila za bol, dodir, toplinu i okusi poput slatkog, kiselog, slanog i

gorkog. Također, zalogaj hrane u ustima potiče slinovnice na izlučivanje sline koja vlaži i omekšava hranu, olakšavajući proces gutanja (10).



**Slika 1.1.** Anatomija usne šupljine (preuzeto iz <https://www.shutterstock.com/image-illustration/anatomy-mouth-digital-illustration-636022079>) (8)

### 1.1.2. Topografsko anatomске regije vrata

Planocelularni karcinom usne šupljine izrazito je agresivan zloćudni tumor čije su karakteristike lokalni rast kao te širenje, odnosno metastaziranje prvenstveno u regionalne limfne čvorove, ali i u druge organske sustave (udaljene presadnice). Inicijalni oblik metastaziranja je, dakle, u pravilu uvijek limfogen, a tek potom limfnim žilama hematogeno u udaljene organe. Za razumijevanje puteva širenja tumorskih stanica potrebno je poznavati drenažni sustav limfatika vrata (11).

U odraslom organizmu nalazi se oko 600 limfnih čvorova od kojih je oko 300 smješteno na glavi i vratu (12). Tijekom povijesti koristile su se brojne klasifikacije limfnih čvorova vrata, a

prva se pripisuje Henriju Rouvièreu i njegovoj publikaciji iz 1932. godine pod nazivom "Anatomie des Lymphatiques de l'Homme" (13). U svojoj studiji, Rouvière je opisao limfne čvorove vrata oblikovane poput ovratnika koji obgrljuje gornji aerodigestivni trakt, a uključivao je submentalne, facijalne, submandibularne, parotidne, mastoidne, okcipitalne i retrofaringealne čvorove. Također je identificirao dvije grupe limfnih čvorova koje se protežu uzduž vrata, a to su čvorovi prednje cervikalne i posterolateralne grupe (14). Međutim, ovaj sustav temeljio se na anatomskim obilježjima dobivenim disekcijom, što ga je činilo nepotpuno prikladnim za potrebe rada u kliničkom okruženju. Zato se tada razvija nova terminologija za limfne čvorove koji se mogu palpirati. Najčešće korišten sustav klasifikacije limfnih čvorova temelji se na numeričkim skupinama i prvotno je osmišljen tijekom tridesetih godina prošlog stoljeća u Memorial Sloan Kettering Cancer Centru u New Yorku, USA. Od tada se ovaj sustav više puta mijenjao (15). 1991. godine Američka akademija otorinolaringologije objavila je standardiziranu verziju ovog sustava (15) kako bi osigurala jedinstveni pristup disekciji vrata. Ova standardizacija dodatno je ažurirana 2002. godine kada su dodane i podskupine kao što su IIa i IIb, Va i Vb (16), slika 1.2.

Različite regije vrata igraju ključnu ulogu u drenaži limfnih čvorova i dijagnozi karcinoma glave i vrata:

**Regija I** obuhvaća submentalne i submandibularne limfne čvorove. Submentalni limfni čvorovi smješteni su između dva prednja trbuha digastričnog mišića i jezične kosti (regija Ia). Submandibularni limfni čvorovi nalaze se između mandibule, prednjeg i stražnjeg trbuha digastričnog mišića te stilohipoidnog mišića (regija Ib). Karcinomi koji zahvaćaju donju usnicu, dno usta, jezik i gingivu mandibule često se dreniraju u ovu regiju.

**Regija II** obuhvaća gornje jugularne čvorove koji se protežu uz *v. jugularis internu* od baze lubanje do razine jezične kosti. Ova regija podijeljena je na IIa (sprijeda i ispod akcesornog živca) i IIb regiju (straga i iznad akcesornog živca). Karcinomi cijele usne šupljine, kao i karcinomi nazo-, oro- i hipofarinksa, larinksa, paranazalnih sinusa i parotidne žlijezde često se dreniraju u ovu regiju.



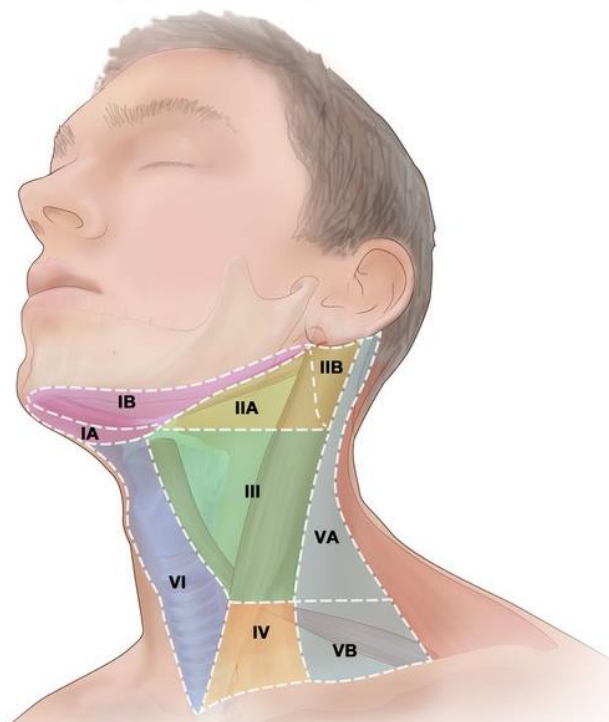
**Regija III** obuhvaća srednje jugularne čvorove uz *v. jugularis internu* od razine jezične kosti do razine krikoidne hrskavice. Ovdje se također dreniraju karcinomi iz cijele usne šupljine, nazo-, oro- i hipofarinksa, larinksa, paranazalnih sinusa i parotidne žlijezde.

**Regija IV** obuhvaća donje jugularne čvorove uz *v. jugularis internu* od krikoidne hrskavice do ključne kosti. Najčešće se u ovu regiju dreniraju karcinomi hipofarinksa, larinksa, cervikalnog dijela jednjaka i štitnjače.

**Regija V** obuhvaća čvorove stražnjeg vratnog trokuta koji su omeđeni sprijeda stražnjim rubom sternokleidomastoidnog mišića, straga prednjim rubom trapezijusa, a donju plohu trokuta čini klavikula. Razina krikoidne hrskavice virtualno dijeli čvorove regije V na Va (gornji akcesorni l.č.) i Vb (donji supraklavikularni čvorovi). U ovu regiju često se dreniraju karcinomi epifarinksa, orofarinksa, te kožni karcinomi stražnjeg dijela vlasišta i vrata. Također, u ovu regiju moguće su i udaljene presadnice iz drugih organskih sustava, od kojih su tipične Wirchovljeve metastaze podrijetla probavnog sustava.

**Regija VI** obuhvaća prednje vratne čvorove, uključujući pre- i paratrahealne, prekrikoidne i peritiroidne čvorove. Anatomska ograničenja su jezična kost gore, jugulum dolje, a lateralno zajedničke su karotidne arterije. Karcinomi štitnjače, larinksa i hipofarinksa često se dreniraju u ovu regiju.

**Regija VII** obuhvaća gornje medijastinalne čvorove koji su smješteni niže od juguluma.



**Slika 1.2** Prikaz regija limfnih čvorova vrata (dozvolom ©2016 Terese Winslow LLC, U.S. Govt.)

### 1.1.3. Epidemiologija i etiologija

Epidemiološka slika oralnog karcinoma varira geografskom širinom i vezana je uz specifične etiološke faktore. Najvišu stopu incidencije oralnog karcinoma prema podacima Globocana iz 2020. godine imaju Papua Nova Gvineja (13,8), Šri Lanka (13,2) i Mađarska (11,9) (17). U Indiji i Tajvanu karcinom usne šupljine je najčešća maligna bolest muškaraca, a treća maligna bolest u žena (18). U Europi stopa iznosi 8,7, a u Sjevernoj Americi je nešto niža te iznosi 7,4 (17). Epidemiološka slika Hrvatske prati svjetske i europske trendove te je ukupan broj novooboljelih u jednoj godini između 300 i 400.

Glavni rizični čimbenici u razvoju OSCC su konzumiranje alkoholnih pića i pušenje cigareta, a njihov štetni učinak je sinergistički (19–21).

Pušenje cigareta predstavlja neovisni rizični faktor za razvoj karcinoma usne šupljine. Više od 300 identificiranih karcinogena u cigaretnom dimu oštećuje DNK, a većina tih karcinogena, kao što su polciklički benzopireni i nitrozoamini, topljivi su u vodi ili slini i djeluju lokalno na

sluznicu gornjeg aerodigestivnog trakta. Ovi karcinogeni uzrokuju mutacije u genu *TP53*, koje su češće kod pušača koji boluju od karcinoma usne šupljine, sugerirajući da je to vjerojatni molekularni mehanizam razvoja karcinoma (22). Rizik od razvoja karcinoma usne šupljine značajno je viši kod pušača, čak 6 – 8 puta veći u usporedbi s nepušačima. Važno je napomenuti da su promjene na sluznici usne šupljine uzrokovane pušenjem reverzibilne. Prestankom pušenja rizik se smanjuje, a ako je prošlo više od 10 godina, rizik se smanjuje za 50 %. Nakon 17 godina, rizik od razvoja karcinoma usne šupljine postaje gotovo jednak kao kod nepušača (23). Žvakanje duhana i držanje duhana u ustima između bukalne sluznice i zuba također može dovesti do razvoja karcinoma, posebno na bukalnoj sluznici. Ova praksa je raširena u različitim dijelovima svijeta, uključujući neke dijelove SAD-a i zapadne Europe gdje je pušenje zabranjeno na javnim mjestima, te u jugoistočnoj Aziji gdje se duhan žvače samostalno ili s batel i areka oraščićima (24).

Alkohol je poznat karcinogen, što je potvrđeno i u mnogim istraživanjima. Međutim, točan mehanizam karcinogeneze uzrokovan alkoholom nije u potpunosti poznat. Postoji nekoliko teorija o tome kako alkohol može doprinijeti razvoju karcinoma usne šupljine. Jedna teorija sugerira da alkohol djeluje lokalno na epitelne stanice usne šupljine, čineći ih manje otpornima i time osjetljivijima na utjecaj drugih karcinogena (25). Prema drugoj teoriji, alkohol može smanjiti protok sline, što rezultira duljim izlaganjem epitelnih stanica djelovanju alkohola, ali i drugih potencijalnih karcinogena (26). Treći potencijalni mehanizam uključuje metabolizam alkohola nakon ingestije, gdje njegovi metaboliti ulaze u krvotok i izlučuju se u slinu. To može rezultirati produženim kontaktom tih karcinogenih tvari s oralnom sluznicom, što može uzrokovati oštećenja i doprinijeti karcinogenezi. Istodobna konzumacija duhanskih proizvoda i alkoholnih pića povećava rizik za razvoj OSCC-a na 6 – 15 puta (27,28). Važno je naglasiti da količina konzumiranog alkohola ima veći utjecaj na rizik od razvoja karcinoma u usporedbi s brojem konzumiranih cigareta. To znači da ako pušač koji pije alkohol udvostruči svoju konzumaciju alkohola, ima veći rizik od razvoja karcinoma u usporedbi s osobom koja udvostruči broj dnevno popušanih cigareta (29).

Mehanizam HPV infekcije kao potencijalnog uzročnika karcinoma usne šupljine nije još u potpunosti razjašnjen i smatra se da on čini manju podgrupu od svega 3 – 5 % HPV pozitivnih

intraoralnih karcinoma (30,31), a puno je jasniji etiološki faktor kod karcinoma orofarinksa, gdje će biti potanko objašnjen u poglavlju 1.2.2.

Uživanje u žvakanju tzv. betel oraščića, odnosno plodova biljke *areca*, predstavlja glavni etiološki faktor nastanka karcinoma usne šupljine u južnoj i jugoistočnoj Aziji. Žvakanjem i zadržavanjem plodova na sluznici usne šupljine, a osobito na bukalnoj sluznici, alveolarnom grebenu i jeziku, potiče se stvaranje akreom induciranih lihenoidnih lezija, oralne leukoplakije i oralne submukozne fibroze, kao prekursorskih lezija u nastanku *in situ* planocelularnog karcinoma (31,32).

Kronična dentalna trauma (engl. *chronic dental trauma, CDT*) kao rezultat loše adaptirane zubne proteze ili nesanimirane denticije može imati utjecaj na sluznicu gingivobukalnog područja. Stoga neki autori sugeriraju potencijalnu uzročnu povezanost između CDT-a i razvoja gingivobukalnog karcinoma kod pacijenata bez klasičnih etioloških faktora (engl. *nonsmoker, nondrinker, NSND*) (33). Budući da su do sada istraživanja bila ograničena na retrospektivne studije, za bolje razumijevanje veze između CDT-a i OSCC-a, neophodno je provesti sveobuhvatno dokumentiranje povijesti traume stomatognatskog aparata kod pacijenata s OSCC-om, kao i istraživanje životinjskih modela, kako bi se bolje razumjela potencijalna uloga CDT-a kao uzročnog faktora (33).

U posljednjem desetljeću velika je pozornost posvećena i istraživanjima na utjecaju mikrobioma na razvoj tumora pa tako i mikrobiomu usne šupljine, odnosno patogenim i komenzalnim bakterijama usne šupljine, koje svojim metaboličkim nusproduktima mogu izazvati trajne genetske promjene u epitelnim stanicama domaćina u smislu podržavanja kronične upale, ali i razvoju karcinogeneze (34,35). Objavljeni rezultati sugeriraju da su parodontni patogeni, kao što su *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* i *Treponema denticola*, povezani s oralnim karcinomom skvamoznih stanica (OSCC) (35) tako što inhibicijom apoptoze i aktivacijom kronične upale stimuliraju tumorigenezu (35).

Općenito, muškarci stariji od 50 godina obolijevaju od oralnog karcinoma četiri puta češće od žena. Porast incidencije oboljelih u mlađoj životnoj dobi povezuje se s HPV infekcijom (najzastupljeniji je HPV tip 16), koja se najčešće prenosi spolnim kontaktom, međutim za usnu šupljinu i dalje je to manje značajan postotak. Osobito se u toj podgrupi izdvaja skupina HPV p16 pozitivnih tumora među nepušačima i osobama ženskog spola koje ne konzumiraju

alkoholna pića, a prognostički imaju lošije preživljenje. Više od 80 % OSCC razvija se u takozvanom „bazenu sline“, potkovastom području usne šupljine koje čini dno usne šupljine, ventralna površina i lateralni rub jezika te retromolarno područje. Karcinomi sa sijelom na jeziku i dnu usne šupljine čine više od 50 % OSCC. Važno je napomenuti da bolesnici s OSCC-om imaju povećani rizik za razvoj popratnih tumora, osobito u usnoj šupljini, zbog široke genetski osjetljive sluznice na kancerogene čimbenike. Na temelju ispunjavanja specifičnih kriterija, ovi popratni tumori mogu se nazvati drugim primarnim tumorima (DPT) (19), koji se dalje mogu kategorizirati u sinkrone i metakrone tumore. Sinkronim tumorima smatraju se drugi primarni tumori koji se dokažu u trenutku postavljanja dijagnoze prvog, indeksnog tumora ili unutar šest mjeseci, a metakronim se nazivaju drugi primarni tumori koji se dokažu barem šest mjeseci nakon dijagnosticiranja indeksnog primarnog tumora.

#### 1.1.4. Prekancerozne lezije

U onkogenezi pločastih karcinoma usne šupljine postoje prekancerozne lezije sluznice koje imaju različiti stupanj maligne alteracije, a koje Svjetska zdravstvena organizacija (engl. WHO – World Health Organisation) od 2022. godine naziva „oralni potencijalno maligni poremećaji“ (engl. OPMD – *oral potentially malignant disorders*). U ove poremećaju pripadaju leukoplakija, leukoeritroplakija, eritroplakija, oralna submukozna fibroza, kronična kandidijaza, lichen ruber planus i još neke rjeđe promjene (36). Leukoplakija i eritroplakija, najčešće prekancerozne promjene usne šupljine, privlače posebnu pozornost kliničara i znanstvenika zbog rizika od maligne transformacije. Procjenjuje se da je prevalencija leukoplakije u svijetu 2 – 3 %, s mogućnošću maligne alteracije u 4 – 6 % slučajeva (37–39), a prevalencija eritroplakije je 0,02 – 0,8 %, s mogućnošću maligne transformacije u više od 50 % slučajeva (38).

Kod leukoplakije patohistološki se radi o parakeratozi s ili bez određenog stupnja displazije. Leukoplakije se danas definiraju kao bijeli plakovi koji se ne mogu sastrugati, a do dijagnoze se dolazi isključivanjem. Konkretno, ove lezije nisu povezane s bilo kakvim kemijskim, fizičkim ili infektivnim uzrocima osim duhana, alkohola ili *betel quida* (40). Leukoplakija je češća kod muškaraca i obično se pojavljuje u petom ili šestom desetljeću života. Klinički,

leukoplakije se mogu klasificirati prema površinskim i morfološkim karakteristikama (41). Homogene leukoplakije imaju glatku, bijelu, ravnu površinu s jasno definiranim granicama. Nehomogene leukoplakije klasificirane su u tri kliničke kategorije: pjegava, nodularna i verukozna leukoplakija (40,41).

Eritroplakija se definira kao potencijalno maligni poremećaj usne šupljine koji se očituje kao crvena mrlja na oralnoj sluznici, a ne može se dijagnosticirati kao bilo koja druga definirana lezija. Lezija ne može imati traumatske, vaskularne ili upalne uzroke (42).

Eritroplakija se javlja u bolesnika srednje i starije životne dobi, najčešće u šestom i sedmom desetljeću života. Javlja se s jednakom učestalošću u oba spola sa srednjom prevalencijom od 0,11 % u općoj populaciji (42). Iako je eritroplakija rijetka, ona ima mnogo veću stopu maligne transformacije nego druga premaligna stanja, kao što su leukoplakija i submukozna fibroza. Prijavljene stope transformacije kreću se od 14 % do 50 %, 4 puta više od stopa maligne transformacije leukoplakičnih lezija (20). Sustavni pregledi pokazali su raspon od 1,3 % do 34 % maligne transformacije u eritroplakične lezije u globalnoj populaciji (20,42,43).

Patohistološki se leukoplakija i eritroplakija mogu prezentirati kao blaga, umjerena i izražena displazija epitela sluznice, a ovisno o tome različit je i potencijal maligne alteracije; od 6 %, 18 % i 40 %. Pretpostavlja se da većina invazivnih OSCC započinje svoj rast kao eritroplakija (42).

Za oralni lihen planus je poznato da je šansa za njegovu malignu alteraciju oko 0,5 – 1 % (44).

Preventivni pregledi visokorizičnih pacijenata, rano otkrivanje, redovno praćenje i efikasno liječenje prekanceroznih lezija usne šupljine, ključni su koraci u sprečavanju oralnog karcinoma. Više od 50 % karcinoma usne šupljine dijagnosticira se u uznapredovalom stadiju bolesti, kada su već prisutne regionalne metastaze na vratu, što dovodi do smanjenja stope preživljenja u svakom stadiju bolesti za 50%.

### 1.1.5. Dijagnostika i TNM klasifikacija

Za postavljanje dijagnoze OSCC potrebni su anamneza i detaljan klinički pregled glave i vrata. Probatorna biopsija se koristi za potvrdu sumnje na planocelularni karcinom. Kod uzimanja biopsije uvijek se sugerira uzorkovati rubni dio promjene u kome je potencijal rasta promjene najveći s ili bez dijela zdrave sluznice. Višeslojna kompjutorizirana tomografija (MSCT) usne šupljine, vrata i toraksa zlatni je standard za preoperativnu procjenu karcinoma usne šupljine – radi utvrđivanja proširenosti bolesti, prisutnosti regionalnih ili udaljenih metastaza ili drugih sinkronih tumora, često u plućima (45). Za određena anatomska sijela preferira se korištenje slikovnih pretraga magnetskom rezonancijom (MRI). Postoji nekoliko sustava za procjenu stupnja proširenosti bolesti, ali je danas svakako najprošireniji anatomski stupanj proširenosti bolesti TNM klasifikacija. Ona se temelji na utvrđivanju veličine i proširenosti primarnog tumora (T), zahvaćenosti regionalnih limfnih čvorova (N) te proširenosti bolesti u drugi organski sustav, odnosno na utvrđivanju postojanja ili nepostojanja udaljene metastaze (M). Svakom slovu pridružen je i broj na temelju kojega se konačno dobiva ukupni stadij proširenosti bolesti (Tablica 1.1.) (46).

**Tablica 1.1.** Anatomske stupnjeve proširenosti tumorske bolesti - TNM klasifikacija karcinoma usne šupljine

<b>PRIMARNI TUMOR (T)</b>	
<b>TX</b>	Tumor se ne može procijeniti
<b>TIS</b>	Tumor - carcinoma in situ
<b>T1</b>	Tumor $\leq 2$ cm ili DOI $\leq 5$ mm
<b>T2</b>	Tumor 2-4 cm ili DOI 5 – 10mm
<b>T3</b>	Tumor $\geq 4$ cm ili DOI $\geq 10$ mm
<b>T4</b>	T4a – umjereno uznapredovala lokalna bolest (tumor invadira okolne strukture poput kortikalisa donje ili gornje čeljusti, invadira maksilarni sinus, kožu lica) ili DOI $\geq 20$ mm T4b – vrlo uznapredovala lokalna bolest (tumor zahvaća žvačne prostore, pterigoidnu ploču, bazu lubanje ili infiltracija a. carotis interne)
<b>Klinički regionalni limfni čvorovi (cN)</b>	
<b>CNX</b>	Limfni čvorovi se ne mogu procijeniti
<b>CN0</b>	Nema pozitivnih limfnih čvorova
<b>CN1</b>	Metastaza u jedan ipsilateralni limfni čvor $\leq 3$ cm bez ektranodalne ekstenzije (ENE)
<b>CN2</b>	N2a – metastaza u jedan l.č. od 3-6 cm i bez ektranodalne ekstenzije (ENE) N2b – multiple metastaze u više l.č. $\leq 6$ cm bez ENE N2c – metastaze u bilateralnim i kontralateralnim l.č. $\leq 6$ cm bez ENE
<b>CN3</b>	N3a – metastaze u l.č. $\geq 6$ cm bez ENE N3b – metastaze u l.č. s ektranodalnom ekstenzijom (ENE)
<b>Patološki regionalni limfni čvorovi (pN)</b>	
<b>PNX</b>	Limfni čvorovi se ne mogu procijeniti
<b>PN0</b>	Nema pozitivnih limfnih čvorova
<b>PN1</b>	Metastaza u jednom ipsilateralnom čvoru $\leq 3$ cm, bez ektranodalne ekstenzije (ENE)
<b>PN2</b>	pN2a – metastaza u jednom ipsilateralnom čvoru 3-6 cm; metastaza do 3 cm s pristunom ENE pN2b – metastaza u 2 ili više ipsilateralna čvora do 6 cm pN2c – metastaza u kontralateralni l.č. do 6 cm
<b>PN3</b>	pN3a – metastaza veća od 6 cm ali bez ENE pN3b – metastaza s ENE veća od 3 cm i prisutnom ENE ili multiple ipsilateralne ili bilateralne metastaze s ENE ili jedna kontralateralna s ENE
<b>Udaljene metastaze (M)</b>	
<b>MX</b>	Udaljena metastaza se ne može procijeniti
<b>M0</b>	Nema udaljene metastaze
<b>M1</b>	Prisutna metastaza u udaljenom organu



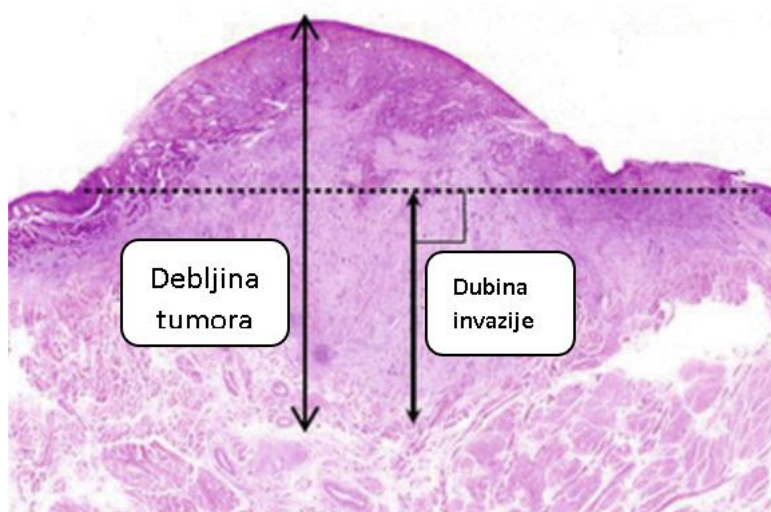
#### 1.1.6. Patohistološke karakteristike tumora

Za razliku od vrednovanja anatomskog stupnja proširenosti bolesti kroz TNM klasifikaciju, koja predstavlja naj snažniji prognostički alat, na sam ishod bolesti utječu i čimbenici kao što su komorbiditeti, izbor liječenja kao i osobine tumora (47). Tako se anatomskom stupnju proširenosti bolesti danas kao standard dodaju i patološki parametri, koji su snažan prediktor liječenja i ishoda liječenja tumora; poput stupnja diferenciranosti tumora, dubine invazije i debljine tumora, perineuralne invazije, limfovaskularne invazije i ektranodalne ekstenzije regionalne metastaze.

**Stupanj diferenciranosti tumora** prema klasifikaciji WHO stupanj diferencijacije epitela možemo podijeliti na dobro (gradus I), umjereno (gradus II) i slabo (gradus III) diferencirane te nediferencirane ili dediferencirane tumore (gradus IV) (48). Oni se procjenjuju na temelju stupnja keratinizacije, jezgrinog i staničnog pleomorfizma i mitotske aktivnosti koje je prvi opisao Broders (49). Zadnjih godina dosta je kontroverzije oko učinkovitosti ovog sustava s obzirom da su nerijetke slabe korelacije s odgovorom na liječenje i kliničke ishode (48). Mnoge studije pokazuju malu ili nikakvu prognostičku vrijednost sustava ocjenjivanja ovakvim načinom, ali je ona i dalje standard svakog patohistološkog nalaza (48,50). Stoga su se zadnjeg desetljeća razvili novi potencijalno objektivniji koncepti povoljnih odnosno kohezivnih i nekohezivnih obrazaca invazije u doduše nešto manjim ispitivanim skupinama Kraljevskog koledža patologa iz Ujedinjenog Kraljevstva, (Royal College of Pathologists), kojima je nedavno dodan i koncept tumorskog pupanja (engl. *tumor budding*, *TB*), veličina stanične mreže, opsega keratinizacije, sadržaja strome, veličine i broja jezgara (51). Ipak, zadnjih godina ipak sve je više dokaza da bi pojmovi „tumorsko pupanje“ (*TB*) i „dubina invazije“ (*DOI*) mogli biti ključni prediktori pojave regionalnih metastaza, a time i lošijeg doživljenja (51,52).

**Dubina invazije i debljina tumora.** Dubina invazije (engl. *depth of invasion*, *DOI*) najvažniji je prognostički čimbenik razvoja tumora regionalnih limfnih čvorova vrata (53). Od 2017. godine službeno je uvrštena u TNM klasifikacijski sustav. Prema osmom izdanju Američkog zajedničkog odbora za klasifikaciju raka (AJCC), dubina invazije (*DOI*) mjeri se od bazalne membrane najbliže susjedne normalne sluznice (Slika 1.3.) (46), do najdublje točke invazije tumora. Stoga je važno napomenuti da dubina invazije nije isto što i debljina tumora te da se ove dvije mjere ne smiju zamijeniti. Debljina tumora može biti veća od dubine invazije kod

egzofitičnih tumora, a manja od dubine invazije kod endofitičnih ili ulceriranih tumora. Istraživanja su pokazala da je debljina tumora manje prediktivna za rizik od širenja limfnih čvorova od dubine invazije (53,54). Također, pokazalo se da DOI igra značajnu ulogu u nastanku lokoregionalnog recidiva, širenju, preživljavanju i metastazama u regionalnim limfnim čvorovima (55,56) te je predloženo da bude neovisni čimbenik rizika za neuspjeh liječenja i recidiv.



**Slika 1.3.** Shematski prikaz dubine invazije (DOI) i debljine tumora

**Perineuralna i limfovaskularna invazija.** Iako je perineuralnu invaziju (PNI) Cruveilhiera opisao još u 19. stoljeću, ona se i danas koristi kao dodatna opisna karakteristika intraoralnog karcinoma. PNI, kao i prisutnost limfovaskularne invazije, sugerira lošiju prognozu, a time i potrebu za primjenom adjuvantne terapije (57). PNI se općenito smatra pokazateljem agresivnijih tumora s lošijim ishodom bolesti. Ranija mišljenja su pokazivala da tumorske stanice izravno infiltriraju perineuralni prostor, no nove studije pokazuju da je proces PNI kompleksniji, uključujući signalne interakcije tumorskih i Schwannovih stanica (58). Prisutnost PNI je neovisni prognostički čimbenik povezan s povećanim rizikom od regionalnih metastaza i lokoregionalnog recidiva OSCC-a. Uz to, prisutnost limfovaskularne invazije u neposrednoj blizini tumora kod većih karcinoma usne šupljine i orofarinksa povezana je s većom učestalošću

lokalnih recidiva, regionalnih i udaljenih metastaza, neovisno o kliničkim i patohistološkim parametrima (57).

**Ekstranodalna ekstenzija regionalne metastaze (ENE).** Prisutnost regionalne metastaze smanjuje petogodišnje preživljenje za 50 %, prisutnost proboja kapsule limfnog čvora također smanjuje preživljenje za dodatnih 50 %, a povećana je i stopa regionalnog recidiva, i pojava udaljenih metastaza (59,60). Zbog ovoga se ENE svrstava u negativne prognostičke čimbenike te je od 2017. g. uvršten u osmo izdanje TNM klasifikacije. Prisutnost ENE podiže stupanj proširenosti bolesti te je preporučeno agresivnije liječenje HNSCC, koje uključuje adjuvantnu kemoradioterapiju (61).

### 1.1.7. Liječenje

Liječenje karcinoma usne šupljine kao vrlo agresivnog malignoma podrazumijeva multimodalni pristup, odnosno korištenje više različitih vrsta liječenja, uključujući radikalnu kiruršku resekciju, liječenje radioterapijom (zračenjem) i upotrebu kemoterapeutika i imunoterapeutika. Izbor liječenja karcinoma usne šupljine ovisi o tumorskom TNM statusu, dobi bolesnika, komorbiditetu, općem zdravstvenom stanju, suradljivosti bolesnika i preferencijama u terapiji. Za rane stadije u obzir dolazi jedna od ovih opcija, iako se prednost kod inicijalnog liječenja tumora usne šupljine daje radikalnoj kirurškoj resekciji. Za uznapredovale stadije, kao što su stadiji III i IV, primjenjuje se multimodalni oblik liječenja; nakon radikalne resekcije se primjenjuje adjuvantna radioterapija ili kemoradioterapija. Imunoterapija je za sada rezervirana za liječenje ponovnog povrata bolesti kod pacijenata koji su već liječeni standardnom kemoterapijom.

**Primarno kirurško liječenje.** Kod pacijenata s intraoralnim karcinomom koji se inicijalno liječe kirurški potrebno je, prije svega, reći da njihovo prvo liječenje treba biti u pravilu i jedino jer svi naknadni pokušaji liječenja imaju lošu prognozu. Nadalje, kirurško liječenje metoda je izbora u ranijem stadiju bolesti (stadiji I i II) te uključuje resekciju tumora, a kod uznapredovale bolesti (stadiji III i IV), uz resekciju tumora, potrebno je učiniti i elektivnu ili kurativnu disekciju vrata uz adjuvantnu radioterapiju ili kemoradioterapiju u ovisnosti o patohistološkim

obilježjima tumora (perineuralna invazija, limfovaskularna invazija, pozitivan rub, prisutna ekstrapodalna ekstenzija ili prisutnost dvije ili više regionalnih metastaza i dr.). Zbog visokih troškova, dugotrajnog liječenja i ozbiljnih nuspojava (poput kserostomije, disfagije, osteoradionekroze), primarna radioterapija za rane stadije karcinoma usne šupljine obično se izbjegava. U slučaju operabilnih oralnih karcinoma stadija III. i IV., primarna radioterapija primjenjuje se samo kod bolesnika koji zbog komorbiditeta nisu kandidati za kirurški zahvat.

Intraoralna ili transoralna resekcija za početne tumore cT1 i cT2 uključuje radikalnu resekciju primarnog tumora s dodatnim zdravim rubom. Pitanje elektivne disekcije kod početnih tumora je pitanje debate zadnjih tridesetak godina. Kod klinički uznapredovalih primarnih tumora standard operacije je *en block* resekcija primarnog tumora s ili bez dijela donje čeljusti i limfadenektomija ipsilateralne strane vrata tzv. *commando* operacija.

**Primarna radioterapija** kod tumora usne šupljine predstavlja jednakovrijedni oblik liječenja kao i kirurško liječenje, ali je zbog brojnih komplikacija napuštena kao prvi izbor liječenja i rezervirana je za (i.) neresektabilne tumore, (ii.) pacijente nedovoljno kondicionirane za kiruršku terapiju i (iii.) pacijente koji odbijaju kirurško liječenje (62). 3D konformalna radioterapija (3DCRT) predstavlja osnovni standard u terapiji tumora glave i vrata, koristeći trodimenzionalne snimke za precizno oblikovanje polja zračenja prema ciljnom volumenu (63). Ovaj pristup omogućuje oblikovanje snopa fotona putem višelistnog kolimatora kako bi se uskladio s oblikom ciljnog volumena, što doprinosi efikasnosti i preciznosti tretmana. U usporedbi s 3DCRT, IMRT (engl. *intensity-modulated radiation therapy* - intenzitetno modulirana radioterapija) predstavlja napredniju formu koja se naziva i inverzna radioterapija (64). Ovdje se prioritetno koriste sofisticirani kompjuterski algoritmi i uređaji za planiranje zračenja kako bi se precizno oblikovala i kontrolirala doza zračenja koja se isporučuje tumoru. Zračenje se dijeli na više malih zraka različitih intenziteta koji se prilagođavaju obliku i veličini tumora. Intenzitet svakog zračenja se može pojedinačno kontrolirati, omogućavajući višestruke zrake različitih snaga koje se međusobno preklapaju. Ovaj postupak omogućava veću dozu zračenja unutar tumora pri čemu se smanjuje izlaganje zdravom tkivu, a time se smanjuju i stupanj nuspojava.

Adjuvantna radioterapija u ovisnosti je o patohistološkim obilježjima tumora pa je tako prisutnost perineuralne invazije, limfovaskularne invazije, umjereni i visoki Brodersov gradus

tumora te prisutnost dvije ili više regionalnih metastaza i dr., apsolutna indikacija za provedbu adjuvantne radioterapije, a prisustvo pozitivnog ili bliskog ruba i prisutna ekстранodalna ekstenzija u regionalnom limfnom čvoru implicira primjeru kemoterapije tijekom provedbe zračenja.

**Kemoradioterapija.** Kemoradioterapija se često koristi kao primarni ili adjuvantni tretman u cilju očuvanja organa ili kod bolesnika s visokim rizikom od recidiva, kao što su slučajevi s pozitivnim rubom resekcije ili ekstrakapsularnim širenjem (65). Iako kombinacija kemoterapije i zračenja često poboljšava kontrolu nad lokalnim i regionalnim oblicima bolesti te ukupno preživljenje, nuspojave poput mukozitisa i kserostomije češće se javljaju nego kod pojedinačnih terapija. Nakon objavljivanja istraživanja EORTC 2004. godine, koje je usporedilo rezultate adjuvantne radioterapije (54-66 Gy) s adjuvantnom kemoradioterapijom (radioterapija uz 3 ciklusa cisplatine u dozi od 100 mg/m<sup>2</sup>) na 334 bolesnika, postalo je standardna praksa koristiti adjuvantnu kemoradioterapiju u visokorizičnih bolesnika (66). Pokazalo se da je period do progresije bolesti bio značajno duži kod bolesnika koji su primali adjuvantnu kemoradioterapiju u usporedbi s onima koji su primali samo adjuvantnu radioterapiju, a ukupna stopa preživljavanja bila je viša u skupini s kombiniranom terapijom. Također je zabilježena niža kumulativna stopa lokalnih ili regionalnih recidiva (66).

**Ciljana terapija.** Od 2008. g. cetuksimab, odnosno IgG1 monoklonsko protutijelo za receptor epidermalnog čimbenika rasta, uvršten je u prvu liniju liječenja metastatskog ili recidivirajućeg karcinoma pločastih stanica glave i vrata i obično se koristi u kombinaciji s kemoterapeuticima; preparatima platine (cisplatine, karboplatine) i 5-FU (5- fluorouracil). Cetuksimab pojačava radiosenzitivnost i inhibira rast staničnih linija karcinoma. Prema izvornoj EXTREME studiji koju su objavili Vermorken i suradnici 2008. godine, ukupna stopa odgovora (engl. ORR – *overall response rate*) na ovaj način liječenja bila je 36 %, a medijan preživljenja bez progresije bolesti (engl. PFS – *progression free survival*) bio je 5,6 mjeseci (67).

**Imunoterapija.** Karcinom glave i vrata općenito se smatra tumorom s niskim imunogenim potencijalom. Nedovoljna aktivnost imunološkog sustava igra važnu ulogu u razvoju tumora povezanih s virusima (humani papiloma virus - HPV, virus Epstein-Barr – EBV), kao i s pušenjem i alkoholom. Iako postoji temelj za korištenje imunoterapije u liječenju ovih bolesnika, klinički podatci sugeriraju da većina pacijenata trenutno ne pokazuje zadovoljavajući

odgovor na monoterapiju imunoterapijom. U terapiji karcinoma glave i vrata, istražuju se antitijela na inhibitor proteina 1 programirane stanične smrti (PD-1) (poput nivolumaba i pembrolizumaba), anti-PDL1 antitijela (poput durvalumaba, atezolizumaba i avelumaba) te anti-CTLA4 antitijela (poput ipilimumaba i tremelimumaba). Dva inhibitora proteina 1 (PD-1) programirane stanične smrti, nivolumab i pembrolizumab, dobili su odobrenje za uporabu kod bolesnika s rekurentnim ili metastatskim HNSCC-om. Pembrolizumab je, samostalno ili u kombinaciji s platinom i fluorouracilom, od siječnja 2024. u Republici Hrvatskoj postao standardna terapija u prvoj liniji u odraslih bolesnika čiji tumori ekspimiraju PD-L1 s CPS-om  $\geq 1$  (68–70) (engl. CPS – *combined positive score* = kombinirana pozitivna vrijednost broja PD-L1 pozitivnih stanica (tumorskih stanica, limfocita i makrofaga) u ukupnom broju tumorskih stanica x 100)).

Međutim, u bolesnika s bolešću otpornom na preparate platine, stope odgovora na inhibiciju PD-1 relativno su niske, između 13 i 18 %, a neka istraživanja čak pokazuju veću ranu smrtnost za inhibitore kontrolnih točaka u usporedbi s aktivnim kontrolnim skupinama. Prema studiji KEYNOTE-048, stopa bez progresije bolesti (PFS) u ukupnoj populaciji bolesnika koji su primili samo pembrolizumab ili u kombinaciji s kemoterapijom je nakon 12 mjeseci iznosila je samo 17 % (71). To ukazuje na to da samo mali broj pacijenata ima koristi od imunoterapije.

## 1.2. Planocelularni karcinom orofarinksa

### 1.2.1. Anatomija ždrijela i orofarinksa

Ždrijelo je mišićnomembranozna cijev koja se pruža od baze lubanje pa sve do ušća u jednjak. U odraslih osoba, prosječno je dugačko oko 12 cm i može se podijeliti na tri glavna dijela: nazofarinks, orofarinks i hipofarinks.

Nazofarinks, također poznat i kao epifarinks, proteže se od baze lubanje do imaginarnog vodoravnog položaja koji prolazi kroz meko nepce tijekom gutanja kada se ono podiže i osloni na stražnji zid ždrijela. Na krovu nazofarinksa nalazi se dno sfenoidnog sinusa, prednji dio komunicira s nosom kroz nosne prolaze, a na bočnim stijenkama nalaze se torusi tubariusi s otvorima Eustachijevih cijevi i tubarnim tonzilama. Zadnji dio nazofarinksa sadrži ždrijelne tonzile i adenoidne vegetacije (72).

Orofarinks, poznat i kao mezofarinks, smješten je ispod nazofarinksa i proteže se od horizontalne plohe koja prolazi kroz meko nepce do imaginarnog položaja koji prolazi kroz gornji rub epiglotisa. Sprijeda, orofarinks komunicira s usnom šupljinom, a granicu predstavljaju *papile circumvalate*, a lateralno prednji nepčani lukovi. Na bočnim stranama nalaze se nepčani lukovi (*arcus palatoglossus*, *arcus palatopharyngeus*) s palatinskim tonzilama koji se formiraju od mišića ždrijela (73). Prednji nepčani lukovi u gornjem dijelu prelaze u meko nepce, a u sredini mekog nepca visi resica, uvula. Mišići mekog nepca mogu zategnuti resicu kako bi gotovo potpuno zatvorili ždrijelo prema stražnjem dijelu nosne šupljine, što je ključno za proces gutanja. Stražnji zid orofarinksa sastoji se od trupova drugog i trećeg vratnog kralješka (73).

Hipofarinks, koji se nalazi ispod orofarinksa, ima gornju granicu označenu kao položaj koji prolazi kroz epiglotis, dok se donja granica nalazi ispod hrskavice krikoida, gdje započinje jednjak. Sprijeda, hipofarinks se susreće s grkljanom, odvojenim ariepiglotskim naborima. Lateralno od tih nabora, na oba boka, nalaze se piriformni sinusi, uski džepovi koji se otvaraju tijekom gutanja.

Važno je napomenuti da se tonzile razvijaju urastanjem epitela u vezivno tkivo na mjestima gdje postoje škržni lukovi. Ovaj proces uključuje proliferaciju vezivnih stanica i krvnih žila te stvaranje kripte oko kojih se skupljaju limfociti i formiraju limfni čvorovi. Tonzile, uključujući nepčane, ždrijelne, jezične i tubarne tonzile, čine Waldeyerov prsten, a mandule odnosno krajnici (palatinalne tonzile) su najveće i najvažnije. Zdrave mandule obično ne izlaze iz nepčanih lukova, a površina njihove sluznice ima naboranu strukturu. U tim naborima nastaju tonzilarne fosule, kojih može biti između 10 do 20 na svakoj manduli. U dnu fosula nalaze se kripte, gdje je epitel najtanji i gdje postoji čvrsta veza između epitela i limfatičnog tkiva tonzila. Ždrijelne tonzile smještene su na gornjoj i stražnjoj stijenki nosnog ždrijela, jezična tonzila je na korijenu jezika, dok se tubarne tonzile nalaze na bočnim stijenkama nosnog ždrijela oko torusa tubariususa (72,73).

Upravo detaljnijim anatomskim razjašnjenjem same građe orofarinksa, prikazuje se složenost pristupa u liječenju malignih bolesti ovog sijela uz maksimalnu prezervaciju funkcije. Nadalje, onkološka resekcija nikada ne bi smjela biti ograničavajući faktor kasnije rekonstrukcije.

### 1.2.2. Etiologija i epidemiologija

Danas je više od 80 % orofaringealnih karcinoma u Sjedinjenim Državama uzrokovano HPV-om, dok je samo približno 3 % karcinoma usne šupljine uzrokovano HPV-om. Duhan i alkohol ostaju glavni etiološki čimbenici karcinoma usne šupljine, dok HPV u Zapadnom svijetu postaje glavni etiološki faktor nastanka karcinoma orofarinksa, stavljajući pušenje i konzumaciju alkohola u drugi plan (30). Važno je ne zanemariti učinke alternativnih duhanskih proizvoda koji se svakodnevno pojavljuju, kao što su bezdimni duhan/snus, nargile, vodene lule, e-cigarete, aromatizirane cigare i cigarilosi te proizvodi koji se otapaju u ustima. Kancerogeni učinci ovih proizvoda i dalje su pod aktivnim intenzivnim istraživanjima (30). Patofiziološki mehanizmi klasičnih etioloških faktora konzumacije alkoholnih pića i duhanskih proizvoda objašnjeni su ranije u poglavlju etiologija i epidemiologija karcinoma usne šupljine.

U razvijenim zemljama zapadnog Svijeta HPV-pozitivni karcinomi pločastog epitela glave i vrata čine 72 % svih tumora glave i vrata, dok je udio u zemljama u razvoju tek 13% (74). Postoji preko 20 podvrsta HPV-a koji se smatraju visokorizičnima, a najčešći su podtipovi 16, 18, 31, 33. HPV16 je odgovoran za 85 – 90 % slučajeva orofaringealnog HNSCC-a povezanih s HPV-om u Sjevernoj Americi, dok je 50 – 75 % slučajeva raka vrata maternice pozitivno na HPV16 i 18 (75). Prevalencija karcinoma orofarinksa povezanog s HPV-om povećala se u zemljama u razvoju posljednjih godina (>220 % u SAD-u od 1984. do 2004.), osobito među mlađim odraslim osobama. Prema američkim demografskim podacima, bijelci mlađi od 45 godina bilježe najveći porast incidencije; godišnja stopa porasta od 2008. do 2012 iznosi 5,1 %. S druge strane, incidencija HNSCC-a koji nije povezan s HPV-om je oko 50 % veća među crnim Amerikancima (74). HPV-pozitivne HNSCC karakteriziraju veća infiltracija B-stanica u mikrokruženje tumora, manje genetskih mutacija i netaknut apoptotski odgovor te upravo ovi faktori mogu objasniti puno bolju prognozu i bolji odgovor na radioterapiju i imunoterapiju, a samim time i bolji medijan preživljenja (130 naprema 20 mjeseci kod HPV-negativnih karcinoma) (75,76). Sve to dovelo je do toga da se HPV pozitivni orofaringealni karcinom izdvoji od planocelularnog karcinoma orofarinksa „klasičnih“ etioloških faktora te od 2017. godine ima svoju zasebnu TNM klasifikaciju.



### 1.2.3. Dijagnostika, TNM klasifikacija i patohistološke karakteristike

Za postavljanje dijagnoze potrebni su anamneza i detaljan klinički pregled glave i vrata. Budući da se radi o anatomski stražnjim lokalizacijama, kao dio fizikalnog pregleda, u sklopu fizikalnog pregleda služimo se direktnom faringoskopijom ili češće fiberendoskopskim pregledom ždrijela. Probatorna biopsija se koristi za potvrdu sumnje na planocelularni karcinom. Za neka sijela stražnje, lateralne i donje podlokalizacije, a uz nesuradljivost pacijenta, potrebno je učiniti pregled ždrijela u uvjetima opće anestezije, prilikom čega se uzme i dio tumora za histopatološku analizu.

Višeslojna kompjutorizirana tomografija (engl. *multislice computed tomography*, MSCT) usne šupljine, vrata i toraksa standard je preoperativne procjene, odnosno obrade bolesnika s karcinomom orofarinksa. Ona služi utvrđivanju proširenost bolesti odnosno primarnog tumora prema okolnim strukturama poput mišića, krvnih žila i živaca, prisutnosti regionalnih ili udaljenih metastaza ili drugih sinkronih tumora, često u plućima (45,77). Kod klinički nejasne regionalne bolesti također se sugerira učiniti ultrazvučni pregled limfnih čvorova vrata, s ili bez citološke punkcije suspektnog čvora s graničnom veličinom preko 5 mm. U Zapadnim zemljama kao standard pretrage kod tumora orofarinksa koristi se i MRI i PET/CT (77), međutim u Republici Hrvatskoj za sada to nije standard. Nakon patohistološke potvrde i određivanja stupnja proširenosti, indicirano je svakom pacijentu odrediti klinički TNM stadij bolesti.

Sukladno preporukama AJCC je od 2017. godine HPV-pozitivni planocelularni karcinom izdvojen od ostalih karcinoma orofarinksa kao entitet sa zasebnim TNM-om (Tablica 1.2.) (78).

TNM klasifikacija HPV negativnog pločastog karcinoma orofarinksa prikazana je u Tablici 1.3.

**Tablica 1.2.** TNM klasifikacija HPV (+) orofaringealnog karcinoma

<b>HPV (+) PRIMARNI TUMOR</b>	
<b>T0</b>	Nema dokaza primarnog tumora
<b>T1</b>	Tumor $\leq 2$ cm
<b>T2</b>	Tumor 2-4 cm
<b>T3</b>	Tumor $\geq 4$ cm ili ekstenzija tumora na lingvalnu površinu epiglotisa
<b>T4</b>	Tumor zahvaća neku od struktura: larinks, ekstrinzične/duboke mišiće jezika (genioglossus, hyoglossus, palatoglossus, styloglossus), medijalni pterigoidni mišić, tvrdo nepce ili mandibulu
<b>CN – KLINIČKI REGIONALNI LIMFNI ČVOROVI</b>	
<b>CNX</b>	Limfni čvorovi se ne mogu procijeniti
<b>CN0</b>	Nema metastaza u regionalnim limfnim čvorovima
<b>CN1</b>	Ipsilateralne metastaze promjera $< 6$ cm
<b>CN2</b>	Metastaze u bilateralnim i kontralateralnim l.č. promjera do 6 cm
<b>CN3</b>	Metastaze u limfnim čvorovima $> 6$ cm
<b>PN – PATOLOŠKI REGIONALNI L.Č.</b>	
<b>PNX</b>	Limfni čvorovi ne mogu se procijeniti
<b>PN0</b>	Nema metastaza u regionalnim l.č.
<b>PN1</b>	Metastaze u $< 4$ l.č.
<b>PN2</b>	Metastaze u $> 5$ l.č.

Tablica 1.3. TNM klasifikacija HPV (–) orofaringealnog karcinoma

HPV (-) PRIMARNI TUMOR	
<b>TX</b>	Tumor se ne može procijeniti
<b>T0</b>	Nema dokaza primarnog tumora
<b>TIS</b>	Carcinoma in situ
<b>T1</b>	Tumor ≤ 2 cm
<b>T2</b>	Tumor 2-4 cm
<b>T3</b>	Tumor ≥ 4 cm ili ekstenzija tumora na lingvalnu površinu epiglotisa
<b>T4</b>	T4a – tumor zahvaća neku od struktura: larinks*, duboke/vanjske mišiće jezika (genioglossus, hyoglossus, palatoglossus, styloglossus), medijalni pterigoidni mišić, tvrdo nepce ili mandibulu T4b – vrlo uznapredovala lokalna bolest (tumor zahvaća lateralni pterigoidni mišić, pterigoidnu ploču, lateralni nazofarinks, bazu lubanje ili infiltracija a. carotis interne) *- ekstenzija tumora prema lingvalnoj plohi epiglotisa ne smatra se invazijom larinksa
Klinički - regionalni limfni čvorovi (cN)	
<b>CNX</b>	Limfni čvorovi se ne mogu procijeniti
<b>CN0</b>	Nema pozitivnih limfnih čvorova
<b>CN1</b>	Metastaza u jedan ipsilateralni limfni čvor ≤ 3 cm bez ektranodalne ekstenzije (ENE)
<b>CN2</b>	N2a – metastaza u jedan l.č. od 3-6 cm i bez ektranodalne ekstenzije (ENE) N2b – multiple metastaze u više l.č. ≤ 6 cm bez ENE N2c – metastaze u bilateralnim i kontralateralnim l.č. ≤ 6 cm bez ENE
<b>CN3</b>	N3a – metastaze u l.č. ≥ 6 cm bez ENE N3b – metastaze u l.č. s ektranodalnom ekstenzijom
Patološki – regionalni limfni čvorovi (pN)	
<b>PNX</b>	Limfni čvorovi se ne mogu procijeniti
<b>PN0</b>	Nema pozitivnih limfnih čvorova
<b>PN1</b>	Metastaza u jednom ipsilateralnom čvoru ≤ 3 cm, bez ektranodalne ekstenzije (ENE)
<b>PN2</b>	pN2a – metastaza u jednom ipsilateralnom čvoru 3-6 cm; metastaza do 3 cm s pristunom ENE; pN2b – metastaza u 2 ili više ipsilateralna čvora do 6 cm; pN2c – metastaza u kontralateralni l.č. do 6 cm
<b>PN3</b>	pN3a – metastaza veća od 6 cm ali bez ENE pN3b – metastaza s ENE veća od 3 cm i prisutnom ENE ili multiple ipsilateralne ili bilateralne metastaze s ENE ili jedna kontralateralna s ENE
Udaljene metastaze (M)	
<b>MX</b>	Udaljena metastaza se ne može procijeniti
<b>M0</b>	Nema udaljene metastaze
<b>M1</b>	Prisutna metastaza u udaljenom organu

#### 1.2.4. Liječenje

Orofaringealni karcinom predstavlja ozbiljan izazov u liječenju te zahtijeva multidisciplinarni pristup. To znači da svaki pacijent kod kojega se dokaže maligni tumor u području usne šupljine i orofarinksa, ali i bilo koji drugi malignom u području glave i vrata, bude prezentiran na multidisciplinarnom timu za liječenje bolesti glave i vrata s jasnom patohistološkom potvrdom bolesti i kompletnom dijagnostičkom obradom, odnosno prikazivanjem stupnja proširenosti bolesti (staging) kroz TNM klasifikaciju. Odluka o optimalnom liječenju za svakog pacijenta je individualna. Modaliteti liječenja obuhvaćaju kirurške zahvate, radioterapiju, kemoterapiju i imunoterapiju, često primijenjene samostalno ili u kombinaciji. Kirurško uklanjanje tumora može biti primarni pristup, posebice u ranoj fazi bolesti, a radioterapija i kemoterapija često su neophodne za kontrolu lokalno uznapredovalih ili metastatskih tumora (79).

### 1.3. Prognostički čimbenici

Prognostički čimbenici mogu se svrstati u tri glavne kategorije, ovisno čiji su sastavni dio, pa tako postoje čimbenici ovisni o bolesniku, o samoj bolesti, odnosno tumoru i čimbenike ovisne o liječenju:

**Prognostički čimbenici ovisni o bolesniku.** Općenito govoreći, mnoštvo je faktora ovisnih o samom pacijentu, a koji mogu značajno utjecati na tijek i dinamiku liječenja; dob, spol, komorbiditeti, rasa, genska predispozicija, socio-ekonomski status, konzumacija duhanskih proizvoda i alkoholnih pića, prehrana općenito, indeks tjelesne mase, razina hemoglobina i serumskog albumina i mnogi drugi. Tako prema nekim studijama muškarci pokazuju uspješnije stope liječenja od oralnog karcinoma, iako većina studija ne pokazuje razlike prema spolu.

**Prognostički čimbenici ovisni o tumoru** usne šupljine i orofarinksa odnose se na patohistološke karakteristike primarnog tumora kao i regionalne limfne čvorove koji su već ranije detaljnije opisani, u koje spadaju TNM stadij, PNI, dubina invazije primarnog tumora, gradus tumora, limfovaskularna invazija, prisutnost proboja kapsule limfnog čvora (ENE). Najznačajniji negativni prognostički čimbenik je prisutnost pozitivnog regionalnog limfnog čvora.

**Prognostički čimbenici ovisni o liječenju** podrazumijevaju jedini faktor koji jest u domeni promjenjive varijable na koju možemo utjecati biranjem najoptimalnijeg oblika liječenja. Oni obuhvaćaju izbor načina liječenja, opseg i uspjeh kirurškog liječenja, komplikacije, trajanje i dozu radioterapije, izbor i primjena kemoterapije itd.

#### 1.4. Prognostički i prediktivni biomarkeri

Unatoč napretku terapijskih modaliteta prilagođenih agresivnosti i riziku ponovne pojave bolesti, stope petogodišnjeg preživljenja bolesnika nisu se značajno promijenile tijekom proteklih desetljeća. Stoga je potrebno razviti nove strategije koje bi prilagodile dosadašnji standardizirani pristup liječenju, uzimajući u obzir individualne razlike u kliničkim i patohistološkim karakteristikama pacijenata.

Prognostički biomarker biološka je molekula koja se mjeri i evaluira kako bi se procijenilo prisustvo i težina bolesti, kao i prognoza bolesti, bez obzira na terapijski pristup. Biomarker može pružiti informacije o prirodnom tijeku bolesti, predviđajući vjerojatnost ishoda kao što su preživljavanje, recidiv, odnosno ponovna pojava bolesti ili progresija bolesti.

Primjena prognostičkih biomarkera obuhvaća sljedeće:

- 1) individualizacija liječenja: razumijevanje prognoze može pomoći kliničarima da prilagode terapijske strategije na osnovu rizika pacijenta. Pacijenti s lošijom prognozom mogu zahtijevati agresivniji tretman.
- 2) planiranje praćenja: pacijenti s većim rizikom od razvoja recidiva ili progresije bolesti mogu imati koristi od češćeg praćenja kako bi se potencijalni recidiv što ranije detektirao.
- 3) klinička istraživanja: prognostički biomarkeri mogu biti korisni u dizajniranju kliničkih ispitivanja i u identifikaciji odgovarajućih populacija pacijenata za nove terapije (80).

U posljednjih nekoliko godina istraživanja su usmjerena na povezivanje određenih molekularnih biomarkera s neoplastičnom transformacijom i progresijom zloćudnih tumora glave i vrata. Općenito govoreći nastanak maligne bolesti je multifaktorijalan i sastoji se od već ranije spomutih vanjskih (ekstrinzičnih) čimbenika poput konzumacije duhana i alkoholnih pića, izloženosti štetnim tvarima iz okoliša ili npr. nekim virusima te s druge strane intrinzičnim

faktorima domaćina poput imunosupresije, pothranjenosti, aktivacije nekog protoonkogenog odnosno inaktivacija tumor supresorskog gena koja može pobuditi zloćudnu preobrazbu i potaknuti karcinogenezu. Zapravo, karcinogeneza tumora glave i vrata i malignih tumora općenito uključuje akumulaciju mutacija ili epigenetskih promjena u genima koje proizlaze iz štetnih učinaka okolišnih čimbenika kod osjetljive osobe (81,82). Tako na primjer aktivacija protoonkogenog (*RAS*, *MYC* i *EGFR*) ili inhibicija tumor supresorskih gena (npr. *TP53*, *RB1*, *CDKN2A*) okolišnim čimbenicima kao što su pušenje, zračenje i virusna infekcija može povećati rizik od oralnog i orofaringealnog karcinoma pločastih stanica (83). Procesi karcinogeneze u tumorima glave i vrata uključuju poremećaje regulacije različitih signalnih putova koji djeluju na popravak DNK, metabolizam karcinogenog, stanični ciklus, imunitet i upalu (84). Polimorfizmi gena uključenih u ove putove mogu također igrati važnu ulogu u razvoju tumora glave i vrata kroz promjene u aktivaciji i funkciji srodnih proteina. Razvoj sporadičnih karcinoma (nenasljednih) može se objasniti jedino na temelju poligenetskog mehanizma u kojem se veliki broj alela niske penetracije (svaki s malim rizikom od razvoja raka) kombinira zajedno kako bi uzrokovali i povećali osjetljivost na rak (81),(83–85).

Prediktivni biomarkeri danas imaju primjenu kod probira pacijenata kod kojih se očekuje lošiji ishod (86).

U posljednje vrijeme, identifikacija i istraživanje različitih biomarkera značajno su napredovali. Slijedi nekoliko važnih prognostičkih i prediktivnih biomarkera kod karcinoma usne šupljine i orofarinksa:

**P53** je protein koji je kodiran tumor supresorskim genom *TP53* a sudjeluje u regulaciji staničnog ciklusa, apoptoze i prevenciji karcinogeneze. Mutacije u genu *TP53* najčešće se nalaze u DNA vežućoj domeni (engl. *DNA-binding domain* -DBD) proteina p53 (87) i često se povezuju s različitim vrstama karcinoma, uključujući oralni karcinom. Promjene u p53 mogu ukazivati na agresivniji tumor i lošiju prognozu.

**EGFR** (engl. *epidermal growth factor receptor*) - receptor epidermalnog čimbenika rasta: pripada HER obitelji (engl. *human epidermal growth factor receptor*); povećana ekspresija EGFR-a često je povezana s agresivnijim tumorima i lošijom prognozom i nižom stopom preživljavanja kod pacijenata s oralnim karcinomom i općenito karcinomima glavi i vrata. Također, visoka ekspresija EGFR-a može ukazivati na veću vjerojatnost recidiva tumora ili

smanjeni odgovor na određene terapije, što omogućuje prilagodbu tretmana prema individualnim potrebama pacijenta.

**Protein ciklin D1** prekomjerno je izražen kod različitih vrsta tumora, a povećana ekspresija ovog proteina može ukazivati na povećani rizik od metastaza i lošiju prognozu i kod karcinoma gušterače, karcinoma dojke, mokraćnog mjehura, pluća nemalih stanica, prostate, dok je kod tumora glave i vrata zabilježena ekspresija čak i u do 80% slučajeva (88).

**VEGF** (engl. *vascular endothelial growth factor*), vaskularni endotelijalni faktor rasta. Visoke razine VEGF-a često se povezuju s povećanim angiogenim potencijalom tumora, što može dovesti do agresivnijeg rasta i širenja karcinoma.

**MikroRNK** (miRNA, miR) velika su skupina malih jednolančanih nekodirajućih endogenih RNK, duljine približno 18 – 25 nukleotida, koje igraju značajnu ulogu u posttranskripcijskoj regulaciji gena kroz interakciju s 3'UTR ciljane mRNK (89). Degradacija ili inhibicija njihove translacije također igra važnu ulogu u razvoju stanica u diferencijaciji, metabolizmu, proliferaciji, migraciji, indukciji angiogeneze i apoptozi. Postoje brojni dokazi koji povezuju promijenjeni profil miR-a s dobro definiranim stanjima koja utječu na početak, progresiju i pojavu metastaza kod tumora glave i vrata (85).

**Protein Ki-67** kodiran je genom *MKI67* i nalazi se na 10. kromosomu. Ovaj marker proliferacije i rasta tumorskih stanica rutinski se koristi u patohistološkoj analizi za procjenu brzine rasta velike većine tumora. Visoke razine izraženosti Ki-67 često su povezani s agresivnijim tumorima, višim stopama regionalnih metastaza, lošijom prognozom s lošijim i sveukupnim preživljenjem kao i lošijim preživljenjem bez pojave bolesti kod većine tumorskih sijela (90).

**PD-L1** (programirana smrt liganda 1): ekspresija PD-L1 može ukazivati na imunosupresivno mikrokruženje tumora i danas je standard imunoterapije za recidivirajući ili metastatski karcinom pločastih stanica glave i vrata. Kao prediktivni biomarker u predviđanju učinkovitosti monoterapije pembrolizumabom danas se koristi određivanje ekspresije liganda programirane smrti 1 (PD-L1) u tumorskim i imunološkim stanicama (91).

**HPV status:** Infekcija humanim papiloma virusom visokog rizika (HPV 16 i 18) može uticati na prognozu kod orofaringealnog karcinoma o čemu je već ranije bilo riječi, pri čemu HPV-

pozitivni tumori često imaju bolju prognozu u poređenju s HPV-negativnim tumorima. Kod karcinoma usne šupljine HPV nema prognostički značaj, iako neki radovi sugeriraju čak agresivniji tijek bolesti u jezičnim podlokalizacijama osobito u pacijenata bez rizičnih faktora (92).

Zaključno, molekularni biomarkeri predstavljaju snažan alat u dijagnostici, prognostičkom ocjenjivanju i terapijskom planiranju tumora glave i vrata. Ipak, danas se još uvijek u kliničkoj praksi ne koriste specifični biomarkeri kojima bi se mogao pokušati predvidjeti tijek razvoja bolesti, njegova agresivnost ili recimo utjecaj na smanjenje toksičnosti primijenjenog lijeka, kao ni u izbjegavanju nepotrebnog liječenja.

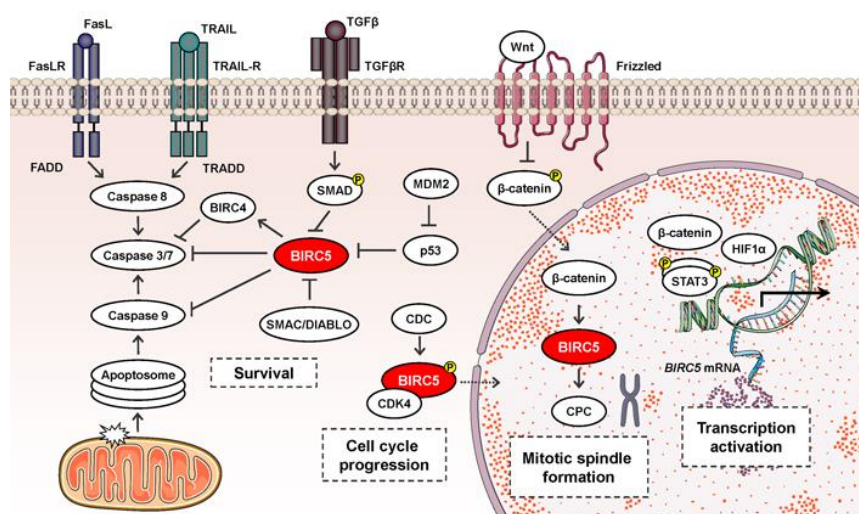
Klinička praksa zasad koristi samo neke od ovih alata. Njihova potencijalna primjena omogućavala bi preciznije predviđanje ishoda bolesti te personalizirani pristup liječenju s ciljem poboljšanja kvalitete života pacijenata. Buduća istraživanja i razvoj novih molekularnih biomarkera bit će ključni za daljnje napredovanje u borbi protiv ove agresivne i kompleksne bolesti.

### 1.5. Protein survivin

Survivin je najmanji protein u obitelji proteina inhibitora apoptoze IAP (engl. *inhibitor apoptosis protein*) (86,87). Protein survivin kodiran je genom *BIRC5* (engl. *baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5*). Osnovna uloga IAP je inhibicija aktivnosti kaspaza direktnim ili indirektnim putem čime se sprječava apoptoza (88). Ovi unutarstanični proteini također su uključeni i u druge procese kao što su stanični ciklus, migracija stanica, upalni odgovor i urođeni imunološki odgovor (90). Kod ljudi je nađeno desetak članova obitelji proteina inhibitora apoptoze: BIRC1 (NAIP), BIRC2 (cAIP1), BIRC3 (cIAP2), BIRC4 (XIAP), BIRC5 (survivin), BIRC6 (BRUCE ili apollon), BIRC7 (livin) i BIRC8 (ILP-2), a zajednička im je odlika postojanje najmanje jedne BIR domene koja sadrži gotovo 80 aminokiselinskih ostataka i nosi  $Zn^{2+}$  u središtu (91). Ta domena posreduje u interakcijama s drugim proteinima i odgovorna je za njihovu antiapoptotičnu funkciju i tipično se nalazi na N-terminalnom kraju proteina.



Survivin ima važnu ulogu u regulaciji procesa apoptoze, slika 1.4. (92,93). Njegova ekspresija je dinamički regulirana tijekom razvoja organizma i prisutna je tijekom procesa diferencijacije stanica kako kod ljudi tako i kod miševa. Osim toga, survivin se uobičajeno nalazi u embrionalnim tkivima, a homozigotna delecija tog gena rezultira ranom embrionalnom smrću, naglašavajući njegovu vitalnu ulogu u procesima staničnog razvoja, diferencijacije i održavanja homeostaze (94). Gen *BIRC5* se selektivno izražava u tumorskim stanicama, dok ga normalna tkiva obično ne izražavaju (95). Ekspresija survivina u tumorima često je povezana s njihovim razvojem, lošijim prognozama te otpornošću na kemoterapiju.

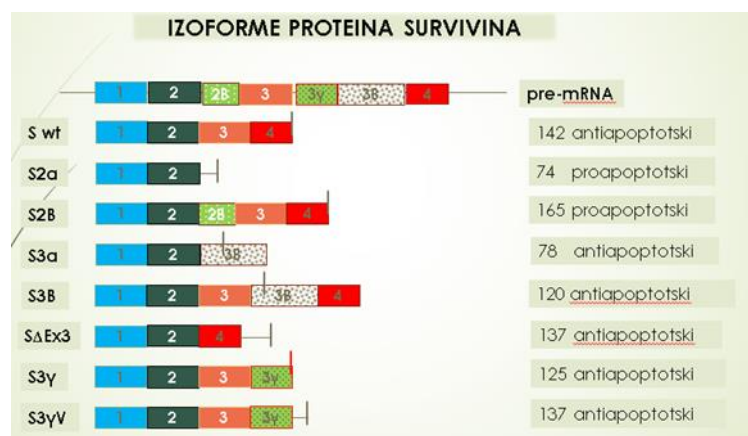


**Slika 1.4.** Shematski prikaz funkcije gena *BIRC5* (modificirano prema Deveraux i sur. 1997.)

### 1.5.1. Struktura, lokalizacija i alterantivno prekrajanje gena *BIRC5*

Gen *BIRC5* sastoji se od 14,7 kb na telomernom kraju kromosoma 17q25, a sastoji se od četiri eksona i tri introna (93). On kodira protein survivin, koji ima 142 aminokiseline i veličinu od 16,5 kDa (93,95,96). Sve dosad identificirane izoforme survivina sadrže samo jednu od karakterističnih N-terminalnih BIR (Baculovirus IAP Repeat) domena, dok se produljena karboksi-terminalna  $\alpha$ -uzvojnica zamjenjuje za IAP karakterističnu "RING-finger" domenu. BIR domena ima značajnu ulogu u antiapoptotskoj funkciji survivina, dok amfipatska  $\alpha$ -uzvojnica utječe na tubulinske strukture (97). Bitno je naglasiti da se survivin u tekućini kristalizira kao homodimer, gdje se dva monomera survivina međusobno povezuju preko središnje "linker" regije, uz pomoć aminokiselinskih ostataka leucina (Leu6) i triptofana

(Trp10) na N-terminalnom kraju proteina (98). Budući da različite izoforme survivina pokazuju različit učinak na apoptozu, formiranje heterodimera survivina sačinjenih od različitih izoformi može imati ključnu ulogu u regulaciji njihove funkcije, što bi moglo imati važne posljedice u kontekstu karcinogeneze.



**Slika 1.5.** Struktura gena *BIRC5* i njegovih izoformi - shematski prikaz alternativno prekrojenih varijanti - izoformi gena *BIRC5*

Alternativno prekrajanje mRNK je proces tijekom ekspresije gena u kojem se prekursor mRNK (pre-mRNK) molekula prekraja na različite načine tijekom procesa sazrijevanja u zrelu mRNK. Ovaj proces rezultira stvaranjem zrelih mRNK molekula s različitim eksonskim sastavom, a ta raznolikost u eksonskom sastavu omogućuje stvaranje različitih proteinskih izoformi iz istog gena. Osnovna ideja alternativnog prekrajanja je da se određene sekvence unutar pre-mRNK mogu ukloniti ili zadržati, stvarajući različite kombinacije eksona u zrelih mRNK molekulama. To rezultira stvaranjem proteina s različitim funkcijama, lokalizacijama ili regulacijskim svojstvima. Alternativno prekrajanje igra ključnu ulogu u stvaranju biološke raznolikosti i kompleksnosti organizama, jer omogućuje jednom genu da kodira više različitih proteina s različitim funkcijama (99).

Gen *BIRC5* ima četiri dominantna eksona (1, 2, 3, 4) i dva kriptička eksona (2B, 3B i 3γ) tri introna, a kodira desetak izoformi od kojih je osam s poznatom funkcijom (100).

Ambrosini je 1997. g otkrio survivin divljeg tipa (engl. *wild type*, *wt*) koji se sastoji od eksona 1, 2, 3 i 4 koji tvore prijepis od 426 pb i kodira protein koji se sastoji od 142 aminokiseline, a veličine je 16,5 kDa. Nalazi se u citoplazmi, stvara heterodimere s drugim izoformama i ima antiapoptotsku ulogu (95).

Survivin 2 $\alpha$  (S 2 $\alpha$ ) otkriven je 2005.g., a sastoji se od eksona 1 i 2 kao i 3' 197 bp regije introna 2, veličine je 225 pb i kodira protein od 74 aminokiseline molekularne mase 8,5 kDa. Survivin 2 $\alpha$  smanjuje antiapoptotsku aktivnost survivina, smješten je i u jezgri i citoplazmi.

Survivin 2B (S 2B) ima između eksona 2 i 3 umetnut dodatni ekson 2B, veličine je 165 aminokiselina i ima molekulska masu od 18,5 kDa. On ima skraćenu BIR domenu i smatra se da ima proapoptotsku funkciju. Nalazi se primarno u citoplazmi.

Survivin 3 $\alpha$  (S 3 $\alpha$ ) sadrži eksone 1 i 2 te zadržava dodatnih 209 pb introna 2 što znači da se sastoji od ukupno 386 pb. Kodira protein od 78 aminokiseline te se smatra da ima antiapoptotsku funkciju (101).

Survivin 3B (S 3B) ima četiri standardna eksona, kao i dodatni ekson 3B, koji se sastoji od fragmenta 165 parova baza introna 3. Taj ekson 3B smješten je između eksona 3 i 4. Odsutnost  $\alpha$ -uzvojnice na C-kraju survivina 3B, koja je prisutna u tipičnom, wt survivinu, sugerira da ovaj oblik vjerojatno nije povezan s G2-fazom i mitozom. Međutim, ima potpunu BIR domenu, što implicira njegovu antiapoptotsku ulogu, budući da se čini da skraćivanje BIR-domene umanjuje antiapoptotske učinke survivina. Survivin 3B igra ključnu ulogu u otpornosti tumorskih stanica na kemoterapijske lijekove, jer njegove antiapoptotske sposobnosti proizlaze iz njegove sposobnosti vezanja i inhibicije prokaspaze 6 (102).

Survivin  $\Delta$ ex3 (S  $\Delta$ ex3) otkrili su Mahotka i njegovi suradnici 2002. g., a karakterizira ga nedostatak eksona 3. Ova izoforma sastoji se od 329 baznih parova i kodira protein od 137 aminokiselina. Nedostatak eksona 3 rezultira translacijskim pomicanjem okvira čitanja, što stvara novu C-terminalnu sekvencu s potencijalnim mjestom za N-miristolaciju. Iako posjeduje promjenjenu BIR-domenu survivin  $\Delta$ ex3 ima signal za nuklearnu lokalizaciju (NLS), te s nalazi u jezgri. Izražaj survivin  $\Delta$ Ex3 je dokazana u najmanje 13 različitih vrsta karcinoma, ali, za razliku od tipičnog, wt survivina, pokazuje dvojake funkcije u regulaciji apoptoze (103,104).

Survivin 3 $\gamma$ M (S 3 $\gamma$ M) (125 aminokiselina) i survivin 3 $\gamma$ V (S 3 $\gamma$ V) (137 aminokiselina) razlikuju se po 4 baze što rezultira proteinima s vrlo različitim C-krajevima, a dodatni ekson 3 $\gamma$  umetnut je između eksona 3 i 4. Prekomjerna ekspresija i jedne i druge izoforme povećava otpornost na neke kemoterapeutike čime se sugerira da navedene izoforme kao i S wt imaju antiapoptotske uloge (103,105,106).

### 1.5.2. Polimorfizmi gena BIRC5

U proteklim godinama započela su istraživanja koja se bave proučavanjem povezanosti polimorfizama jednog nukleotida (SNP-ova, od engl. *single nucleotide polymorphism*) unutar gena *BIRC5* s njegovom ekspresijom i potencijalnom ulogom u formiranju različitih tumora. Do sada su rezultati istraživanja ukazali na to da određeni polimorfizmi unutar regulatornih regija gena *BIRC5*, poput promotora i 3' UTR regije, kao i uzvodno i nizvodno od kodirajuće regije gena te u eksonu 4, mogu utjecati na stabilnost i razinu ekspresije pripadajuće mRNK (107). Time se otvara mogućnost da ovi polimorfizmi imaju jednu od ključnih uloga u procesu razvoja tumora.

Jedan od najčešće proučavanih polimorfizama je c.-31G>C koji se nalazi u 5'UTR regiji. Prisutstvo ovog polimorfizma može dosvesti do viših razina ekspresije survivina i koreliran je s povećanim rizikom razvoja nekih karcinoma (npr. pluća (108)). Polimorfizmi c.-241C>T (rs17878467) i c.-235G>A (rs17887126) nalaze se također u promotorskoj regiji i mogu utjecati na ekspresiju survivina. Polimorfizam c.385G>A (rs2071214) nalazi se u eksonu 4, dok se polimorfizam c.\*571T>C (rs1042489) nalazi u 3'-UTR regiji. Smatra se da ovi polimorfizmi utječu na stabilnost mRNK survivina (107).

### 1.5.3. Survivin i tumori usne šupljine i orofarinksa

Survivin igra ključnu ulogu u regulaciji staničnog ciklusa i inhibiciji apoptoze, što ga čini značajnim faktorom u razvoju i progresiji tumora. U tumorima glave i vrata, survivin je često prekomjerno izražen, što je povezano s agresivnijim fenotipom tumora, otpornošću na terapiju i lošijom prognozom za pacijente (109). Prekomjerna ekspresija survivina u tumorima glave i vrata potiče staničnu proliferaciju i štiti tumorske stanice od apoptoze, što doprinosi njihovom

opstanku i rastu (110). Survivin je također uključen u mitotsku regulaciju, što dodatno povećava maligni potencijal stanica raka.

Prema Liu i sur. 2017. povećana ekspresija *BIRC5* mRNA otkrivena je u tumorskim uzorcima s oralnim karcinomom u usporedbi s okolnim peritumoralnim ili normalnim tkivom (111). Međutim, ovo povećanje samo po sebi nije bilo dovoljno za poticaj progresije tumora u oralnom karcinomu skvamoznih stanica. Ipak, uočeno je da je nuklearna ekspresija survivina povezana sa stadijem tumora i stupnjem diferencijacije (111). U jednoj od najvećih meta analiza Zhoua i sur. iz 2021. godine analizirana je baza od gotovo 5000 karcinoma, a koja pokazuje da je survivin prediktor lošeg preživljenja kod tumora glave i vrata za više anatomske podsjela (112).

## 2. HIPOTEZA

Povećana ekspresija izoformi gena *BIRC5* povezana je s lošijim preživljenjem i lošijom prognozom kod pacijenata oboljelih od planocelularnog karcinoma usne šupljine i orofarinksa. Polimorfizmi gena *BIRC5* mogli bi imati utjecaj na ekspresiju izoformi.

Prisutnost genskog polimorfizama i određivanje ekspresije izoformi gena *BIRC5* mogli bi se koristiti kao biomarker agresivnosti primarnog tumora ili prognostički čimbenik ishoda liječenja ili odgovora na terapiju u planocelularnim karcinomima usne šupljine i orofarinksa.

### 3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja:

1. ispitati ekspresiju različitih izoformi gena *BIRC5* u tumorskom tkivu ispitanika.
2. ispitati ekspresiju različitih izoformi gena *BIRC5* u sluznici usne šupljine zdravih ispitanika.
3. odrediti prisutnost polimorfizma gena *BIRC5* kod ispitanika oboljelih od planocelularnog karcinoma.
4. odrediti prisutnost polimorfizma gena *BIRC5* kod zdravih ispitanika.
5. usporediti dobivene rezultate između ispitivanih skupina
6. usporediti ekspresijske obrasce i polimorfizme *BIRC5* s kliničkim i patohistološkim obilježjima tumora te ishodima bolesti

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Ustroj studije

Ovo istraživanje je ustrojeno kao retrospektivno. Provedeno je u Laboratoriju za nasljedni rak Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, u Zavodu za maksilofacijalnu i oralnu kirurgiju Kliničkog bolničkog centra (KBC) Osijek i na Katedri za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Medicinskog fakulteta Osijek Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

### 4.2. Ispitanici

U istraživanje su uključeni oboljeli od patohistološki verificiranog planocelularnog karcinoma usne šupljine i orofarinksa, odnosno korišteni su arhivski uzorci tumora i periferne krvi (korišteni u ranijim istraživanjima), a koji su adekvatno pohranjeni na - 80 °C u Laboratoriju za nasljedni rak Instituta Ruđer Bošković.

Uključni kriteriji:

- (1) oboljeli od patohistološki verificiranog planocelularnog karcinoma usne šupljine i orofarinksa, a koji su kirurški liječeni u Zavodu za maksilofacijalnu i oralnu kirurgiju KBC Osijek u periodu od 2007. do 2010. godine
- (2) oboljeli od svih stadija bolesti prema aktualnoj osmoj reviziji TNM klasifikacije (prema AJCC, od engl. *American Joint of Cancer Commetee*)
- (3) oboljeli koji su inicijalno liječeni kirurški, radikalnom resekcijom primarnog tumora, s ili bez disekcije vrata, uz adjuvantno prevedenu radioterapiji ili kemoradioterapiju, ovisno o patohistološkim značajkama tumora
- (4) dobiven informirani pristanak.

Isključni kriteriji:

- (1) bolesnici koji su bili prethodno liječeni zbog zloćudnog tumora glave i vrata



(2) bolesnici kod kojih količina patohistološkog materijala nije bila dostatna za analizu

(3) bolesnici s neadekvatnim praćenjem ili nepotpunom medicinskom dokumentacijom.

Od patohistoloških karakteristika evidentirana je veličina primarnog tumora i nuklearni gradus tumora. Također je evidentiran status i broj pozitivnih limfnih čvorova u disektatu vrata te su bolesnici razvrstani prema stadijima bolesti koristeći aktualnu TNM klasifikaciju.

Svi uključeni ispitanici bili su praćeni tijekom minimalno 60 mjeseci.

Za svaki uzorak korišten u istraživanju dobiven je informirani pristanak pacijenata. Ispunjen je laboratorijski formular, potpisan od kliničara kao i suglasnost za sudjelovanje u istraživanju potpisana od strane pacijenata. Etičko povjerenstvo KBC Osijek i Medicinski fakultet Osijek izdali su etičke dopusnice za provedbu ovog istraživanja (broj 29-1:1688-12/2006, Klinička bolnica Osijek, Etičko povjerenstvo, broj: R1-1510/2023).

Ovim istraživanjem osiguralo se poštivanje temeljnih etičkih i bioetičkih principa – osobni integritet, pravednost, dobročinstvo i neškodljivost za ispitanika. U prikupljanju i prikazivanju podataka čuvala se privatnost ispitanika kao i njegov identitet. Pri znanstvenom istraživanju pridržavali smo se preporuka Helsinške deklaracije i njezinih revizija, Kodeksa medicinske etike i deontologije (NN 55/08), Pravilnika o kliničkim ispitivanjima i dobroj kliničkoj praksi (NN 121/2007, NN 175/2003), koji je u skladu sa Smjernicama Europske agencije i njenog tijela Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP/ITH/135/95). Prikupljeni podatci prikupljeni su etičkim i bioetičkim principima te su pohranjeni, šifrirani u sigurnoj izvanmrežnoj pohrani, dostupni samo doktorandu i mentorima. Prikupljanje podataka i zaštita privatnosti ispitanika izvedena je prema Općoj uredbi o zaštiti podataka (GDPR 2016/679).

U ovom istraživanju kod ispitanika s planocelularnim karcinomom usne šupljine i orofarinksa analizirali smo ekspresiju izoformi gena *BIRC5* i prisutnost polimorfizama gena *BIRC5*, kao i njihovu međusobno povezanost te anamnestičke podatke o spolu, trajanju bolesti, izloženosti čimbenicima rizika poput konzumiranja duhanskih proizvoda, patohistološke karakteristike primarnog tumora i statusa regionalnih limfnih čvorova dobivenih nakon kirurške resekcije, provedbe adjuvantnog liječenja (radioterapija s ili bez kemoterapije) te podatke iz medicinske dokumentacije o praćenju bolesnika koje obuhvaća period bez bolesti, ukupno doživljenje, ponovnu pojavu lokalne ili regionalne bolesti, odnosno udaljenih presadnica.

U grupi zdravih kontrola koristili smo se uzorcima tkiva zdrave sluznice usne šupljine i uzorcima periferne krvi ispitanika koji su liječeni u Zavodu za maksilofacijalnu i oralnu kirurgiju zbog neke druge nemaligne bolesti. Prikupljanje uzoraka učinjeno je tijekom operativnog zahvata koji je i ranije planiran, a pacijentu je detaljno objašnjen postupak biospije zdrave sluznice uz prezentaciju kratkog informiranog pristanka kojeg je pacijent ranije pročitao i potpisao. Neposredno prije zahvata uzorkovana je i jedna epruveta periferne krvi (EDTA) koja se odmah pohranila na - 20 °C do konačne analize. Tijekom prikupljanja zdravih kontrola vodilo se računa o spolnoj i dobnoj distribuciji zdravih kontrola prema skupini bolesnika te je zabilježen status pušenja. Za sam postupak ishodovana je dozvola Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Osijek (R2-1457/2022).

### 4.3. Određivanje ekspresije izoformi

#### 4.3.1. Uzorkovanje tkiva

Uzorkovanje tumorskog tkiva kod bolesnika izvršeno je tijekom samog operativnog zahvata kada je uzorkovan fragment tumorskog tkiva veličine oko 10 x 5 mm i pohranjeno u RNA later (proizvođač) na - 20 °C, a potom na - 80 °C do konačne analize. Uzorci zdrave sluznice uzorkovani su kod kontrolnih ispitanika tijekom operativnog zahvata na način da se ekscidirao uzorak zdrave bukalne sluznice veličine oko 10 x 5 mm koji je pohranjen na isti način do konačne analize.

#### 4.3.2. Izolacija RNK iz tkiva

Svi koraci izolacije RNK iz stanica provode se na ledu radi očuvanja njenog integriteta. Također, svi koraci centrifugiranja se izvode u ohlađenoj centrifugi na + 4 °C. Tkivo (zdravo ili tumorsko) se usitni prvo škaricama, a zatim u homogenizatoru u prisutnosti 500 µL TRIzol-a (Invitrogen Life Technologies, SAD) i inkubira 5 minuta na sobnoj temperaturi. TRIzol reagens je monofazna otopina fenola i gvanidin izotiocijanata koja održava integritet RNK tijekom homogenizacije tkiva, istovremeno remeteći integritet staničnih membrana i rastvarajući stanične komponente. Nakon toga, dodaje se 100 µL kloroforma i sadržaj

mikroeprovete se dobro promiješa mućkanjem. Mješavina se potom inkubira 5 minuta na sobnoj temperaturi. Sljedeći korak je centrifugiranje na + 4 °C, 15 minuta na 13200 o/min, čime se otopina razdvaja u gornju vodenu fazu, međufazu i donju organsku fazu. RNK ostaje u gornjoj, vodenoj fazi koja se prebacuje u čistu mikroeprovetu. Za precipitaciju RNK, dodaje se 250 µL izopropanola, dobro promiješa i inkubira 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga, centrifugira se 15 minuta u ohlađenoj centrifugi na 13200 o/min. Supernatant se odlijeva, vodeći računa da se ostavi 15 – 20 % vodene faze iznad međufaze kako bi se izbjegla kontaminacija proteinima, dok RNK ostaje u precipitatu. Precipitat RNK se ispere s 500 µL 75 % - tnog etanola i centrifugira u ohlađenoj centrifugi 10 minuta pri 13200 o/min. Nakon toga, supernatant se ponovno odlijeva, a mikroeproveta ostaje otvorena kako bi se osušio talog, odnosno kako bi preostali etanol ispario. Za konačno otapanje RNK, koristio se 30 µL sterilne vode, a zatim se uzorak pohranjuje u hladnjak na – 80 °C do daljnje upotrebe.

##### 4.3.3. Određivanje koncentracija RNK

Za određivanje koncentracije RNK koristio se spektrofotometar NanoPhotometer® N60/N50 (Implen, Njemačka). Uređaj mjeri apsorbanciju pri valnim duljinama od 230 nm, 260 nm i 280 nm. Postupak započinje nanošenjem 1 µL vode kao pozadinske korekcije na mjesto namijenjeno mjerenju mikropipetom. Uređaj prikazuje koncentraciju RNK, kao i omjere A260/A280 i A260/A230. Omjer A260/A280 odražava čistoću RNA, te što je bliži 2, to je RNK čišća. Niži omjer može upućivati na kontaminaciju proteinima koji apsorbiraju na 280 nm. Omjer A260/A230 također ukazuje na čistoću uzorka, a za čisti uzorak je u rasponu 2 - 2,2.

##### 4.3.4. Reverzna transkripcija

RNK se prije analize ekspresije gena kvantitativnim *real-time* PCR-om prevela reverznom transkriptazom u cDNK (engl. *complementary DNA*, komplementarna DNK). Reakcija reverzne transkripcije radila se s 500 ng RNK. Za ovu reakciju korišten je kit za reverznu transkripciju (Applied Biosystems, SAD) koji sadrži sve potrebne komponente. U ukupni volumen od 25 µL ulazi 8,5 µL reakcijske smjese (10 x pufer (10% v/v)), 4 mM dNTP, 10 x početnice (10 % v/v), 1 U/µL inhibitora RNaza i 2,5 U/µL reverzne transkriptaze), 500 ng RNK te se nadopunjuje s H<sub>2</sub>O (oslobođena od nukleaza) do konačnog volumena.

#### 4.3.5. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. real time PCR, qRT-PCR)

*Real-time* PCR (RT-PCR), poznat i kao lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu, je metoda zasnovana na standardnoj PCR metodi. Glavna razlika i važno tehnološko unapređenje je mogućnost istovremene detekcije PCR produkata i praćenje eksponencijalne replikacije novonastalih DNK molekula sa svakim ciklusom reakcije. U tijeku reakcije PCR-a, količina DNK se udvostručuje, što rezultira eksponencijalnim povećanjem DNK količine u uzorku sa svakim ciklusom. Ovo se prati pomoću fluorescentne boje SYBR Green, koja se veže na novonastale DNK odsječke. Fluorescencija se povećava s svakim ciklusom, a ciklus u kojem je stvorena dovoljna količina DNK da bi fluorescencija prešla prag detekcije naziva se Ct vrijednost. qRT-PCR pretpostavlja da je količina nosintetizirane DNK tijekom eksponencijalne faze reakcije PCR proporcionalna početnoj količini DNK. Na temelju toga se određuje prag fluorescencije u eksponencijalnoj fazi (engl. *threshold*). Kad razina fluorescencije prijeđe taj prag, određuje se ciklus prijelaza praga fluorescencije (engl. *threshold cycle*, Ct). Što je niža Ct-vrijednost, to je početna količina DNK bila veća, jer je prag fluorescencije ranije postignut. S druge strane, uzorak s manje DNK će imati višu Ct vrijednost. Eventualne razlike u početnoj koncentraciji uzorka se ispravljaju istovremenom analizom referentnog gena koji služi kao kontrola, jer je njegova ekspresija stabilna u svim tkivima i pod svim uvjetima. Sve Ct vrijednosti se zatim normaliziraju u odnosu na Ct vrijednost referentnog gena. Za usporedbu ekspresije gena između dvije kategorije uzoraka, relativna ekspresija gena se izračunava kao promjena ekspresije u odnosu na referentni gen i izražava se kao  $2^{-\Delta Ct}$ , gdje je  $\Delta Ct$  razlika u ekspresiji (Ct [ispitivani gen] - Ct [referentni gen]). qRT-PCR je izvedena koristeći pojedinačne mikrokapilare ili pločice s 96 bunarića, koristeći Bio-Rad 96 CFX uređaj za kvantitativni real-time PCR (Bio-Rad Laboratories, SAD).

Detektirana je ekspresija osam izoformi survivina: S wt, S 2 $\alpha$ , S 2B, S 3 $\alpha$ , S 3B, S  $\Delta$ ex3, S 3 $\gamma$ M i S 3 $\gamma$ V, kao i referentnog gena *TBP*. Reakcijska smjesa se priprema zasebno za svaku izoformu. U smjesu se dodaje SsoFast™ EvaGreen supermix (Bio-Rad Laboratories, SAD) 2x (50% v/v), početnica F (0,3 mM), početnica R (0,3 mM) te voda do ukupnog volumena od 9  $\mu$ L po uzorku. *Real-time* PCR se izvodi najmanje u duplikatu za svaki uzorak, a za svaku reakcijsku smjesu za svaki gen priprema se i jedna dodatna negativna kontrola u koju se ne dodaje cDNK uzorak

(engl. *no template control*, NTC). Nukleotidne sekvence korištenih početnica navedene su u Tablici 4.1.

**Tablica 4.1.** Sekvence početnica korištene za određivanje ekspresije izoformi gena za survivin

Početnica	Slijed nukleotida
<b>S wt</b>	F - TGACGACCCCATAGAGGAAC R - TCCTTTGCATTTTGTCTTGG
<b>S 2<math>\alpha</math></b>	F - AACTGGCCCTTCTTGGAG R - ACTTACATGGGGTCGTCATC
<b>S 2B</b>	F - GATGACGACCCCATTTGG R - TTATGTTCTCTCTCGTGATCC
<b>S 3<math>\alpha</math></b>	F - GAGGCTGGCTTCATCCACT R - AGAGCTCTCTCATGGGGTCGT
<b>S 3B</b>	F - GCCAAGAACAATAATTGAGAGAG R - AACAGACCCTGGCAAACATC
<b>S <math>\Delta</math>ex3</b>	F - GACGACCCCATGCAAAG R - GTGGCACCAGGGAATAAAC
<b>S 3<math>\gamma</math>M</b>	F - GATGACGACCCCATAGAGGA R - GGGTGACAGAGTAAGACCAATTTT
<b>S 3<math>\gamma</math>V</b>	F - GATGACGACCCCATAGAGGA R - TGACAGAGTAAGACCCTGTAATTTTG
<b>TBP</b>	F - CACGAACCACGGCACTGATT R - TTTTCTTGCTGCCAGTCTGGAC

#### 4.4. Analiza polimorfizama gena BIRC5

Od svakog bolesnog ispitanika prije operacije i od svakog ispitanika kontrolne skupine uzorkovana je jedna epruveta krvi (s aditivom K<sub>3</sub>EDTA). Uzorci su čuvani na - 20 °C do analize.

##### 4.4.1. Izolacija genomske DNK

Metodom izoliranja izolirana je genomska DNK iz uzorka pune krvi odnosno leukocita (bijelih krvnih stanica). Eritrocite su uklonjeni osmotskom lizom, a zatim razgrađeni kako bi se oslobodila DNK iz njihove jezgre. Proteini su uklonjeni izoliranjem pomoću NaCl (natrijevog klorida). Proces izolacije genomske DNK metodom izoliranja iz pune krvi odvijao se u dvije faze.

U prvoj fazi su uzorci pune krvi čuvani su na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  u epruvetama. Prije upotrebe su prenijeti u epruvete od 50 mL u kojima su otopljeni i zatim prenešeni u nove hermetički zatvorene epruvete te isprani s RCLB puferom (engl. *Red Cell Lysis Buffer*, pufer za lizu eritrocita), nadopunjavajući svaku epruvetu istim puferom do ukupnog volumena od 40 mL. Nježno su promiješani izvrtanjem i držani na ledu 15 minuta, a zatim centrifugirani 10 minuta pri 5000 o/min i  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Universal 320R, Hettich, Njemačka). Uklonjen je supernatant i na taloge je dodavano po 5 mL RCLB-a. Snažno su miješani na vibracijskoj miješalici dok se nisu razbili. Zatim je svaka epruveta nadopunjena RCLB-om do 25 mL volumena i centrifugirana još 10 minuta pri 5000 o/min i  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Postupak ispiranja s RCLB-om ponavljan je dok su talozi leukocita prešli iz crvene u blijedožutu boju. Nakon toga su ponovo uklonjeni supernatanti i na taloge je dodano po 2,5 mL SE pufera (NaCl i NaEDTA). Nakon što su razbijeni trešnjom na vibracijskoj miješalici u svaki uzorak dodano je 200  $\mu\text{L}$  10 % SDS pufera (engl. *sodium dodecyl sulfate*, natrij dodecil sulfat) i 15  $\mu\text{L}$  proteinaze K i ostavljeno u kupelji preko noći na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

U drugoj fazi je sadržaj svake epruvete prenešen u nove plastične epruvete od 13 mL, dodano je 750  $\mu\text{L}$  5 M NaCl-a i sadržaj je trešen na vibracijskoj miješalici dok nije postao mliječno bijele boje. Zatim su uzorci centrifugirani 15 minuta pri 5000 o/min na sobnoj temperaturi. Nakon toga su supernatanti prenešeni u nove sterilne epruvete od 15 mL. U njih je dodano 3,5 mL izopropanola te su ručno miješane dok DNK nije postala vidljiva. DNK je zahvaćena sterilnom staklenom Pasteurovom pipetom, isprana u apsolutnom etanolu te prenešena Pasteurovom pipetom u mikroepuvete od 2 mL s odgovarajućim volumenom (100-500  $\mu\text{L}$ ) TE pufera (tris acetat i EDTA), ostavljajući je da se otapa preko noći pri  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  na rotacijskom stalku.

##### 4.4.2. Određivanje koncentracije genomske DNK

U ovoj studiji, za spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije DNK otopljenih u TE puferu, korišten je NanoPhotometer® N60/N50 uređaj (Implen, Njemačka). 1  $\mu\text{L}$  TE pufera koristio se za pozadinsku korekciju na otapalo. Određena je koncentracija DNK i proteina za svaki uzorak. Ugrađeno računalo u uređaju automatski je izračunavalo koncentraciju DNK iz apsorbancije UV svjetla pri valnoj duljini od 260 nm, a istovremeno je mjerilo čistoću uzorka putem omjera apsorbancija na dvije valne duljine: 260 i 280 nm. Otopina s omjerom  $A_{260}/A_{280}$  od 1,8 do

2,0 smatrala se čistom DNK. Manje vrijednosti upućivale su na kontaminaciju proteinima, dok su više vrijednosti ukazivale na kontaminaciju RNK

#### 4.4.3. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction, PCR*) je laboratorijska metoda kojom se eksponencijalno umnožavaju željeni odsječci dvolančane DNK pomoću termostabilnog enzima DNK polimeraze i dvije oligonukleotidne početnice koje određuju odsječak koji će se umnožiti. U reakcijsku smjesu se još dodaju optimalno pufer, ioni (K i Mg), te smjesa nukleotida (dATP, dGTP, dCTP, dTTP). PCR uključuje termički ciklus, koji se strojno izvodi, a sastoji se od tri glavna koraka koji čine jedan ciklus. Prvo je denaturacija, kada se dvolančani "kalup" DNK zagrijava (na temperaturi od 92 do 96 °C) kako bi se razdvojio na dva jednolančana. Drugi korak je prijanjanje, kada se temperatura smanjuje (od 55 °C do 72°C) kako bi se DNK početnice mogle pričvrstiti na "kalup". Treći korak je sinteza, kada se temperatura podiže (68 °C – 72 °C) i novi DNK lanac sintetizira Taq polimerazom. Ova tri koraka se ponavljaju 25 – 45 puta, što udvostručuje broj kopija DNK u svakom ciklusu reakcije. Nakon završetka PCR-a, elektroforezom se može provjeriti količina i veličina proizvedenih fragmenata DNK.

Cjelokupno kodirajuće područje gena *BIRC5* je genotipizirano, uključujući najčešće SNP-ove (engl. *single nucleotide polymorphism* - polimorfizam jednog nukleotida) u promotorskoj regiji kao i u regiji 3'UTR koji su odabrani iz SNP baze podataka Nacionalnog centra za biotehnologiju (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). Tijekom tog istraživanja dizajnirano je trinaest parova početnica za trinaest PCR produkata koji su navedeni u Tablica 4.2. Početnice za odabrane fragmente dizajnirane su prema sekvenci gena *BIRC5* (GeneID: 332) iz baze GenBank pod brojem NG\_029069.1 pomoću mrežnog programa Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>).

**Tablica 4.2.** Sekvence početnica za genotipizaciju i uvjeti reakcije PCR

UMNAŽANI FRAGMENT	DULJINA UMNAŽANOG FRAGMENTA (pb)	T <sub>m</sub> /°C	SEKVENCA POČETNIH OLIGONUKLEOTIDA (F, R)*
BIRC5 c.-1547	228	66	F 5'-GGAGGAGAGAAAGGGAGGAA-3' R 3'- GGCTGGTCTCAAACCTCCTGA-3'
BIRC5 c.-625	175	60	F 5'-CCCCTGACTCCAGAAGGTG-3' R 5'-TCAGACAGGAGAGCTTTACAGG-3'
BIRC5 c.-241	159	62	F 5'- GATTACAGGCGTGAGCCACT-3' R 5'- GTGTGCCGGGAGTTGTAGTC-3'
BIRC5 ekson 1	251	58	F 5'-GACTACAACCTCCCGGCACAC-3' R 5'-CCTCCAAGAAGGGCCAGT-3'
BIRC5 ekson 1a	264	58	F 5'-AGCCCTTTCTCAAGGACCAC-3' R 5'-CTCGATGGGGACAAAGCAG-3'
BIRC5 ekson 2.1	250	62	F 5'-CACTCACGAGCTGTGCTGTC-3' R 5'-GAAGCAATGAGGGTGGAAAG-3'
BIRC5 ekson 2.2	242	60	F 5'-CGATGGGCTTTGTTTTGAAC-3' R 5'-CAGGGTCTGCTGATGTATTCTG-3'
BIRC5 ekson 2B	147	64	F 5'-CCCTTCTCTGCCCTTAATCC-3' R 5'-TAGTGGAGACGGGGTTTCAC-3'
BIRC5 ekson 3	342	62	F 5'-AGAGGTGCCATATGGGAATG-3' R 5'-CATTGAACAGGGTTTGAGCA-3'
BIRC5 ekson 3B	229	60	F 5'-CCCTGGATTTGCTAATGTGA-3' R 5'-AGCTCTGCTCTTAACCACTGC-3'
BIRC5 ekson 4	310	62	F 5'- CTGGGAAGCTCTGGTTTCAG-3' R 5'- CTGGTGCCACTTTCAAGACA-3'
BIRC5 c.9809	161	60	F 5'- TGCATGACTTGTGTGTGATGA-3' R 5'- CCGTTTCCCAATGACTTAG-3'
BIRC5 c.10611	159	60	F 5'-TGTATCATCCGGGCTCCTT-3' R 5'-ACAGAGGCTGGAGTGCATTT-3'

\*F – naprijed (engl. *forward*), R – unatrag (engl. *reverse*)

Reakcijska smjesa (10 µL): 1 µL 10× boje LCGreen Plus+ (Idaho Technology, SAD), 1 µL komercijalno dostupnog 10 × PCR pufera s 20 mM MgCl<sub>2</sub> koji sadrži goveđi albumin iz seruma (Idaho Technology, SAD), 0,2 µL smjese nukleotida (dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 50 mM svaki; Roche, Švicarska), 0,5 µL svake početnice (500 nM svaki), 1 µL DNK uzorka, 0,08 µL FastStart Taq DNK polimeraze (Roche, Švicarska) i voda do ukupnog volumena od 10 µL.

Zbog visokog sadržaja GC u DNK sekvenci promotorske regije, a za uspješnije umnažanje, bilo je potrebno u sve PCR fragmente smještene u promotoru dodati GC-bogati pufer (Roche, Švicarska) koji dolazi u kitu s FastStart Taq DNK polimerazom te odgovarajuće manje H<sub>2</sub>O. U reakcijsku smjesu PCR-a prvo je dodana voda, a zatim ostali reagensi i enzim. Prije stavljanja



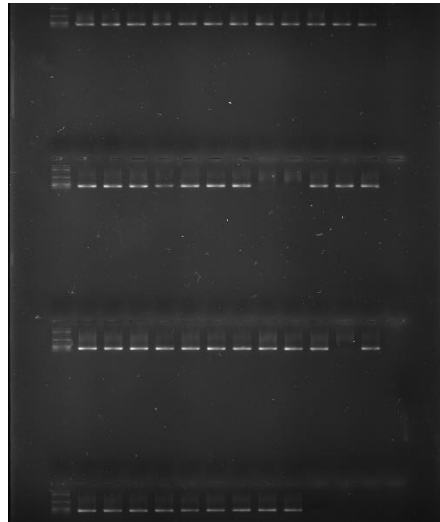
u PCR uređaj (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems, SAD) sve je kratko promiješano na vibracijskoj mješalici i centrifugirano na kratkom programu.

Početna denaturacija odvijala se 4 minute na 94°C, a denaturacija u svakom ciklusu na 94°C trajala je 30 sekundi. Vežanje početnica u svakom ciklusu trajalo je 45 sekundi s time da je korištena odgovarajuća temperatura vežanja za svaki par početnica (58 °C – 66 °C), ovisno o fragmentu). Elongacija na 72 °C trajala je 7 minuta u svakom ciklusu. Slijedilo je stvaranje heterodupleksa 1 minuta na 98 °C i zatim 5 minuta na 40 °C. Sve rađene PCR reakcije imale su 45 ciklusa.

#### 4.4.4. Elektroforeza

Elektroforeza na agaroznom gelu korištena je za provjeru uspješnosti, učinkovitosti i specifičnosti PCR reakcija. Za vizualizaciju razdvojenih fragmenata DNA koristi se boja MIDORI Green Advance (Nippon Genetics Europe, Njemačka). Za osvjetljavanje gela UV svjetlom i određivanje položaja DNK u gelu koristi se UV transiluminator.

Produkti PCR reakcije analizirani su na 1% gelu agaroze pripremljenom s TAE puferom (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0) (Sigma, SAD) i MIDORI Green (1 µg/mL) (Nippon Genetics Europe, Njemačka). U jažice polimeriziranog gela umetnutog u uređaj za elektroforezu nanešeni su uzorke u odgovarajuće jažice. U prvu jažicu smo nanijeli 5 µL DNK standarda 1 kb Plus (Thermo Fisher Scientific, SAD) koji služi za usporedbu i procjenu veličine PCR produkta. U svaku od preostalih jažica smo dodali po 2,5 µL PCR produkta pomiješanog s 1 µL pufera za nanošenje uzoraka (0,05 % bromfenol plavo, 0,05 % ksilen cijanol, 50 % glicerol). Elektroforeza je provedena pod naponom od 100 V tijekom 20 minuta. Za detekciju i fotografiranje gelova korišten je Image Alliance 4.7 (UVItec Limited, Ujedinjeno Kraljevstvo), slika 4.1.

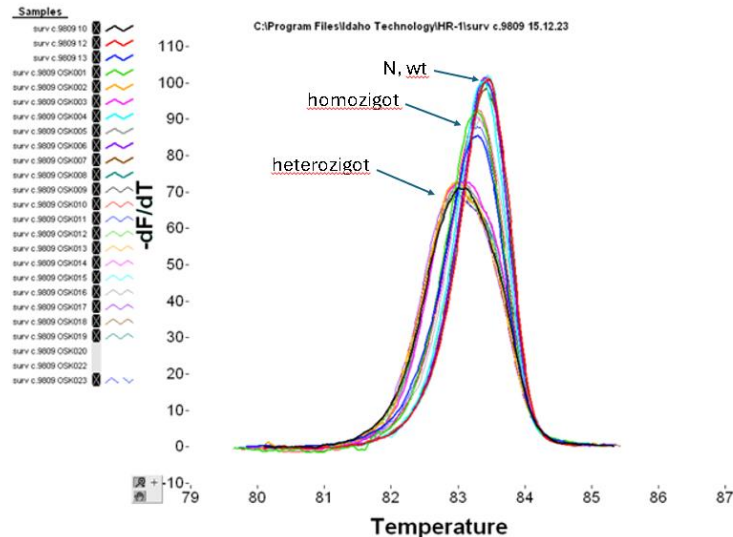


**Slika 4.1.** Elektroforeza na agaroznom gelu: PCR produkt eksona 4 (uređaj Image Alliance 4.7)

#### 4.4.5. Analiza heterodupleksa

Analiza heterodupleksa (dvostruke uzvojnice DNK) neizravan je način otkrivanja mutacija i polimorfizama temeljen na analizi produkata PCR reakcije metodom mekšanja DNK visoke rezolucije (od engl. *High resolution melting*). Nastanak heterodupleksa temelji se na činjenici da kada se dvije različite molekule DNK denaturiraju na visokoj temperaturi, a zatim ostave da se ohlade, dio molekula će se međusobno "pogrešno" spariti, što rezultira stvaranjem heterodupleksa.

Krivulja mekšanja ili disocijacije je grafički prikaz ovisnosti fluorescencije produkta o temperaturi.



**Slika 4.2.** Krivulje mekšanja – krivulja derivacije za polimorfizam c.9809T>C, odnosno c.\*571T>C; jasna distribucija homozigota (CC), heterozigota (TC) i N (TT)

Osim krivulje disocijacije, postoji još dva grafička prikaza za detekciju heterodupleksa - derivacijska krivulja, koja prikazuje ovisnost negativne prve derivacije intenziteta fluorescencije o temperaturi ( $-dI/dT$ ) (slika 4.2.) i krivulja razlike, koja pokazuje razliku u intenzitetu fluorescencije između uzorka i referentnog "normalnog" uzorka za svaku točku mjerenja. Najvažnija aplikacija za mekšanje visoke rezolucije je skeniranje gena ili potraga za nepoznatim varijacijama u PCR amplikonima, prije ili kao alternativa sekvenciranju.

#### 4.4.6. Sekvenciranje

Sekvenciranje DNK je postupak za određivanje slijeda nukleotidnih baza (A, T, C i G) u odabranom fragmentu DNK. Korištena je metoda sekvenciranja po Sangeru (metoda terminacije lanca) u kojem se generiraju fragmenti DNK različitih duljina koji završavaju fluorescentno obilježenim dideoksinukleotidima na 3' kraju. Nakon toga, fragmenti su razdvajaju kapilarnom elektroforezom u staklenoj kapilari napunjenoj gel polimerom.

Prije svakog sekvenciranja, PCR produkti su očišćeni od početnica i viška nukleotida pomoću ExoSAP-IT kit (Thermo Fisher Scientific, SAD) tako da je na 10  $\mu\text{L}$  PCR produkta dodano 0,5  $\mu\text{L}$  enzima ExoSAP-IT. Uzorci su inkubirani 30 minuta na 37 °C, a zatim zagrijavani 15 minuta na 85 °C.

Reakcija sekvenciranja izvodila se u volumenu od 10  $\mu\text{L}$ , što uključuje 1  $\mu\text{L}$  seta za sekvenciranje (BigDye Terminator v1.1, Applied Biosystems, SAD), 1  $\mu\text{L}$  F ili R početnice, 3  $\mu\text{L}$  PCR produkta i 5  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O. Uvjeti reakcije sekvenciranja bili su sljedeći: 1 minuta na 96°C, zatim 25 ciklusa od 10 sekundi na 96 °C, 5 sekundi na 50 °C i 4 minute na 60 °C. Uzorci su zatim precipitirani s 25  $\mu\text{L}$  apsolutnog etanola, 1  $\mu\text{L}$  0,125 M EDTA i 1  $\mu\text{L}$  3 M Na-acetata, te su inkubirani 30 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja od 20 minuta na 13,200 o/min (Centrifuge 5415 D, Eppendorf, Njemačka), uklonjen je supernatant, a talog je opran s 125  $\mu\text{L}$  70% etanola, ponovno centrifugiran 15 minuta na 13,200 o/min i osušen. Nakon toga, uzorci su otopljeni u 20  $\mu\text{L}$  Hi-Di formamida (Applied Biosystems, SAD), denaturirani 2 – 5 minuta na 95 °C i ohlađeni u ledu. Uzorci su analizirani kapilarnom elektroforezom pomoću sekvencera (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, SAD) te analizirani koristeći program Sequencing Analysis 5.1 (Applied Biosystems, SAD). Rezultati su zatim uspoređeni s referentnom sekvencijom koristeći program BioEdit 7.2.5.

#### 4.5. Statističke metode

Podatci su prikazani tablično i grafički. Kategorički podatci prikazani su apsolutnim i relativnim frekvencijama, a kontinuirani (numerički) medijanom i interkvartilnim rasponom. Razlike između kategoričkih varijabli testirane su Fischerovim egzaktnim testom. Normalnost distribucije kontinuiranih varijabli testirana je pomoću D'Agostino-Pearsonovog testa. Razlike kontinuiranih varijabli između dvije nezavisne skupine testirane su Mann-Whitney U testom, a za testiranje razlika više od dvije skupine korišten je Kruskal-Wallis test. Spearmanov koeficijent korelacije rangova koristili smo za utvrđivanje stupnja i smjera povezanosti (korelacije) između varijabli. Krivulje preživljenja izrađene su pomoću Kaplan-Meierove metode, a razlike među njima testirane supomoću log-rang testa. Multivarijatan utjecaj istraživanih varijabli na preživljenje pacijenata ispitani su pomoću Coxovog regresijskog modela proporcionalnog rizika. Dvosmjerne P-vrijednosti manje od 0,05

#### 4. MATERIJALI I METODE

smatraju se statistički značajnim. Statistička obrada rezultata analizirana je pomoću programa MedCalc for Windows verzija 20 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgija).

## 5. REZULTATI

### 5.1. Osnovna obilježja bolesnika i zdravih kontrola

U istraživanje je bio uključen 31 pacijent s karcinomom usne šupljine (64,6 %) i 17 pacijenata s karcinomom orofarinksa (35,4 %), što je činilo ukupno 48 oboljelih ispitanika. Kontrolnu skupinu činilo je 45 ispitanika od kojih je uzeta intraoralna sluznica. Medijan dobi svih bolesnika jest 59 godina (interkvartilnog raspona 39 do 78), a zdravih ispitanika 56 (interkvartilnog raspona 34 do 88) godina, (Tablica 5.1.). Četrdeset jedan uzorak dobiven je od muških (85,4 %), a sedam od ženskih pacijenata (14,6 %). Kontrolni uzorci, intraoralne sluznice, uzeti su od 37 muških (82,2 %) i od 8 ženskih (17,8 %) ispitanika. Usporedbom medijana dobi i spola bolesnika i kontrolne skupine ( $P = 0,1769$ ), nije nađena statistički značajna razlika, dok kod statusa pušenja postoji statistički značajna razlika u bolesnika i zdravih kontrola ( $P < 0,0001$ ).

**Tablica 5.1.** Osnovna obilježja bolesnika i zdravih kontrola

	<b>Bolesnici n=48</b>	<b>Kontrolni ispitanici n=45</b>	<b>p-vrijednost*</b>
<b>Spol (muškarci/žene)</b>	41 (85,4) / 7 (14,6)	37 (82,2) / 8 (17,8)	0,6772
<b>Dob</b>	59 (39-78)	56 (34-88)	0,0736
<b>Pušenje (da/ne)</b>	42 (87,5) / 6 (12,5)	12 (26,6) / 33 (73,3)	<b>&lt;0,0001</b>

\* Usporedba učestalosti za spol i pušenje učinjena je hi-kvadrat testom, a dobi Mann-Whitney testom

Samo 6 bolesnika nije konzumiralo duhanske proizvode tj. 12,5 % bolesnika, a 42 bolesnika, odnosno njih 87,5 %, bili su pušači. U kontrolnu skupinu bilo je uključeno 12 (26,6 %) pušača i 33 (73,3 %) nepušača, čime je primjećen nesrazmjer pušačkog statusa obje ispitivane skupine. Razdioba pacijenata po stadijima primarnog tumora te stadijima kliničkog i patološkog TNM statusa, kao i histološkog gradusa prikazana je u Tablici 5.2.

**Tablica 5.2** Kliničko-patološka obilježja bolesnika

	<b>Broj bolesnika (n=48)</b>
<b>Sijelo (usna šupljina/orofarinks)</b>	31 (64,6) / 17 (35,4)
<b>T stadij</b>	
1	3 (6,2 %)
2	19 (38,6 %)
3	11 (22,9 %)
4	15 (31,2 %)
<b>cN</b>	
0	20 (41,7 %)
1	11 (22,9 %)
2	15 (31,2 %)
3	2 (4,2 %)
<b>cTNM</b>	
I	2 (4,2 %)
II	10 (20,8 %)
III	11 (22,9 %)
IV	25 (52,1 %)
<b>pN</b>	
0	16 (33,3 %)
1	5 (10,4 %)
2	25 (52,1 %)
3	2 (4,2 %)
<b>pTNM</b>	
I	3 (6,2 %)
II	7 (14,6 %)
III	7 (14,6 %)
IV	31 (64,6 %)
<b>Broders</b>	
1	19 (39,6 %)
2	22 (45,8 %)
3	5 (10,4 %)
4	2 (4,2 %)
<b>Preživljenje (petogodišnje)</b>	
Živi	8 (16,7 %)
Umrli	35 (72,9 %)
Nije primjenjivo	5 (10,4 %)

T – veličina primarnog tumora, cTNM – klinički stadij bolesti, cN – klinički stupanj regionalne bolesti, pTNM – patološki stupanj proširenosti bolesti, pN – patološki stadij regionalnih čvorova, Broders – patohistološki gradus primarnog tumora

## 5.2. Određivanje ekspresije izoformi gena *BIRC5*

### 5.2.1. Određivanje razina relativne ekspresije izoformi gena *BIRC5* u tumorskom i zdravom tkivu

Relativna razina ekspresije za osam najčešćih izoformi gena *BIRC5* (S wt, S 2 $\alpha$ , S 2B, S 3 $\alpha$ , S 3B, S  $\Delta$ ex3, S 3 $\gamma$ M i S 3 $\gamma$ V ) određena je metodom qRT-PCR u 48 uzoraka tumorskog tkiva ispitanika oboljelih od planocelularnog karcinoma usne šupljine i orofarinksa, kao i u 45 uzoraka zdrave sluznice kontrolnih ispitanika. Za usporedbu razina ekspresije gena korištene su vrijednosti  $\Delta$ Ct, odnosno Ct-vrijednosti su za svaki gen normalizirane prema Ct vrijednosti referentnog gena, gena *TBP*. Razine ekspresije prikazane su kao  $2^{-\Delta Ct}$ . Analizom dobivenih rezultata nađeno je da su i u bolesnicima i u zdravim kontrolama najjače eksprimirane izoforme S wt, S 2 $\alpha$  i S 2B, dok su najslabije eksprimirane izoforme S 3 $\gamma$ M i S 3 $\gamma$ V (Tablica 5.3.).

**Tablica 5.3.** Usporedba razina ekspresije izoformi gena *BIRC5* u tumorskom tkivu i zdravim kontrolama

Izoforma	Kontrolni uzorci (intraoralna sluznica) (n=45)		Tumorsko tkivo (n=48)		P- vrijednost*
	Medijan	Raspon	Medijan	Raspon	
S wt	1,954	0,0492-7,732	4,542	0,684-57,153	<0,0001
S 2 $\alpha$	2,063	0,237-8,251	4,714	1,016-26,76	<0,0001
S 2B	0,172	0,000362-0,681	0,4	0,0936-5,319	<0,0001
S 3 $\alpha$	0,0137	0,000121-0,176	0,0365	0,00944-0,73	0,0018
S 3B	0,000305	0,0000327-0,0763	0,0239	0,00128-0,208	<0,0001
S $\Delta$ ex3	0,000475	0,0000401-0,178	0,364	0,0068-14,34	<0,0001
S 3 $\gamma$ M	0,000	0-0,0164	0,00658	0,0000134- 3,849	<0,0001
S 3 $\gamma$ V	0,000	0	0,00124	0,0000164- 0,208	<0,0001

\*Mann-Whitneyev test

Uspoređujući razine relativnih ekspresija pojedinih izoformi uočena je statistički značajna ekspresija izoforme u tumorskom tkivu u odnosu na zdravu kontrolu (introralnu sluznicu) s P-



vrijednošću  $< 0,0001$  za S wt, S 2 $\alpha$ , S 2B, S 3 $\alpha$ , S 3B, S  $\Delta$ ex3, S 3  $\gamma$ M i S 3 $\gamma$ V i  $P = 0,0018$  za izoformu S 3 $\alpha$  (Tablica 5.3., Slika 5.1.)

Izoforma S wt bila je 2,32 puta i statistički značajno jače eksprimirana u uzorcima tumora u odnosu na kontrolne uzorke ( $P < 0,0001$ ). Interkvartilni raspon za tumorsko tkivo bio je od 0,684 do 57,153 (medijan 4,542), dok je u zdravom tkivu interkvartilni raspon bio od 0,0492 do 7,732 (medijan 1,954) (Tablica 5.3.).

Izoforma S 2 $\alpha$  bila je 2,28 puta i statistički značajno jače eksprimirana u uzorcima tumorskog tkiva u odnosu na kontrolne uzorke ( $P < 0,0001$ ). Interkvartilni raspon za tumorsko tkivo bio je od 1,016 do 26,76 (medijan 4,714), dok je u zdravom tkivu interkvartilni raspon bio od 0,237 do 8,251 (medijan 2,063) (Tablica 5.3.).

Izoforma S 2B je bila 2,32 puta i statistički značajno jače eksprimirana u uzorcima tumorskog tkiva u odnosu na kontrolne uzorke ( $P < 0,0001$ ). Interkvartilni raspon za tumorsko tkivo bio je od 0,0936 do 5,319 (medijan 0,4), dok je u zdravom tkivu interkvartilni raspon bio od 0,000362 do 0,681 (medijan 0,172) (Tablica 5.3.).

Izoforma S 3 $\alpha$  bila je 2,66 puta i statistički značajno jače eksprimirana u uzorcima tumorskog tkiva u odnosu na kontrolne uzorke ( $P < 0,0018$ ). Interkvartilni raspon za tumorsko tkivo bio je od 0,00944 do 0,73 (medijan 0,0365), dok u zdravom tkivu interkvartilni raspon bio od 0,000121 do 0,176 (medijan 0,0137) (Tablica 5.3.).

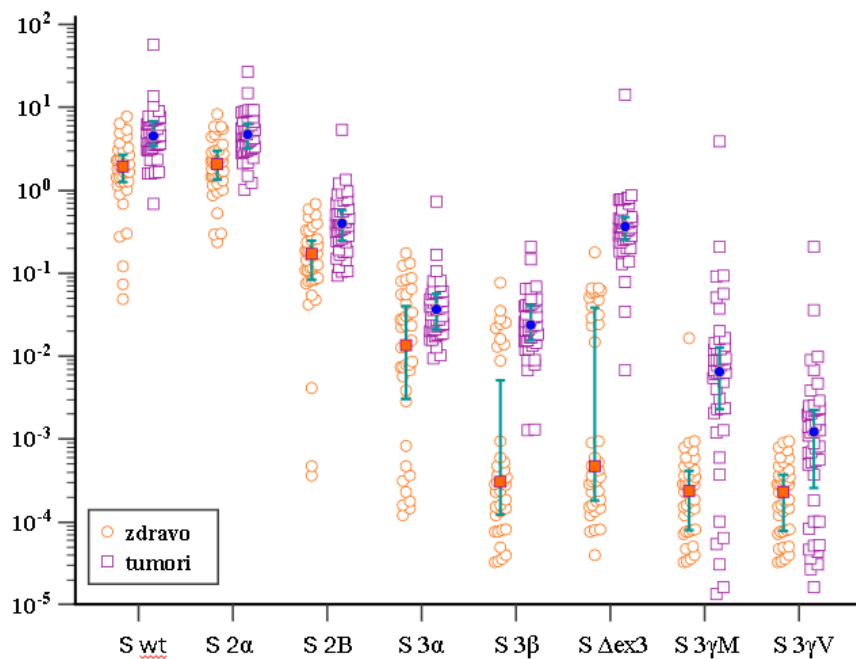
Izoforma S 3B bila je 78,36 puta i statistički značajno jače eksprimirana u uzorcima tumorskog tkiva u odnosu na kontrolne uzorke ( $P < 0,0001$ ). Interkvartilni raspon za tumorsko tkivo bio je od 0,00128 do 0,208 (medijan 0,0239), dok u zdravom tkivu interkvartilni raspon bio od 0,0000327 do 0,0763 (medijan 0,000305) (Tablica 5.3.).

Izoforma S  $\Delta$ ex3 bila je 766,31 puta i statistički značajno jače eksprimirana u uzorcima tumorskog tkiva u odnosu na kontrolne uzorke ( $P < 0,0001$ ). Interkvartilni raspon za tumorsko tkivo bio je od 0,0068 do 14,34 (medijan 0,364), dok je u zdravom tkivu interkvartilni raspon bio od 0,0000401 do 0,178 (medijan 0,000475) (Tablica 5.3.).

Izoforma S 3 $\gamma$ M bila je eksprimirana u 68,88 % tumorskih tkiva, a samo u 2,22 % uzoraka zdrave sluznice. Interkvartilni raspon za tumorsko tkivo bio je od 0,0000134 do 3,849 (medijan

0,00658), dok je u zdravom tkivu interkvartilni raspon bio od 0,000 – 0,0164 (medijan 0,000) ( $p < 0,0001$ ) (Tablica 5.3.).

Izoforma S 3 $\gamma$ V bila je eksprimirana u 46,66 % tumorskog tkiva dok niti u jednom uzorku zdrave sluznice nije detektirana ekspresija izoforme S 3 $\gamma$ V. Interkvartilni raspon te izoforme u tumorskom tkivu bio je od 0,000164 do 0,208 (medijan 0,00124).



**Slika 5.1.** Usporedba relativnih ekspresija osam izoformi gena *BIRC5* u bolesnika i zdravih kontrola (crveni kvadratići označavaju medijan, zelene crte predstavljaju interkvartilni raspon) – korišten je Mann-Whitneyev test

### 5.2.2. Korelacija između ekspresija različitih izoformi gena *BIRC5* u tumorskom tkivu i zdravim kontrolama

Povezanost odnosno korelacija između ekspresijskih obrazaca pojedinih izoformi gena *BIRC5* prikazali smo Spearmanovim koeficijentom korelacije rangova ( $\rho$ ), posebno za tumorsko tkivo, a

posebno za zdrave kontrole. Navedene vrijednosti prikazane su u tablicama (Tablica 5.4. – tumorsko tkivo i Tablica 5.5. – zdravo tkivo).

S wt u tumorskim tkivima statistički značajno korelira sa svim ostalim izoformama (S 2 $\alpha$ , S 2B, S 3 $\alpha$ , S 3B, S  $\Delta$ ex3, S 3 $\gamma$ M i S 3 $\gamma$ V), izoforma S 2 $\alpha$  s S 2B, S 3 $\alpha$ , S 3B, S  $\Delta$ ex3 i S 3 $\gamma$ M, izoforma S 2B s S 3 $\alpha$ , S 3B, S  $\Delta$ ex3 i S 3 $\gamma$ M, izoforma S 3 $\alpha$  s S  $\Delta$ ex3 i S 3 $\gamma$ V, potom izoforma S 3B s S  $\Delta$ ex3 i S 3 $\gamma$ M, izoforma S  $\Delta$ ex3 s S 3 $\gamma$ M i S 3 $\gamma$ M s S 3 $\gamma$ V, (Tablica 5.4.).

**Tablica 5.4.** Korelacija između ekspresije pojedinih izoformi gena *BIRC5* u **tumorskim tkivima**

S 2 $\alpha$	S 2B	S 3 $\alpha$	S3B	S $\Delta$ ex3	S 3 $\gamma$ M	S 3 $\gamma$ V		
<b>0,83</b>	<b>0,74</b>	<b>0,61</b>	<b>0,51</b>	<b>0,70</b>	<b>0,46</b>	<b>0,30</b>	rho	<b>Swt</b>
<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,000</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,039</b>	P	
	<b>0,75</b>	<b>0,61</b>	<b>0,70</b>	<b>0,70</b>	<b>0,42</b>	0,28	rho	<b>S 2<math>\alpha</math></b>
	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,003</b>	0,052	P	
		<b>0,60</b>	<b>0,43</b>	<b>0,63</b>	<b>0,31</b>	0,26	rho	<b>S 2B</b>
		<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,002</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,034</b>	0,073	P	
			0,28	<b>0,43</b>	0,25	<b>0,44</b>	rho	<b>S 3<math>\alpha</math></b>
			0,051	<b>0,002</b>	0,093	<b>0,002</b>	P	
				<b>0,36</b>	<b>0,40</b>	0,07	rho	<b>S 3B</b>
				<b>0,012</b>	<b>0,005</b>	0,659	P	
					<b>0,29</b>	0,21	rho	<b>S <math>\Delta</math>ex3</b>
					<b>0,043</b>	0,149	P	
						<b>0,49</b>	rho	<b>S 3<math>\gamma</math>M</b>
						<b>0,0004</b>	P	

Podobljano su označeni statistički značajni koeficijenti korelacije s pripadajućim P-vrijednostima; Rho-Spearmanov koeficijent korelacije rangova.

Spearmanovim koeficijentom korelacije (Rho,  $\rho$ ) izražena je pozitivna i značajna povezanost relativnih ekspresija u zdravom tkivu između izoforme S wt sa S 2 $\alpha$  i S 2B, potom S 2 $\alpha$  sa S 2B i S 3 $\alpha$ , te S 3B sa S 3 $\gamma$ M. Izoforma S 3 $\gamma$ V nije eksprimirana u kontrolama, dok je izoforma S 3 $\gamma$ M pronađena u samo jednom uzorku (Tablica 5.5.).

**Tablica 5.5.** Korelacija između ekspresije pojedinih izoformi gena *BIRC5* u zdravim tkivima

S 2 $\alpha$	S 2B	S 3 $\alpha$	S 3B	S $\Delta$ ex3	S 3 $\gamma$ M		
<b>0,61</b>	<b>0,60</b>	0,27	-0,05	-0,05	-0,18	rho	S wt
<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	0,101	0,777	0,756	0,281	P	
	<b>0,50</b>	<b>0,45</b>	0,00	0,25	-0,15	rho	S 2 $\alpha$
	<b>0,001</b>	<b>0,005</b>	0,981	0,129	0,377	P	
		0,22	-0,15	0,07	-0,17	rho	S 2B
		0,186	0,358	0,685	0,308	P	
			-0,13	0,15	0,01	rho	S 3 $\alpha$
			0,423	0,371	0,958	P	
				0,31	<b>0,52</b>	rho	S 3B
				0,059	<b>0,001</b>	P	
					0,22	rho	S $\Delta$ ex3
					0,187	P	

Podobljano su označeni statistički značajni koeficijenti korelacije s pripadajućim p-vrijednostima, Rho-Spearmanov koeficijent korelacije rangova.

Usporedbom korelacija izoformi u tumorskom tkivu i zdravim kontrolama ustanovljeno je da su u tumorskom tkivu korelacije u ekspresiji izoformi znatno brojnije nego u zdravom tkivu. Pozitivna i značajna povezanost relativnih ekspresija i u tumorskom i u zdravom tkivu bila je prisutna između izoforme S wt sa S 2 $\alpha$  i S 2B, potom S 2 $\alpha$  sa S 2B i S 3 $\alpha$ , te S 3B sa S 3 $\gamma$ M.

### 5.3. Polimorfizmi gena *BIRC5* u bolesnika i zdravih kontrola

Nađeno je sedamnaest polimorfizama gena *BIRC5* u konstitucijskoj DNK 48 bolesnika u uzorcima krvi s pločastim karcinomom usne šupljine i orofarinksa i 45 uzoraka DNK zdravih kontrola. Velika većina pronađenih polimorfizama nalazi se u promotoru gena *BIRC5* i regiji 3'UTR. Svi polimorfizmi bili su u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži. Polimorfizmi rs17878731 (c.-267G>A) i rs17882627 (c.\*104G>A) nađeni su samo u kontrolama, dok su rs2071214 (c.385G>A), rs7885521 (c.\*50G>C) i rs761692199 (c.\*111G>C) pronađeni samo u uzorcima bolesnika (Tablica 5.6.).

**Tablica 5.6.** Polimorfizmi u *BIRC5* regiji pronađeni u uzorcima krvi bolesnika i zdravih kontrola

Regija gena	SNP ID broj	Promjena na nukleotidu	Frekvencija rjedeg alela kontrole	Frekvencija rjedeg alela bolesnici	P vrijednost frekvencija genotipa**	P vrijednost frekvencija alela**
promotor	rs3764383	c.-1547C>T ***	37/80 (46,2)	26/92 (28,3)	0,062	<b>0,014</b>
promotor	rs8073903	c.-644T>C	39/80 (48,8)	35/96 (36,5)	0,142	0,101
promotor	rs8073069	c.-625G>C	33/80 (41,2)	21/96 (21,9)	<b>0,013</b>	<b>0,005</b>
promotor	rs17878731	c.-267G>A	2/76 (2,6)	0/96 (0,0)	0,109	0,111
promotor	rs17878467	c.-241C>T	7/76 (9,2)	12/96 (12,5)	0,468	0,496
promotor	rs17887126	c.-235G>A	2/76 (2,6)	6/96 (6,3)	0,254	0,264
5 'UTR	rs9904341	c.-31G>C	23/84 (27,4)	30/92 (32,6)	0,484	0,451
intron 2	rs4789551	c.221+209T>C	5/76 (6,6)	5/92 (5,4)	0,379	0,756
intron 2	rs772161908	c.211+1199G>A	29/58 (50,0)	1/96 (1,0)	0,437	0,437
exon 4	rs2071214	c.385G>A**** (c.9194G>A)	0/84 (0,0)	5/96 (5,2)	<b>0,032</b>	<b>0,034</b>
3 'UTR	rs17885521	c.*50G>C (c.9288G>C)	0/84 (0,0)	1/96 (1,0)	0,349	0,349
3 'UTR	rs17882627	c.*104G>A (c.9342G>A)	1/84 (1,2)	0/96 (0,0)	0,285	0,285
3 'UTR	rs761692199	c.*111 G>C (c.9348)	0/84	1/96 (0,0)	0,186	0,349
3 'UTR	rs2239680	c.*148T>C (c.9386T>C)	30/84 (35,7)	25/96 (26,0)	0,155	0,161
3 'UTR	rs178821139	c.*149_*150insAA	2/84	1/96 (1,0)	0,482	0,485
3 'UTR	rs1042489	c.*571T>C (c.9809T>C)	32/82 (39,0)	38/96 (39,6)	0,941	0,939
3 'UTR	rs2661694	c.*1373C>A (c.10611C>A)	26/76 (34,2)	21/96 (21,9)	0,059	0,072

Numeriranje pozicije nukleotida prema NM\_001168.2.

\* - varijante u 3'UTR; \*\* - hi-kvadrat test

\*\*\* - u hrvatskoj populaciji alel T je učestaliji;

\*\*\*\* - u hrvatskoj populaciji alel A je učestaliji

Statistički značajne promjene nađene su u frekvencijama rjeđeg alela kod polimorfizma c.-1547C>T ( $P = 0,0149$ ), a u frekvencijama i genotipa i alela kod polimorfizama c.-625G>C i c.385G>A, a tek granično značajne na razini frekvencije genotipa kod polimorfizma c.\*1373C>A.

### 5.3.1. Polimorfizmi u promotorskoj regiji

U promotorskoj regiji ukupno je nađeno šest polimorfizama: rs3764383 (c.-1547C>T), rs8073903 (c.-644T>C), rs8073069 (c.-625G>C), rs17878731 (c.-267G>A), rs17878467 c.-241C>T i rs17887126 (c.-235G>A).

Kod polimorfizma **rs3764383 (c.-1547C>T)** u hrvatskoj populaciji alel T češće je zastupljen od alela C. Genotip divljeg tipa (CC) pronađen je u 22,5 % kontrolnih i u 8,7 % tumorskih uzoraka. Heterozigotni genotip CT pronađen je u 47,5 % zdravih kontrola i 39,1 % bolesnika, a homozigotni genotip TT pronađen je u 30,0 % kontrolnih uzoraka i u 52,2 % bolesnika (Tablica 5.7.). Učestalost alela C u polimorfizmu rs3764383 (c.-1547C>T\*) kod zdravih kontrola iznosi 46,25 %, a kod bolesnika 28,3 %. Učestalost alela T u kontrolama iznosi 53,75 %, a kod bolesnika 71,7 %. Usporedba frekvencija alela pokazala je da je alel T statistički značajno češći u bolesnika u odnosu na zdravku kontrolu ( $P = 0,0149$ ).

Analizom polimorfizma **rs8073903 (c.-644T>C)** genotip divljeg tipa (TT) nađen je u 40,0 % kontrola i 39,6 % bolesnika. Heterozigotni genotip TC pronađen je u 22,5 % zdravih kontrola i 47,9 % bolesnika. Homozigotni genotip CC pronađen je u 37,5 % kontrolnih uzoraka i u 12,5 % bolesnika (Tablica 5.7.). Učestalost alela T u polimorfizmu rs8073903 (c.-644T>C) kod zdravih kontrola iznosi 51,3 %, a kod bolesnika 63,5 %. Učestalost alela C u kontrolama iznosi 48,8 %, a kod bolesnika 36,5 %. Usporedba frekvencija genotipova i alela pokazala je da nema statistički značajne razlike ( $P > 0,05$ ).

**Tablica 5.7.** Distribucija genotipova i alela polimorfizma promotorske regije kod zdravih kontrola i bolesnika

POLIMORFIZAM	Kontrole		Bolesnici		p vrijednost*	
	n	%	n	%		
<b>c.-1547C&gt;T</b>	CC	9	22,5	4	8,7	0,0621
	CT	19	47,5	18	39,1	
	TT	12	30,0	24	52,2	
	C	37	46,25	26	28,3	<b>0,0149</b>
	T	43	53,75	66	71,7	
<b>c.-644T&gt;C</b>	TT	16	40,0	19	39,6	0,1418
	TC	9	22,5	23	47,9	
	CC	15	37,5	6	12,5	
	T	41	51,3	61	63,5	
<b>c.-625G&gt;C</b>	C	39	48,8	35	36,5	0,1010
	GG	19	47,5	28	58,3	<b>0,0131</b>
	GC	9	22,5	19	39,6	
	CC	12	30,0	1	2,1	
	G	47	58,8	75	78,1	
C	33	41,3	21	21,9	<b>0,0057</b>	
<b>c.-267G&gt;A</b>	GG	36	94,7	48	100,0	0,1098
	GA	2	5,3	0	0,0	
	AA	0	0,0	0	0,0	
	G	74	97,4	96	100,0	
	A	2	2,6	0	0,0	
<b>c.-241C&gt;T</b>	CC	31	81,6	36	75,0	0,4678
	CT	7	18,4	12	25,0	
	TT	0	0,0	0	0,0	
	C	69	90,8	84	87,5	
	T	7	9,2	12	12,5	
<b>c.-235G&gt;A</b>	GG	36	94,7	42	87,5	0,2540
	GA	2	5,3	6	12,5	
	AA	0	0,0	0	0,0	
	G	74	97,4	90	93,8	
	A	2	2,6	6	6,3	

\* - hi-kvadrat test; podebljano je istaknuta statistički značajna razlika;

Kod polimorfizma **rs8073069 (c.-625G>C)** genotip divljeg tipa (GG) je pronađen u 47,5 % kontrola i 58,3 % bolesnika. Heterozigotni genotip GC pronađen je u 22,5 % kontrola i 39,6 % bolesnika. Homozigotni genotip CC nađen je u 30,0 % kontrolnih uzoraka i u 2,1 % bolesnika (Tablica 5.7.). Učestalost alela G u polimorfizmu rs8073069 (c.-625G>C) kod zdravih kontrola iznosi 58,8 %, a kod bolesnika 78,1 %. Učestalost alela C u kontrolama iznosi 41,3 %, a kod bolesnika 21,9 %. Usporedba frekvencija genotipova i alela pokazala je statistički značajno smanjenje u pojavnosti genotipa CC ( $P = 0,0131$ ) i alela C ovog polimorfizma ( $P = 0,0057$ ) u bolesnika.

Kod polimorfizma **rs17878731 (c.-267G>A)** genotip divljeg tipa (GG) pronađen je u 94,7 % kontrola i 100,0 % bolesnika. Heterozigotna promjena GA je pronađena u 5,3 % kontrola, dok kod bolesnika nije nađena (Tablica 5.7.). Učestalost alela G u polimorfizmu rs17878731 (c.-267G>A) kod zdravih kontrola iznosi 97,4 %, a kod bolesnika 100,0 %. Učestalost alela A u kontrolama iznosi 2,6 %. Usporedba frekvencija genotipova i alela pokazala je da nema statistički značajne razlike ( $P > 0,05$ ).

Kod polimorfizma **rs17878467 (c.-241C>T)** genotip divljeg tipa (CC) je pronađen u 81,6 % kontrola i 75,0 % bolesnika. Heterozigotna promjena CT je pronađena u 18,4 % kontrola i 25,0 % karcinoma (Tablica 5.7.). Učestalost alela C u polimorfizmu rs17878467 c.-241C>T kod zdravih kontrola iznosi 90,8 %, a kod bolesnika 87,5 %. Učestalost alela T u kontrolama iznosi 9,2 %, a kod bolesnika 12,5 %. Usporedba frekvencija genotipova i alela pokazala je da nema statistički značajne razlike ( $P > 0,05$ ).

Kod polimorfizma **rs17887126 (c.-235G>A)** genotip divljeg tipa (GG) je pronađen u 94,7 % kontrola i 87,5 % bolesnika. Heterozigotna promjena GA je pronađena u 5,3 % kontrola i 12,5 % bolesnika (Tablica 5.7.). Učestalost alela G u polimorfizmu rs17887126 (c.-235G>A) kod zdravih kontrola iznosi 97,4 %, a kod bolesnika 93,8 %. Učestalost alela A u kontrolama iznosi 2,6 %, a kod bolesnika 6,3 %. Usporedba frekvencija genotipova i alela pokazala je da nema statistički značajne razlike ( $P > 0,05$ ).



## 5.3.2. Polimorfizmi u regiji 5'UTR

Kod polimorfizma **rs9904341 (c.-31G>C)**, genotip divljeg tipa (GG) pronađen je u 59,5 % kontrola i u 45,7 % bolesnika. Heterozigotna promjena GC je pronađena u 26,2 % kontrola i 43,5 % bolesnika. Homozigotna nukleotidna promjena CC je pronađena u 14,3 % zdravih kontrola i u 10,9 % bolesnika (Tablica 5.8.). Učestalost alela G u polimorfizmu rs9904341 (c.-31G>C) kod zdravih kontrola iznosi 72,6 %, a kod bolesnika 67,4 %. Učestalost alela C u kontrolama iznosi 27,4 %, a kod bolesnika 32,6 %. Usporedba frekvencija genotipova i alela pokazala je da nema statistički značajne razlike ( $P > 0,05$ ).

**Tablica 5.8.** Distribucija genotipova i alela polimorfizma c.-31G>C u 5'UTR regiji u zdravim kontrolama i bolesnicima

	kontrole		bolesnici		p vrijednost*
c.-31G>C	n	%	n	%	
GG	25	59,5	21	45,7	
GC	11	26,2	20	43,5	
CC	6	14,3	5	10,9	0,4838
G	61	72,6	62	67,4	
C	23	27,4	30	32,6	0,4515

\* - hi-kvadrat test

## 5.3.3. Polimorfizmi u regiji introna 2

U regiji introna 2 pronađena su dva polimorfizma rs4789551 (c.221+209T>C) i rs772161908 (c.221+1199G>A).

Kod polimorfizma **rs4789551 (c.221+209T>C)** genotip divljeg tipa (TT) pronađen u 86,8 % kontrola i 89,1 % bolesnika. Heterozigotna promjena TC je pronađena u 13,2 % kontrola i 10,9 % bolesnika (Tablica 5.9.). Učestalost alela T u polimorfizmu rs4789551 (c.221+209T>C) kod zdravih kontrola iznosi 93,4 %, a kod bolesnika 94,6 %. Učestalost alela C u kontrolama iznosi

6,6 %, a kod bolesnika 5,4 %. Usporedba frekvencija genotipova i alela pokazala je da nema statistički značajne razlike ( $P > 0,05$ ).

**Tablica 5.9.** Distribucija genotipova i alela polimorfizma u regiji introna 2: rs4789551 (c.221+209T>C) i rs4789551 (c.221+209T>C) u zdravim kontrolama i bolesnicima

POLIMORFIZAM	Kontrole		Bolesnici		p vrijednost*	
	n	%	n	%		
c.221+209T>C	TT	33	86,8	41	89,1	0,3789
	TC	5	13,2	5	10,9	
	CC	0	0,0	0	0,0	
	T	71	93,4	87	94,6	0,7558
	C	5	6,6	5	5,4	
c.221+1199G>A	GG	29	100,0	47	97,9	0,437
	GA	0	0,0	1	2,1	
	AA	0	0,0	0	0,0	
	G	58	100,0	95	99,0	
	A	0	0,0	1	1,0	

\* - hi-kvadrat test

Kod polimorfizma **rs772161908 (c.221+1199G>A)** genotip divljeg tipa (GG) je pronađen u 100 % kontrola i 97,9 % bolesnika. Heterozigotna promjena GA u bolesnika iznosi 2,1 % (Tablica 5.9.). Učestalost alela G u polimorfizmu rs772161908 (c.221+1199G>A) kod zdravih kontrola iznosi 100 %, a kod pacijenata 99,0 %. Alel A prisutan je samo u 1,0 % bolesnika. Usporedba frekvencija genotipova i alela pokazala je da nema statistički značajne razlike ( $P > 0,05$ ).

#### 5.3.4. Polimorfizmi u eksonu 4

U eksonu 4 pronađen je polimorfizam **rs2071214 (c.385G>A\*\* (c.9194G>A))**. U hrvatskoj populaciji alel A je češće zastupljen nego alel G. Genotip divljeg tipa (GG) nije pronađen niti u zdravim kontrolama niti bolesnika. Heterozigotna promjena GA pronađena je samo u 10,4 %

bolesnika. Homozigotna nukleotidna promjena AA pronađena je u 100,0 % kontrolnih uzoraka i u 89,6 % karcinoma (Tablica 5.10.). Alel G polimorfizma rs2071214 (c.385G>A\*\* (c.9194G>A)) nalazi se samo kod 5,2 % bolesnika, a u zdravim kontrolama nije prisutan. Učestalost alela A u kontrolama iznosi 100,0 %, a kod bolesnika 94,8 %. Usporedba frekvencija genotipova i alela pokazala je da postoji statistički značajna razlika u pojavnosti homozigotnog AA polimorfizma c.9194G>A (P = 0,0323) i alela A (P = 0,0344).

**Tablica 5.10.** Distribucija genotipova i alela polimorfizma c.385G>A u zdravim kontrolama i bolesnicima

c.385G>A	kontrole		bolesnici		p vrijednost*
	n	%	n	%	
GG	0	0,0	0	0,0	
GA	0	0,0	5	10,4	
AA	42	100,0	43	89,6	<b>0,0323</b>
G	0	0,0	5	5,2	
A	84	100,0	91	94,8	<b>0,0344</b>

\* - hi-kvadrat test; podebljano je istaknuta statistički značajna razlika.

### 5.3.5. Polimorfizmi u regiji 3'UTR

U 3' netranslatiranoj, 3'UTR regiji pronađeno je sedam polimorfizama: rs17885521 (c.\*50G>C (c.9288G>C)), rs17882627 (c.\*104G>A (c.9342G>A)), rs761692199 (c.\*111G>C (c.9348G>C)), rs2239680 (c.\*148T>C (c.9386T>C)), rs17882139 (c.\*149\_\*150insAA, (c.9387\_9388insAA)), rs1042489 (c.\*571T>C (c.9809T>C)), rs2661694 (c.\*1373C>A (c.10611C>A)).

Kod polimorfizma **rs17885521 (c.\*50G>C (c.9288G>C))** genotip divljeg tipa (GG) je pronađen u 100,0 % kontrola i 97,9 % bolesnika. Heterozigotna promjena GC je pronađena samo u 2,1 % bolesnika (Tablica 5.11.). Učestalost alela G u polimorfizmu rs17885521 (c.\*50G>C (c.9288G>C)) kod zdravih kontrola iznosi 100,0 %, a kod bolesnih pacijenata 99,0 %. Učestalost alela C kod je bolesnika 1,1 %. Usporedba frekvencija genotipova i alela pokazala je da nema statistički značajne razlike (P > 0,05).

**Tablica 5.11.** Distribucija genotipova i alela polimorfizama u regiji 3'UTR u zdravim kontrolama i bolesnicima

POLIMORFIZAM	Kontrole		Bolesnici		p vrijednost*	
	n	%	n	%		
<b>c.*50G&gt;C</b>	GG	42	100,0	47	97,9	
	GC	0	0,0	1	2,1	
	CC	0	0,0	0	0,0	0,3496
	G	84	100,0	95	99,0	
	C	0	0,0	1	1,0	0,3496
<b>c.*104G&gt;A</b>	GG	41	97,6	48	100,0	
	GA	1	2,4	0	0,0	
	AA	0	0,0	0	0,0	0,2850
	G	83	98,8	96	100,0	
	A	1	1,2	0	0,0	0,2850
<b>c.*111G&gt;C</b>	GG	84	100,0	47	97,9	
	GC	0	0,0	1	2,1	
	CC	0	0,0	0	0,0	0,186
	G	84	100,0	95	98,9	
	C	0	0,0	1	1,1	0,349
<b>c.*148T&gt;C</b>	TT	17	40,5	26	54,2	
	TC	20	47,6	19	39,6	
	CC	5	11,9	3	6,3	0,1555
	T	54	64,3	71	74,0	
	C	30	35,7	25	26,0	0,1610
<b>c.*149+150insAA</b>	-/-	40	95,2	47	97,9	
	-/AA	2	4,8	1	2,1	
	AA/AA	0	0,0	0	0,0	0,4825
	-	82	97,6	95	99,0	
	AA	2	2,4	1	1,0	0,4850
<b>c.*571T&gt;C</b>	TT	16	39,0	18	37,5	
	TC	18	43,9	22	45,8	
	CC	7	17,1	8	16,7	0,9419
	T	50	61,0	58	60,4	
	C	32	39,0	38	39,6	0,9395
<b>c.*1373C&gt;A</b>	CC	16	42,1	28	58,3	
	CA	18	47,4	19	39,6	
	AA	4	10,5	1	2,1	0,0597
	C	50	65,8	75	78,1	
	A	26	34,2	21	21,9	0,0722

\* - hi-kvadrat test

Kod polimorfizma **rs17882627 (c.\*104G>A (c.9342G>A))** genotip divljeg tipa (GG) je pronađen u 97,6 % kontrola i 100,0 % bolesnika. Heterozigotna promjena GA pronađena je

samo u 2,4 % kontrola (Tablica 5.11.). Učestalost alela G u polimorfizmu rs17882627 (c.104G>A (c.9342G>A)) kod zdravih kontrola iznosi 98,8 %, a kod bolesnih pacijenata 100,0 %. Učestalost alela A u kontrolama iznosi 1,2 %. Usporedba frekvencija genotipova i alela pokazala je da nema statistički značajne razlike ( $P > 0,05$ ).

Kod polimorfizma **rs761692199 (c.\*111G>C (c.9348G>C))** genotip divljeg tipa (GG) je pronađen u 100,0 % kontrola i 97,9 % bolesnika. Heterozigotna promjena GC je samo u 2,1 % bolesnika, a homozigotni genotipovi nisu pronađeni (Tablica 5.11.). Učestalost alela G u polimorfizmu rs761692199 (c.\*111G>C) kod zdravih kontrola iznosi 100,0 %, a kod bolesnika 98,9 %. Učestalost alela C u bolesnika je 1,1 %. Usporedba frekvencija genotipova i alela pokazala je da nema statistički značajne razlike ( $P > 0,05$ ).

Kod polimorfizma **rs2239680 (c.\*148T>C (c.9386T>C))** genotip divljeg tipa (TT) pronađen je u 40,5 % kontrola i 54,2 % bolesnika. Heterozigotna promjena TC je pronađena u 47,6 % kontrola i 39,6 % bolesnika. Homozigotna nukleotidna promjena CC je pronađena u 11,9 % kontrolnih uzoraka i u 6,3 % bolesnika (Tablica 5.11.). Učestalost alela T u polimorfizmu rs2239680 (c.\*148T>C (c.9386T>C)) kod zdravih kontrola iznosi 64,3 %, a kod bolesnih pacijenata 74,0 %. Učestalost alela C u kontrolama iznosi 35,7 %, a kod bolesnika 26,0 %. Usporedba frekvencija genotipova i alela pokazala je da nema statistički značajne razlike ( $P > 0,05$ ).

Kod polimorfizma **rs17882139 (c.\*149\_\*150insAA, (c.9387\_9388insAA))** genotip divljeg tipa (-/-) pronađen je u 95,2 % kontrola i 97,9 % bolesnika. Heterozigotna promjena (-/AA) je pronađena u 4,8 % kontrola i 2,1 % bolesnika (Tablica 5.11.). Učestalost alela (-) u polimorfizmu rs17882139 (c.\*149\_\*150insAA, (c.9387\_9388insAA)) kod zdravih kontrola iznosi 97,6 %, a kod pacijenata 99,0 %. Učestalost alela AA u kontrolama iznosi 2,4 %, a kod bolesnika 1,0 %. Usporedba frekvencija genotipova i alela pokazala je da nema statistički značajne razlike ( $P > 0,05$ ).

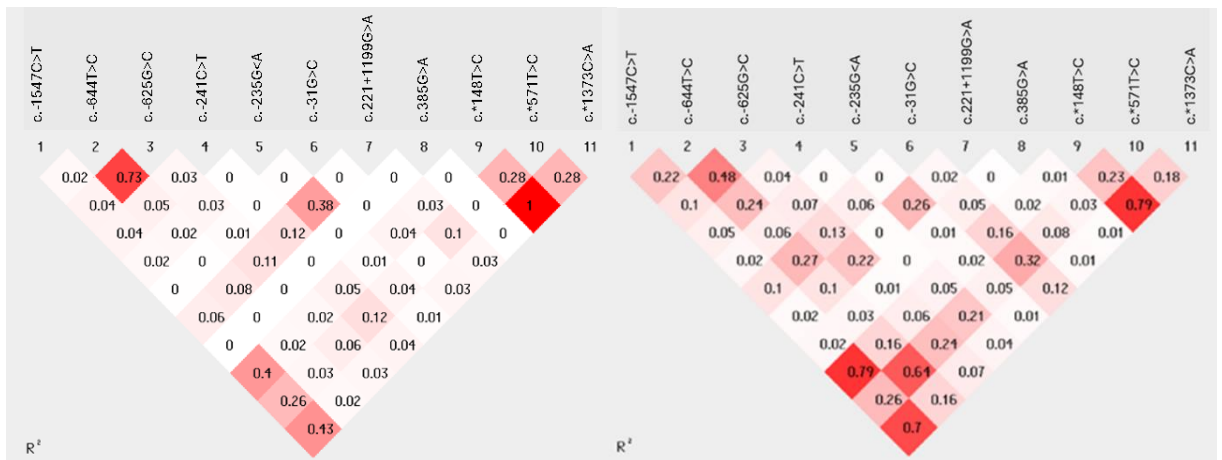
Kod polimorfizma **rs1042489 (c.\*571T>C (c.9809T>C))** genotip divljeg tipa (TT) pronađen je u 39,0 % kontrola i 37,5 % bolesnika. Heterozigotna promjena TC je pronađena u 43,9 %

kontrola i 45,8 % bolesnika. Homozigotna nukleotidna promjena CC je pronađena u 17,1 % kontrolnih uzoraka i u 16,7 % bolesnika (Tablica 5.11.). Učestalost alela T u polimorfizmu rs1042489 (c.\*571T>C (c.9809T>C)) kod zdravih kontrola iznosi 61,0 %, a kod bolesnika 60,4 %. Učestalost alela C u kontrolama iznosi 39,0 %, a kod bolesnika 39,6 %. Usporedba frekvencija genotipova i alela pokazala je da nema statistički značajne razlike ( $P > 0,05$ ).

Kod polimorfizma **rs2661694 (c.\*1373C>A (c.10611C>A))** genotip divljeg tipa (CC) pronađen je u 42,1 % kontrola i 58,3 % bolesnika. Heterozigotna promjena CA pronađena je u 47,4 % kontrola i 39,6 % bolesnika. Homozigotna nukleotidna promjena AA je pronađena u 10,5 % kontrolnih uzoraka i u 2,1 % bolesnika (Tablica 5.11.). Učestalost alela C u polimorfizmu rs2661694 (c.\*1373C>A (c.10611C>A)) kod zdravih kontrola iznosi 65,8 %, a kod bolesnika 78,1 %. Učestalost alela A u kontrolama iznosi 34,2 %, a kod bolesnika 21,9 %. Usporedba frekvencija genotipova i alela pokazala je da postoji granična statistički značajna razlika pojavnosti genotipova i alela opisanog polimorfizma (za genotip:  $P = 0,059$ ; za alel:  $P = 0,072$ ).

Jedanaest SNP-ova s frekvencijom rjeđeg alela (MAF)  $> 5\%$  u uzorcima krvi bolesnika i zdravih kontrola odabrano je za analizu neravnoteže povezivanja. Analiza je pokazala da postoje razlike u broju polimorfizama u neravnoteži povezivanja (LD) između uzoraka krvi bolesnika i zdravih kontrola na više lokusa (Slika 5.2.). Uzorci bolesnika pokazali su povećanu neslučajnu povezanost alela kod tri kombinacije alela: rs3764383 (c.-1547C>T) i rs2239680 (c.\*148T>C) (s 0,4 na 0,79), potom rs3764383 (c.-1547C>T) i rs2661694 (c.\*1373C>A) (s 0,43 na 0,7) i rs8073903 (c.-644T>C) i rs1042489 (c.\*571T>C) (s 0,03 na 0,64) – taj najviše raste. U bolesnika neslučajna povezanost alela pada samo u slučaju polimorfizama rs8073903 (c.-644T>C) i rs8073069 (c.-625G>C) gdje  $R^2$  pada (s 0,73 na 0,48).

U zdravim kontrolama su rs2239680 (c.\*148T>C) i rs2661694 (c.\*1373C>A) u potpunoj neravnoteži povezivanja ( $R^2 = 1$ ), dok nešto padaju u bolesnima ( $R^2 = 0,79$ ).



**Slika 5.2.** Neravnoteža povezivanja u paru (od engl. *pairwise linkage disequilibrium LD*) jedanaest polimorfizama gena *BIRC5* u zdravih kontrola (lijevo) i uzorka bolesnika (desno). Položaj svake varijante sekvence duž gena *BIRC5* naznačen je u odnosu na pravi položaj nukleotida. Broj u svakom dijamentu označava intenzitet LD ( $R^2$ ) između odgovarajućih parova SNP-ova. Snaga LD također je predstavljena nijansama crvene ([0 bijelo]  $< R^2 < 1$  [crveno]).

#### 5.4. Povezanost polimorfizama gena *BIRC5* i ekspresije izoformi gena *BIRC5* u bolesnika i zdravih kontrola

Usporedba povezanosti razine ekspresije osam izoformi gena *BIRC5* s prisutnošću određenog polimorfizma čiji su pojedini aleli ili genotipovi u testiranim uzorcima nađeni najmanje dva puta. Uspoređivane su ekspresije pojedine izoforme s pojavnošću određenog polimorfizma i prikazane korelacije koje su statistički značajne s ( $P < 0,05$ ). Rezultati su prikazani u Tablici 5.12.

Tablica 5.12. Zbirni prikaz P - vrijednosti povezivanja ekspresije pojedinih izoformi s genotipovima i alelima pojedinih polimorfizama

promjena	IZOFORMA	Swt		S2a		S2B		S3a		S3B		S63		S3γM		S3γV	
	Tip uzorka	kont.	boles.	kont.	boles.	kont.	boles.	kont.	boles.	kont.	boles.	kont.	boles.	kont.	boles.	kont.	boles.
c._1547C>T rs3764383	genotipovi	0,911	0,867	0,797	0,929	0,203	0,920	0,148	0,129	0,181	0,751	0,191	0,979	0,576	0,307	0,231	0,325
	aleli	0,190	1,000	0,866	0,849	0,631	0,862	0,785	0,056	0,928	0,456	0,887	0,835	0,766	0,131	0,826	0,362
c._644T>C rs8073903	genotipovi	0,892	0,281	0,968	0,111	0,708	0,066	<b>0,034</b>	0,517	0,601	0,266	0,721	0,234	0,824	0,835	0,967	0,325
	aleli	0,540	0,304	0,763	0,813	0,366	0,837	<b>0,004</b>	0,825	0,216	0,442	0,313	0,837	0,424	0,568	0,909	0,204
c._625G>C rs8073069	genotipovi	0,867	0,104	0,763	0,172	0,834	0,298	0,179	0,135	0,276	0,159	0,172	0,146	0,570	0,712	0,896	0,398
	aleli	0,768	0,130	0,900	0,325	0,528	0,589	<b>0,020</b>	0,260	<b>0,043</b>	0,149	0,119	0,577	0,185	0,852	0,599	0,664
c._241C>T rs17878467	genotipovi	0,984	0,812	0,181	0,405	0,734	0,651	0,617	0,216	0,413	0,432	0,106	0,886	0,058	0,868	0,097	0,167
	aleli	0,985	0,825	0,203	0,438	0,747	0,674	0,635	0,249	0,436	0,465	0,124	0,894	0,071	0,877	0,115	0,199
c._235G>A rs17887126	genotipovi	0,053	0,143	0,073	0,081	<b>0,038</b>	0,596	0,782	0,925	0,581	0,086	0,782	0,152	0,214	0,418	0,167	0,224
	aleli	0,055	0,155	0,075	0,090	<b>0,040</b>	0,607	0,784	0,928	0,583	0,096	0,784	0,164	0,217	0,431	0,170	0,238
c._31G>C rs9904341	genotipovi	0,939	0,806	0,939	0,933	0,587	0,456	0,340	0,275	0,557	0,499	0,217	0,846	0,569	<b>0,001</b>	0,674	0,299
	aleli	0,819	0,629	0,714	0,803	1,000	0,829	0,074	0,117	0,599	0,342	0,090	0,829	0,784	<b>0,0004</b>	0,360	0,185
c.221+209T>C rs4789551	genotipovi	0,300	0,874	<b>0,034</b>	0,764	0,081	0,958	0,099	<b>0,030</b>	0,480	0,198	0,671	0,958	0,850	0,560	1,000	0,314
	aleli	0,718	0,877	0,964	0,770	0,332	0,959	0,100	<b>0,034</b>	0,620	0,209	0,279	0,959	0,928	0,570	0,391	0,326
c.385G>A rs2071214	genotipovi	1,000	0,303	1,000	0,408	1,000	0,933	1,000	0,649	1,000	0,879	1,000	0,109	1,000	0,057	1,000	<b>0,018</b>
	aleli	1,000	0,314	1,000	0,419	1,000	0,934	1,000	0,656	1,000	0,882	1,000	0,117	1,000	0,062	1,000	<b>0,021</b>
c.*148T>C rs2239680	genotipovi	0,112	0,147	0,825	0,263	0,325	0,280	0,426	<b>0,016</b>	0,226	0,936	0,276	0,792	0,547	0,313	0,370	0,259
	aleli	<b>0,029</b>	0,329	0,531	0,207	0,6111	0,184	0,679	<b>0,005</b>	0,696	0,796	0,934	0,783	0,859	0,131	0,732	0,308
c.*571T>C rs1042489	genotipovi	0,309	0,355	0,716	0,080	0,171	0,132	0,392	0,446	0,333	0,105	0,354	0,685	0,150	0,123	0,207	<b>0,041</b>
	aleli	0,725	0,653	0,390	0,261	0,086	0,281	0,930	0,231	0,209	0,569	0,186	0,846	0,061	<b>0,049</b>	0,290	<b>0,010</b>
c.*1373C>A rs2261694	genotipovi	0,426	0,618	0,880	0,931	0,255	0,845	0,702	0,129	0,163	0,931	0,377	0,729	0,492	0,242	0,341	0,089
	aleli	0,190	0,993	0,866	0,730	0,631	0,811	0,785	0,139	0,928	0,730	0,887	0,626	0,766	0,117	0,826	0,107

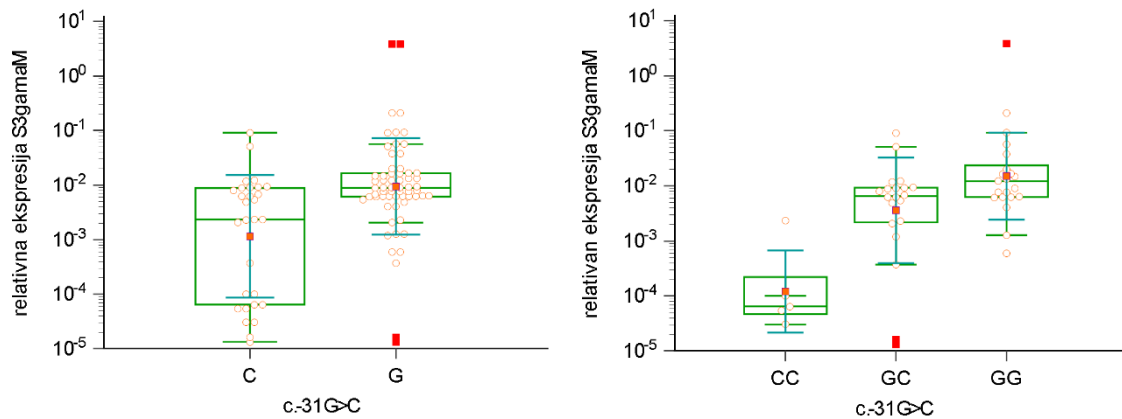
Mann-Whitneyev test korišten je za usporedbu dvije grupe (aleli i neki genotipovi) ili Kruskal-Wallisov test s Conoverovim *post hoc* testom za usporedbu više od dvije grupe (neki genotipovi).



Povezanost ekspresija izoformi i polimorfizama u potpunosti se razlikuje kod bolesnika i kod zdravih kontrola. **Kod bolesnika** statistički značajne razlike na razini genotipova i alela polimorfizama te ekspresije izoformi pokazuju sljedeći polimorfizmi: c.-31G>C, c.221+209T>C, c.385G>A, c.\*148T>C i c.\*571T>C.

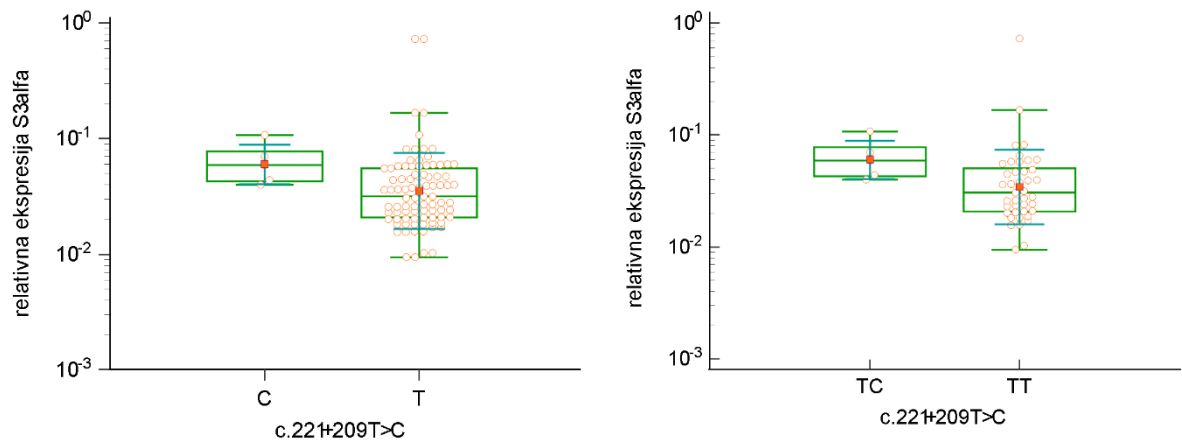
Kod polimorfizma c.-31G>C rjeđi alel C povezan je s manjom ekspresijom izoforme S 3 $\gamma$ M.

Homozigotni CC genotip u polimorfizmu c.-31G>C razlikuje se od GG i GC (koji se međusobno ne razlikuju u ekspresiji) u S 3 $\gamma$ M izoformi (slika 5.3.).



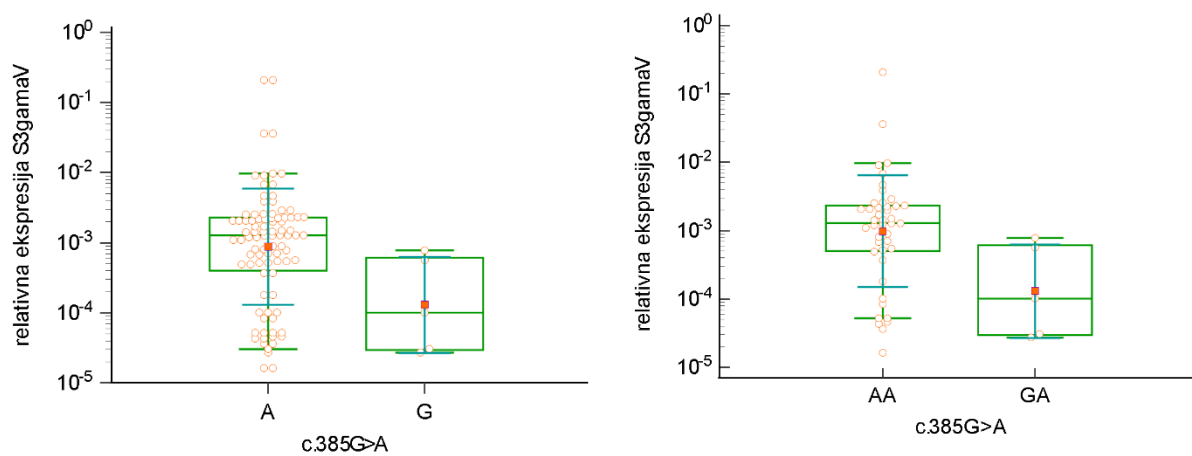
**Slika 5.3.** Povezanost polimorfizma c.-31G>C i relativnih ekspresija izoforme S 3 $\gamma$ M u bolesnika na razini a) alela (Mann-Whitney U test) i b) genotipa (Kruskal-Wallisov test)

Nadalje, alel C u polimorfizmu c.221+209T>C ima statistički značajno veću ekspresiju od alela T u izoformi S 3 $\alpha$ . Wild type TT genotip polimorfizma c.221+209T>C ima statistički značajnije manju ekspresiju od heterozigotnog oblika TC u izoformi S 3 $\alpha$  (slika 5.4.).



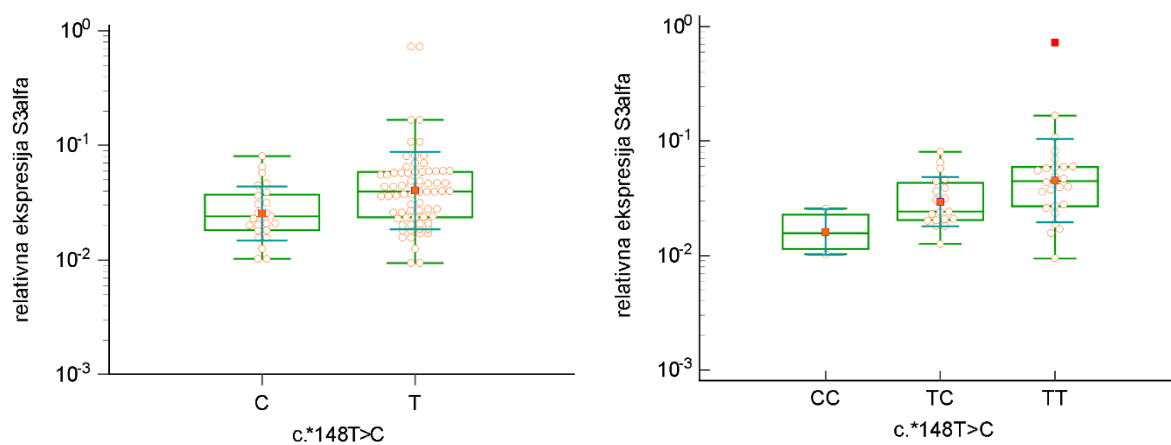
**Slika 5.4.** Povezanost polimorfizma c.221+209T>C i relativnih ekspresija izoforme S 3 $\alpha$  u bolesnika na razini a) alela i b) genotipova (Mann-Whitney U test)

U polimorfizmu c.385G>A alel A ima statistički značajno veću ekspresiju od alela G u izoformi S 3 $\gamma$ V. Homozigotni genotip AA u polimorfizmu c.385G>A ima statistički značajno veću ekspresiju u izoformi S 3 $\gamma$ V (slika 5.5.).



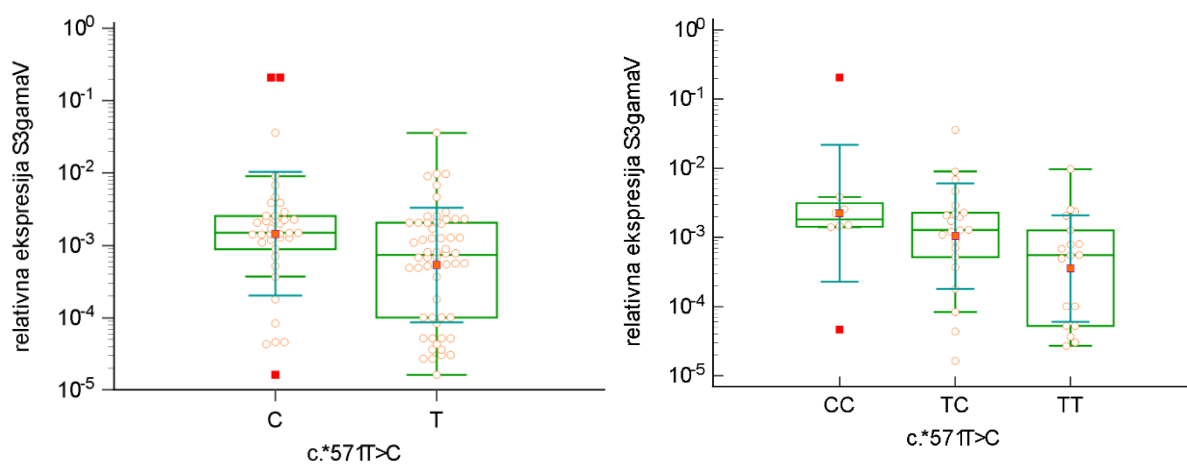
**Slika 5.5.** Povezanost polimorfizma c.385G>A i relativnih ekspresija izoforme S 3 $\gamma$ V u bolesnika na razini a) alela i b) genotipova (Mann-Whitney U test)

U polimorfizmu c.\*148T>C alel T je statistički značajno češći u izoformi S 3 $\alpha$ . Genotipovi CC i TC imaju različitu pojavnost od TT u polimorfizmu c.\*148T>C kod izoforme S 3 $\alpha$  (Slika 5.6.).



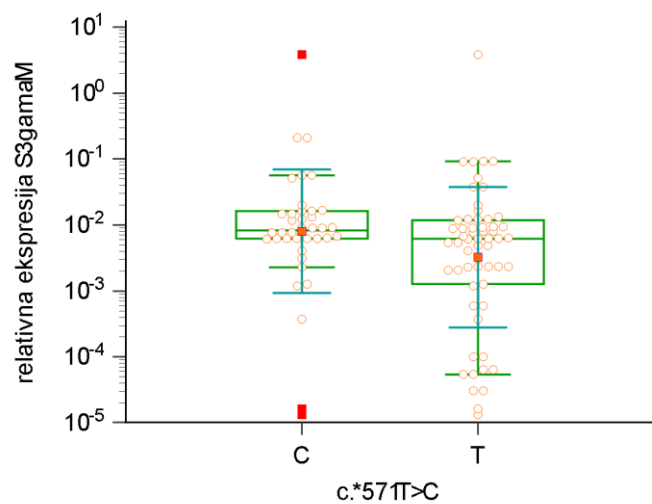
**Slika 5.6.** Povezanost polimorfizma c.\*148T>C i relativnih ekspresija izoforme S 3 $\alpha$  u bolesnika na razini a) alela (Mann-Whitney U test) i b) genotipova (Kruskal-Wallis test)

U polimorfizmu c.\*571T>C alel C je statistički češći u izoformi S 3 $\gamma$ V. Homozigotni genotip CC je različiti od TT kod polimorfizma c.\*571T>C u izoformi S 3 $\gamma$ V (slika 5.7.).



**Slika 5.7.** Povezanost polimorfizma c.\*571T>C i relativnih ekspresija izoforme S 3γV u bolesnika na razini a) alela (Mann-Whitney U test) i b) genotipova (Kruskal-Wallis test)

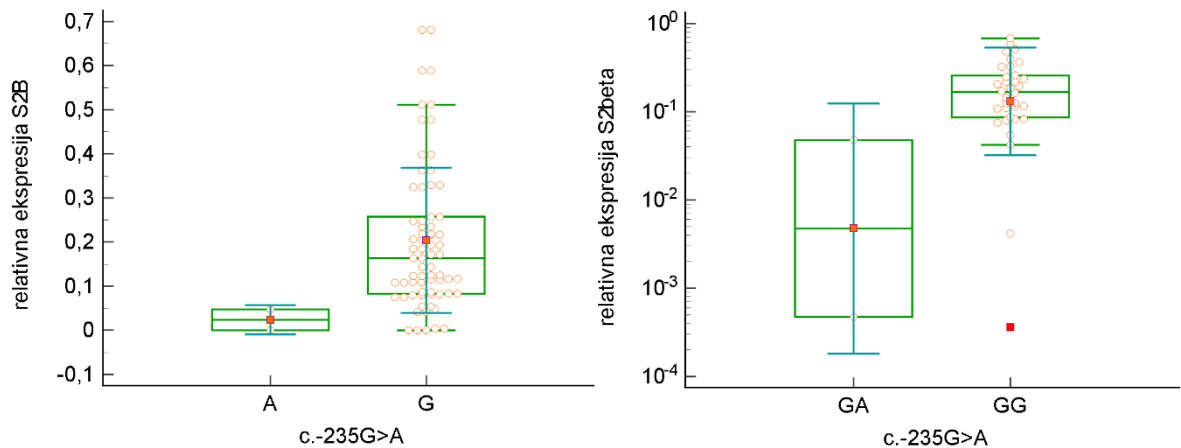
U polimorfizmu c.\*571T>C alel C je statistički češći u izoformi S 3γM (slika 5.8.).



**Slika 5.8.** Povezanost polimorfizma c.\*571T>C i relativne ekspresije izoforme S 3γM u bolesnika (Mann-Whitney U test)

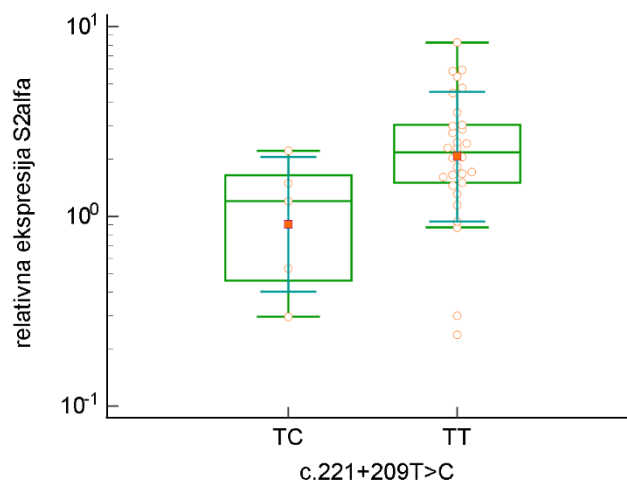
Kod **zdravih kontrola** statistički značajne razlike na razini genotipova i alela polimorfizama te ekspresije izoformi pokazuju polimorfizmi: c.-235G>A i c.-644T>C.

U polimorfizmu c.-235G>A (rs17887126) alel G je statistički češći u izoformi S 2B. Na razini genotipova za isti polimorfizam primijećena je statistički značajna razlika genotipa divljeg tipa GG i izoforme S 2B (slika 5.9.).



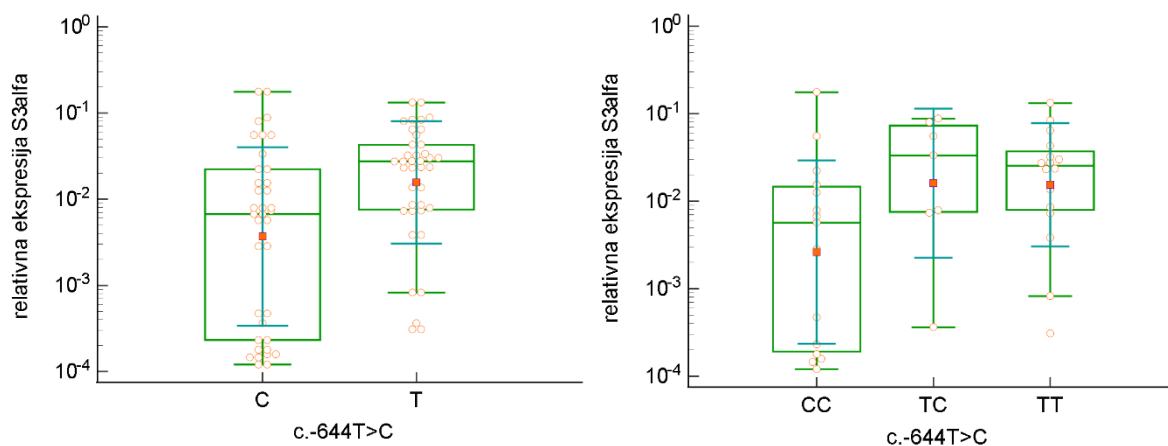
**Slika 5.9.** Povezanost polimorfizma c.-235G>A i relativne ekspresije izoforme S 2B u zdravih kontrola na razini a) alela i b) genotipa (Mann-Whitney U test)

Na razini genotipova za polimorfizam c.221+209T>C (rs4789551) primijećena je statistički značajna razlika genotipa divljeg tipa TT u izoformi S 2 $\alpha$  (slika 5.10.).



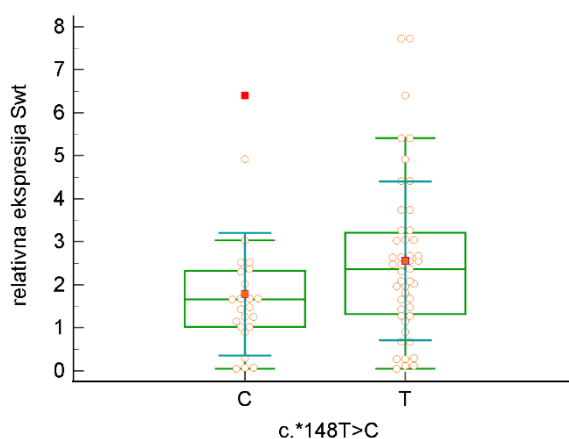
**Slika 5.10.** Povezanost genotipova polimorfizma c.221+209T>C i relativne ekspresije izoforme S 2 $\alpha$  u zdravih kontrola (Mann-Whitney U test)

U polimorfizmu c.-644T>C (rs8073903) alel T značajno je izraženiji u izoformi S 3 $\alpha$ . Na razini genotipova za polimorfizam c.-644T>C (rs8073903) primijećena je statistički značajna razlika genotipova TT i TC u izoformi S 3 $\alpha$  (slika 5.11.).



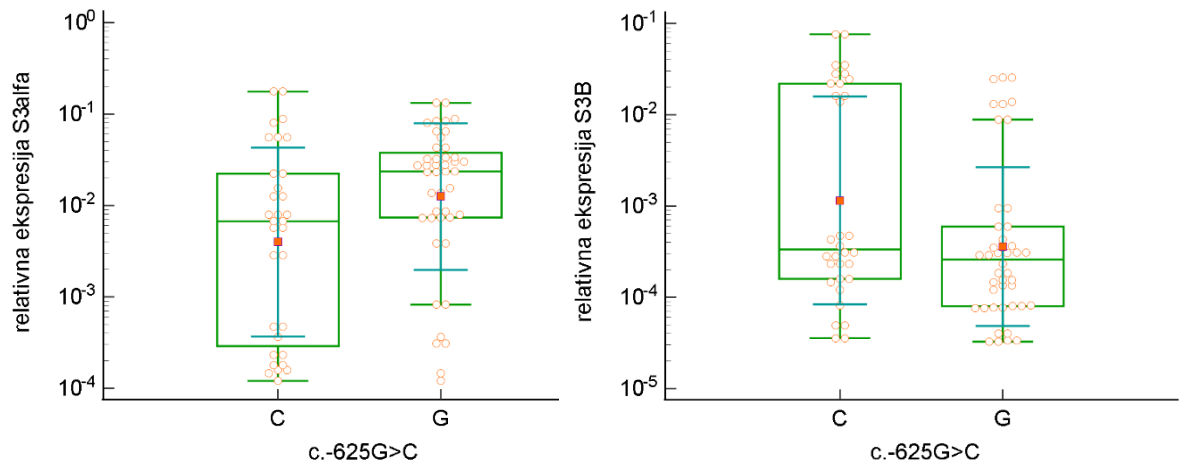
**Slika 5.11.** Povezanost polimorfizma c.-644T>C i relativne ekspresije izoforme S 3 $\alpha$  u zdravih kontrola na razini a) alela (Mann-Whitney U test) b) genotipova (Kruskal-Wallis test)

U polimorfizmu c.\*148T>C (rs2239680) alel T je statistički značajno više eksprimiran u izoformi divljega tipa (wt), (slika 5.12.).



**Slika 5.12.** Povezanost polimorfizma c.\*148T>C i relativne ekspresije izoforme S wt u zdravih kontrola (Mann-Whitney U test)

Najveća statistički značajna povezanost na razini alela i pojedinih izoformi u zdravih kontrola primijećena je kod polimorfizma c.-625G>C (rs8073069) i izoforme S 3 $\alpha$  i izoforme S 3B, slika 5.13.



**Slika 5.13.** Povezanost polimorfizma c.-625G>C i relativne ekspresije izoforme a) S 3 $\alpha$  i b) S 3B u zdravih kontrola (Mann-Whitney U test)

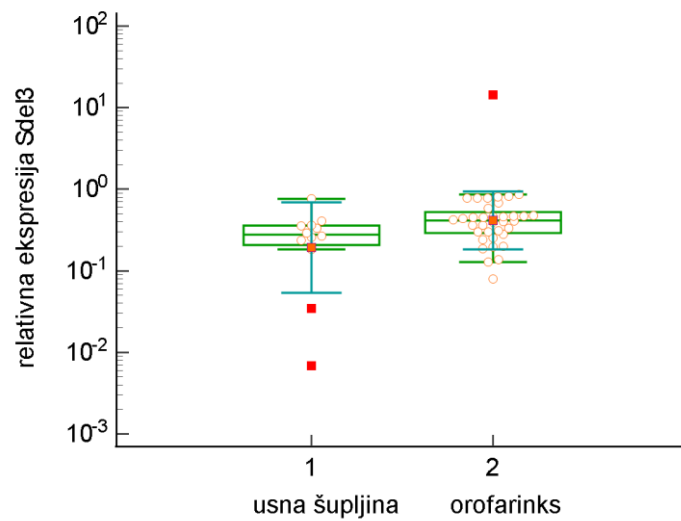
### 5.5. Povezanost ekspresijskih obrazaca s kliničko-patološkim parametrima

Uspoređeni su ekspresijski obrasci pojedinih izoformi s kliničko patološkim parametrima: spolom, dobi, statusom pušenja, veličinom primarnog tumora, pozitivnim regionalnim limfnim čvorovima, kliničkim i patološkim TNM i Brodersovim gradusom.

Analizom relativnih ekspresija izoformi u odnosu na spol nađena je statistički značajno povećana ekspresija izoforme S 3B ( $P = 0,037$ ) kod muškaraca u odnosu na žene, a kod zdravih kontrola su izoforme S 2 $\alpha$  ( $P = 0,044$ ) i S 2B ( $P = 0,040$ ) bile pojačano eksprimirane kod žena.

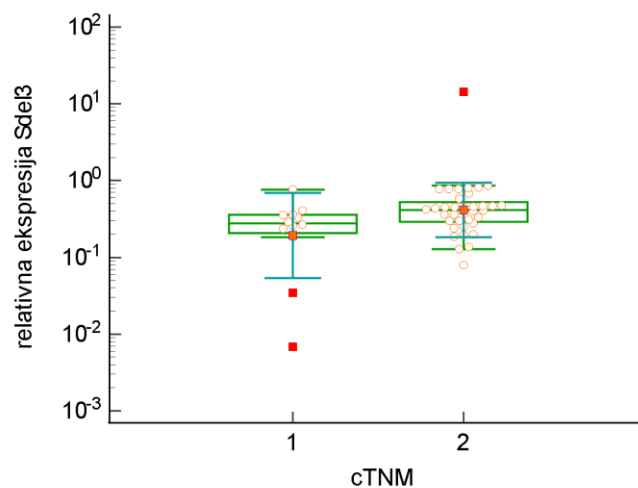
Ekspresija izoformi S wt ( $P = 0,040$ ), S 2 $\alpha$  ( $P = 0,014$ ), S  $\Delta$ ex3 ( $P = 0,009$ ) statistički značajno je pojačano eksprimirana u bolesnika pušača, dok kod pušača u zdravih kontrolama nije pronađena statistički značajna razlika.

Nadalje, nađena je statistički značajna povezanost između relativne ekspresije izoforme S  $\Delta$ ex3 i sijela primarnog tumora. Izoforma S  $\Delta$ ex3 bila je jače eksprimirana kod tumora orofarinksa u odnosu na tumor usne šupljine (slika 5.14.).



**Slika 5.14.** Povezanost ekspresije izoforme S  $\Delta$ ex3 i tumorskog sijela (Mann-Whitney U test)

Također ista izoforma (S  $\Delta$ ex3) pojačano je eksprimirana kod klinički uznapredovalijih tumora III. i IV. stadija, slika 5.15.



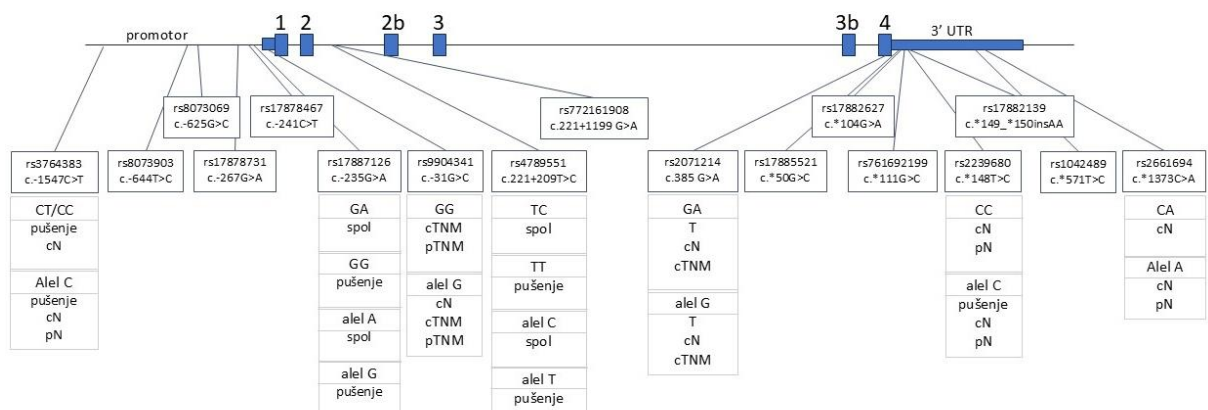
**Slika 5.15.** Povezanost ekspresije izoforme S  $\Delta$ ex3 i kliničkog TNM stadija, 1- rani stadij I i II, 2- kasni stadij III i IV, (Mann-Whitney U test)



### 5.6. Povezanost polimorfizama s kliničko patološkim parametrima

Kliničko-patološki nalazi (dob pri postavljanju dijagnoze, spol, pušački status, mjesto tumora, veličina tumora, klinički i patološki status limfnih čvorova, klinički i patološki TNM status i Brodersov status) uspoređeni su s jedanaest SNP-ova s MAF > 5 %. Svi polimorfizmi shematski su prikazani na Slici 5.16.

**Slika 5.16.** Shematski prikaz polimorfizama i povezanosti s kliničko patološkim parametrima



Nađeno je da polimorfizmi *BIRC5* nisu bili povezani s dobi, a samo slabo su bili povezani s mjestom primarnog tumora i Brodersovim statusom. Četiri polimorfizma (c.-644T>C, c.-625G>C, c.-241C>T, c.\*571T>C) nisu bila povezana ili su bila slabo povezana s bilo kojim kliničko-patološkim nalazima ( $P = 0,057$ ).

Prema **spolnoj razdiobi** dva su polimorfizma bila značajno češća u bolesnicima i to rjeđi A alel ( $P = 0,039$ ), i heterozigotni GA genotip ( $P = 0,033$ ) od rs17887126 (c.-235G>A) i rjeđi C alel ( $P = 0,024$ ) i heterozigotni TC genotip ( $P = 0,020$ ) od rs4789551 (c.221+209T>C) (tablica 5.13.).

Kod zdravih ispitanika nije nađena razlika u polimorfizmima među spolovima.

**Tablica 5.13.** Povezanost polimorfizama u odnosu na spol kod bolesnika (hi-kvadrat test)

polimorfizam	genotip alel	spol				P*	
		muški		ženski			
<b>c.-235G&gt;A</b>	GG	38	92,7%	4	57,1%	<b>0,033</b>	
	GA	3	7,3%	3	42,9%		
	AA	0	0,0%	0	0,0%		
	G	79	96,3%	11	78,6%		<b>0,039</b>
	A	3	3,7%	3	21,4%		
<b>c.221+209T&gt;C</b>	TT	37	94,9%	4	57,1%	<b>0,020</b>	
	TC	2	5,1%	3	42,9%		
	CC	0	0,0%	0	0,0%		
	T	76	97,4%	11	78,6%		<b>0,024</b>
	C	2	2,6%	3	21,4%		

\*hi-kvadrat test

S pušenjem su značajno povezana četiri polimorfizma, a još su dva slabije povezana: rjeđi C alel ( $P = 0,017$ ), te CT i CC genotipovi ( $P = 0,042$ ) polimorfizma rs3764383 (c.-1547C>T); češći G alel ( $P = 0,025$ ) i glavni GG genotip ( $P = 0,020$ ) polimorfizma rs17887126 (c.-235G>A); glavni T alel ( $P = 0,015$ ) i glavni TT genotip ( $P = 0,012$ ) polimorfizma rs4789551 (c.221+209T>C); rjeđi alel C ( $P = 0,032$ ) polimorfizma rs2239680 (c.\*148T>C). Sporedni genotipovi TC i CC polimorfizma rs2239680 (c.\*148T>C) bili su slabo povezani s pušenjem ( $P = 0,055$ ), kao i glavni G alel polimorfizma rs9904341 i sporedni alel A i genotipovi CA i AA polimorfizma rs2661694 (c.\*1373C>A) (tablica 5.14.).

Kod zdravih kontrola pronađena je statistički značajna razlika povezanosti pušenja i samo jednog polimorfizma c.-235G>A na razini genotipa ( $P = 0,016$ ) i alela ( $P = 0,017$ ).

**Tablica 5.14.** Povezanost polimorfizama u skupini bolesnika s pušenjem

polimorfizam	genotip alel	pušenje				P*
		ne		da		
<b>c.-1547C&gt;T</b>	TT	6	100,0%	18	45,0%	<b>0,042</b>
	CT	0	0,0%	<b>18</b>	45,0%	
	CC	0	0,0%	<b>4</b>	10,0%	
	T	12	100,0%	54	67,5%	<b>0,017</b>
	C	0	0,0%	<b>26</b>	32,5%	
<b>c.-235G&gt;A</b>	GG	3	50,0%	<b>39</b>	92,9%	<b>0,020</b>
	GA	3	50,0%	3	7,1%	
	AA	0	0,0%	0	0,0%	
	G	9	75,0%	<b>81</b>	96,4%	<b>0,025</b>
	A	3	25,0%	3	3,6%	
<b>c.221+209T&gt;C</b>	TT	3	50,0%	<b>38</b>	95,0%	<b>0,012</b>
	TC	3	50,0%	2	5,0%	
	CC	0	0,0%	0	0,0%	
	T	9	75,0%	<b>78</b>	97,5%	<b>0,015</b>
	C	3	25,0%	2	2,5%	
<b>c.*148T&gt;C</b>	TT	6	100,0%	20	47,6%	0,055
	TC	0	0,0%	19	45,2%	
	CC	0	0,0%	3	7,1%	
	T	12	100,0%	59	70,2%	<b>0,032</b>
	C	0	0,0%	<b>25</b>	29,8%	

\*hi-kvadrat test

Polimorfizam (c.-235G>A) granično je povezan s primarnim sijelom - usnom šupljinom i na razini genotipa (P = 0,077) i na razini alela (P = 0,086).

S veličinom primarnog tumora (T) povezan je polimorfizam rs2071214 (c.385G>A). Rjeđi G alel (P = 0,018) i heterozigotni GA genotip (P = 0,015) pojavljuju se samo u tumorima manjim od 4 cm, tablica 5.15.

**Tablica 5.15.** Povezanost polimorfizma c.385G>A s veličinom primarnog tumora (T)

polimorfizam	genotip alel	tumor (T)				P*
		1 i 2		3 i 4		
<b>c.385G&gt;A</b>	AA	17	77,3%	26	100,0%	<b>0,015</b>
	GA	<b>5</b>	22,7%	0	0,0%	
	GG	0	0,0%	0	0,0%	
	A	39	88,6%	52	100,0%	<b>0,018</b>
	G	<b>5</b>	11,4%	0	0,0%	

\*hi-kvadrat test

## 5. REZULTATI

Pet polimorfizama (c.-1547C>T, c.-31G>C, c.\*148T>C, c.385G>A, c.\*1373C>A) statistički je značajno povezano s kliničkim i patološkim stanjem limfnih čvorova (cN i pN, Tablica 5.16.) i TNM statusom (cTNM i pTNM), a jedan je (rs17887126) slabo povezan sa statusom limfnih čvorova. Tri su bila povezana samo sa statusom limfnih čvorova, a dva i sa statusom limfnih čvorova i TNM statusom.

**Tablica 5.16.** Povezanost polimorfizama i statusa limfnih čvorova vrata, kliničkih (cN) ili patoloških (pN)

polimorfizam	genotip alel	čvor (cN)				P*	čvor (pN)				P*
		0		1+2+3			0		1+2+3		
<b>c.-1547C&gt;T</b>	TT	14	73,7%	10	37,0%	<b>0,050</b>	11	73,3%	13	41,9%	<i>0,094</i>
	CT	4	21,1%	<b>14</b>	51,9%		4	26,7%	14	45,2%	
	CC	1	5,3%	<b>3</b>	11,1%		0	0,0%	4	12,9%	
	T	32	84,2%	34	63,0%	<b>0,034</b>	26	86,7%	40	64,5%	<b>0,029</b>
	C	6	15,8%	<b>20</b>	37,0%		4	13,3%	<b>22</b>	35,5%	
<b>c.*148T&gt;C</b>	TT	16	80,0%	10	35,7%	<b>0,008</b>	13	81,3%	13	40,6%	<b>0,025</b>
	TC	4	20,0%	15	53,6%		3	18,8%	16	50,0%	
	CC	0	0,0%	<b>3</b>	10,7%		0	0,0%	<b>3</b>	9,4%	
	C	4	10,0%	<b>21</b>	37,5%	<b>0,002</b>	3	9,4%	<b>22</b>	34,4%	<b>0,012</b>
	T	36	90,0%	35	62,5%		29	90,6%	42	65,6%	
<b>c.*1373C&gt;A</b>	CC	16	80,0%	12	42,9%	<b>0,034</b>	13	81,3%	15	46,9%	0,071
	CA	4	20,0%	<b>15</b>	53,6%		3	18,8%	16	50,0%	
	AA	0	0,0%	1	3,6%		0	0,0%	1	3,1%	
	A	4	10,0%	<b>17</b>	30,4%	<b>0,023</b>	3	9,4%	<b>18</b>	28,1%	<b>0,040</b>
	C	36	90,0%	39	69,6%		29	90,6%	46	71,9%	
<b>c.-31G&gt;C</b>	GG	6	31,6%	15	55,6%	0,100					
	GC	9	47,4%	11	40,7%						
	CC	4	21,1%	1	3,7%						
	C	17	44,7%	13	24,1%	<b>0,045</b>					
	G	21	55,3%	<b>41</b>	75,9%						
<b>c.385G&gt;A</b>	AA	15	75,0%	28	100,0%	<b>0,009</b>					
	GA	5	25,0%	0	0,0%						
	GG	0	0,0%	0	0,0%						
	A	35	87,5%	<b>56</b>	100,0%	<b>0,011</b>					
	G	5	12,5%	0	0,0%						

\*hi-kvadrat test

Rs3764383 (c.-1547C>T), rs2239680 (c.\*148T>C) i rs2661694 (c.\*1373C>A) statistički su povezani s kliničkim (cN) i patološkim statusom limfnih čvorova (pN). Rjeđi alel C polimorfizma c.-1547C>T bio je povezan s pozitivnim kliničkim limfnim čvorovima (cN, P =

## 5. REZULTATI

0,034) i patološkim limfnim čvorovima (pN, P = 0,029), dok su genotipovi CC i CT bili povezani s cN (P = 0,050) i slabo povezani s pN (P = 0,094). Rjeđi C alel polimorfizma c.\*148T>C povezan je s kliničkim cN (P = 0,002) i patološkim limfnim čvorovima, pN (P = 0,012) i homozigotni CC genotip (cN P = 0,008, pN P = 0,025) c.\*148T>C bili su povezani s pozitivnim limfnim čvorovima. Rjeđi alel A polimorfizma c.\*1373C>A bio je povezan s pozitivnim limfnim čvorovima (cN P = 0,023, pN P = 0,040), dok su genotipovi AA i CA bili povezani s cN (P = 0,034) i slabo povezani s pN (P = 0,071).

Rs9904341 (c.-31G>C) i rs2071214 (c.385G>A) su statistički značajno povezani sa statusom limfnih čvorova i TNM statusom, Tablica 5.17. Češći G alel polimorfizma c.-31G>C bio je povezan s pozitivnim cN (P = 0,045) i višim cTMN (P = 0,004) i pTNM (P = 0,006), dok je homozigotni genotip GG bio povezan s višim cTMN (P = 0,010) i pTNM (P = 0,013). Rjeđi G alel polimorfizma c.385G>A bio je povezan s negativnim cN (P = 0,011) i nižim cTMN (P = 0,001) i slabo povezan s nižim pTNM (P = 0,059). Heterozigotni GA genotip bio je povezan s negativnim cN (P = 0,009) i nižim cTMN (P = 0,0005) te slabo povezan s nižim pTNM (P = 0,054).

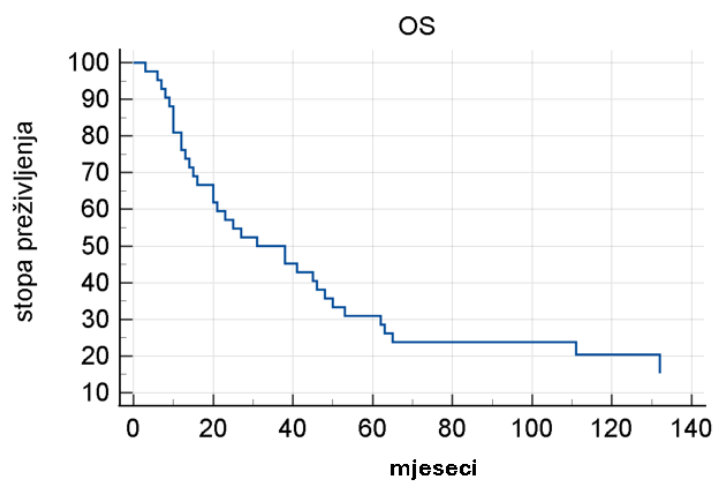
**Tablica 5.17.** Povezanost polimorfizama i kliničkog (cTNM) i patološkog (pTNM) stadija bolesti

polimorfizam	genotip alel	klinički (cTNM)				P*	patološki (pTNM)				P*
		I i II		III i IV			I i II		III i IV		
c.-31G>C	GG	1	9,1%	20	57,1%	<b>0,010</b>	1	10,0%	20	55,6%	<b>0,013</b>
	GC	7	63,6%	13	37,1%		6	60,0%	14	38,9%	
	CC	3	27,3%	2	5,7%		3	30,0%	2	5,6%	
	C	13	59,1%	17	24,3%	<b>0,004</b>	12	60,0%	18	25,0%	<b>0,006</b>
	G	9	40,9%	53	75,7%		8	40,0%	54	75,0%	
c.385G>A	AA	7	58,3%	36	100,0%	<b>0,0005</b>	7	70,0%	36	94,7%	0,054
	GA	5	41,7%	0	0,0%		3	30,0%	2	5,3%	
	GG	0	0,0%	0	0,0%		0	0,0%	0	0,0%	
	A	19	79,2%	72	100,0%	<b>0,001</b>	17	85,0%	74	97,4%	0,059
	G	5	20,8%	0	0,0%		3	15,0%	2	2,6%	

\*hi-kvadrat test

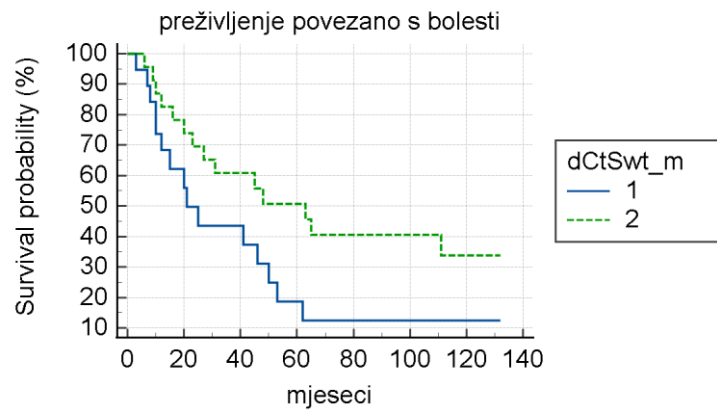
### 5.7. Povezanost ekspresijskih obrazaca i polimorfizama s preživljenjem

U ovom ispitivanju osim kliničko patoloških parametara ispitivane su i ovisnosti pojavnosti određenih polimorfizama i ekspresijskih obrazaca i vremenskih perioda praćenja i ishoda, tj. sveukupno preživljenje (engl. OS - *overall survival*) i preživljenje povezano s bolesti (engl. DSS - *disease specific survival*). Usporedbom vremena sveukupnog preživljenja nije pronađena statistički značajna razlika nakon usporedbe s nađenim polimorfizmima niti nakon usporedbe s razinama relativnih ekspresija izoformi, slika 5.17.



**Slika 5.17.** Prikaz sveukupnog preživljenja (OS) za ispitivanu skupinu bolesnika (Kaplan-Meierova krivulja preživljenja)

Usporedbom polimorfizama i ekspresijskih obrazaca izoformi s preživljenjem specifičnim za bolest nađena je statistički značajna razlika samo kod izoforme S wt, pri čemu je niža razina ekspresije izoforme S wt povezana s lošijim preživljenjem, slika 5.18.



**Slika 5.18.** Povezanost ekspresije izoforme S wt i preživljenja povezanog s bolesti

## 6. RASPRAVA

Planoelularni karcinomi usne šupljine i orofarinska predstavljaju dva najčešća sjela tumora glave i vrata (HNSCC), pri čemu se karcinom usne šupljine svrstava na četrnaesto, a karcinom orofarinksa na dvadeset i četvrto mjesto na ljestvici ukupnih tumorskih sjela (2,4). Kirurška resekcija tumora s ili bez disekcije vrata standard je liječenja karcinoma usne šupljine, dok se kod liječenja karcinoma orofarinksa jednako vrijedno koriste radikalna kirurška resekcija i radioterapija, odnosno kemoiradijacija. Unatoč napretku i dijagnostičkih i terapijskih algoritama zabrinjava podatak da se stopa petogodišnjeg preživljenja za sve stadije nije značajno promijenila zadnjih četrdesetak godina i ona iznosi oko 60 %. Jedan od potencijalnih uspjeha liječenja možda leži u pronalaženju ciljanih molekularnih biomarkera kojim ćemo moći ne samo predvidjeti klinički tijek i agresivnost tumora, nego i djelovati terapijski na sprečavanje širenja i suzbijanje raka. Potencijalna primjena molekularnih biomarkera omogućavala bi stoga preciznije predviđanje ishoda bolesti i personalizirani pristup liječenju s ciljem poboljšanja kvalitete života pacijenata i njegova produženja.

Nedavna istraživanja sugeriraju da karcinogeneza tumora glave i vrata uključuje nakupljanje mutacija ili epigenetskih promjena u genima koje nastaju kao posljedica štetnih učinaka okolišnih čimbenika poput pušenja duhana i konzumacije alkohlnih pića kod osjetljivih pojedinaca (82,84). Izloženost istim okolišnim čimbenicima kod različitih osoba rezultira različitim kliničkim prikazima i različitom osjetljivošću na HNSCC, što sugerira da genetske varijacije mogu biti ključni čimbenik rizika za razvoj HNSCC-a (113). Procesi karcinogeneze u HNSCC-ima uključuju poremećaje i deregulacije različitih putova, uključujući popravak DNK, metabolizam karcinogena, stanični ciklus, imunitet i upalu. Polimorfizmi gena uključenih u ove putove mogu igrati važnu ulogu u razvoju HNSCC-a putem promjena u aktivaciji i funkciji srodnih proteina (82,113).

Gen *BIRC5* i njegov proteinski produkt survivin predstavljaju potencijalno idealnu metu za daljnja istraživanja s obzirom da je njegova ekspresija prisutna samo u embrionalnom tkivu i tkivima koja se pojačano dijele, kakvo je tumorsko (95). Prisutnost genskog polimorfizama i određivanje ekspresije izoformi gena *BIRC5* mogli bi se koristiti kao biomarker agresivnosti



primarnog tumora ili prognostički čimbenik ishoda liječenja ili odgovora na terapiju u planocelularnim karcinomima usne šupljine i orofarinksa.

Stoga ovo istraživanje polazi od pretpostavke da je povećana ekspresija izoformi gena *BIRC5* povezana s lošijim preživljenjem i lošijom prognozom kod pacijenata oboljelih od planocelularnog karcinoma usne šupljine i orofarinksa. Također smo istraživali i pojavnost polimorfizama gena *BIRC5* kako u tumorskom tkivu, tako i u sluznici zdravih ispitanika te njihov međusobni utjecaj na ekspresiju izoformi.

### 6.1. Ekspresija izoformi gena *BIRC5* u tumorskom i zdravom tkivu

Relativna razina ekspresije osam najčešćih izoformi gena *BIRC5* (S wt, S 2 $\alpha$ , S 2B, S 3 $\alpha$ , S 3B, S  $\Delta$ ex3, S 3  $\gamma$ M i S 3 $\gamma$ V) određena je metodom q-PCR u 48 uzoraka tkiva pacijenata oboljelih od planocelularnog karcinoma usne šupljine i orofarinksa i 39 uzoraka tkiva zdrave sluznice kontrolnih ispitanika. Najčešće proučavane izoforme u tumorima glave i vrata su S wt, S 2 $\alpha$ , S 2B i S 3 $\alpha$  (105). Survivin wt i S 3 $\alpha$  imaju dominantno antiapoptotsku funkciju (96), a za izoforme S 2 $\alpha$  i S 2B smatra se da imaju proapoptotsku funkciju.

Analiza dobivenih rezultata pokazala je da su i u tumorskim uzorcima i u zdravim kontrolama najjače eksprimirane izoforme S wt, S 2 $\alpha$  i S 2B, zatim S  $\Delta$ ex3, S 3 $\alpha$ , S 3B, dok su najslabije eksprimirane izoforme S 3 $\gamma$ M i S 3 $\gamma$ V. U tumorskim uzorcima izoforme S wt, S 2 $\alpha$ , S 2B, S 3 $\alpha$  bile su eksprimirane u 100 % uzoraka, dok je izoforma S 3B bila eksprimirana u 86,66 % uzorka, S  $\Delta$ ex3 u 95,55 % uzoraka, S 3 $\gamma$ M 68,88 % uzoraka, a izoforma S 3 $\gamma$ V u tek 46,66 % uzoraka. Slične rezultate objavili su Koike i suradnici (2008.) koji su na karcinomima prostate pokazali da je najjača ekspresija izoformi S wt, S 2 $\alpha$  i S 2B, a nešto manja S  $\Delta$ ex3 (114). Nadalje, Trnski i suradnici (2019.) pronašli su da je u staničnim linijama (SKOV-3 OC) karcinoma ovarija najjača izraženost izoformi S 2 $\alpha$  i S wt, nešto slabija je ekspresija izoformi S  $\Delta$ ex3 i S 3B, a najslabije izražena je bila izoforma S 2B (115). S druge strane u istraživanju Vincetić (2020.) napravljenom na karcinomima dojke najjače su bile eksprimirane izoforme S 2 $\alpha$  i S wt, zatim izoforme S  $\Delta$ ex3, S 3B, S 2B i S 3 $\alpha$ , a najmanje izoforme S 3 $\gamma$ M i S 3 $\gamma$ V (116).

Iako je inicijalno većina autora navodila da je ekspresija survivina rezervirana za embrionalna tkiva i tkiva koja se pojačano dijele te da je u diferenciranim tkivima odraslih nema (94,117), posljednjih godina otkriveno je da je i u zdravim tkivima također prisutna ekspresija nekih izoformi s manjim relativnim omjerima u odnosu na tumorska tkiva pa tako Warriier i suradnici i Lodi i suradnici bilježe ekspresiju izoformi survivina i u zdravim diferenciranim tkivima odraslih osoba (105,118,119). Rezultati ovog istraživanja pokazuju značajno veću ekspresiju ovog gena u bolesnika nego zdravih kontrola što je skladu s rezultatima nedavno objavljenih studija.

Izoforme S wt i S 2 $\alpha$  bile su eksprimirane u sluznici svih zdravih kontrola dok je izoforma S 2B bila eksprimirana u 95,55 % uzoraka. Izoforma S 3 $\alpha$  bila je eksprimirana u 68,88 % uzoraka, izoforma S 3B u 22,22 % uzoraka, izoforma S  $\Delta$ ex3 u 46,66 % uzoraka dok je izoforma S 3 $\gamma$ M bila eksprimirana u samo 2,22 % uzoraka. Jedino nije uočena ekspresija izoforme S 3 $\gamma$ V u sluznicu zdravih kontrola.

Ekspresija izoformi S wt i S 2 $\alpha$  nađena je usvim uzorcima tumorskih tkiva i zdravih kontrola. Ekspresija izoformi S 2B i S 3 $\alpha$  nađena je u svim uzorcima tumora i velikom broju zdravih kontrola. Relativna ekspresija ovih izoformi je prosječno 2,39 puta veća u tumorskom tkivu nego u zdravim kontrolama.

Za izoforme S 3B i S  $\Delta$ ex3, koje su eksprimirane u manjem broju uzoraka i na puno nižoj relativnoj razini, uočena je značajno veća razlika u njihovoj ekspresiji između tumorskog tkiva i zdravih kontrola (S 3B 78,36 puta, a S  $\Delta$ ex3 čak 766 puta više). Za obje se smatra da imaju antiapoptotsku funkciju u stanicama, a osim u oralnom karcinomu eksprimirane su i u karcinomima štitnjače (120).

Dvije najmanje eksprimirane izoforme (S 3 $\gamma$ M i S 3 $\gamma$ V) nađene se u 68,88 % i 46,66 % tumorskih uzoraka, dok je ekspresija S 3 $\gamma$ M nađena u samo jednom uzorku zdrave kontrole. Ekspresija S 3 $\gamma$ V nije nađena u zdravim kontrolama, što je u skladu s rezultatima dosad objavljenih istraživanja rađenim u studij Sampath i suradnika i Vincetić (103,116).

## 6.2. Korelacije ekspresije različitih izoformi gena *BIRC5* između tumorskog i zdravog tkiva, kao i s kliničko patološkim obilježjima

U tumorskim uzorcima ekspresije gotovo svih izoformi međusobno pozitivno koreliraju, što znači da rast izoforme jedne skupine prati rast u drugoj. Usporedbom korelacija izoformi u tumorskom tkivu i zdravim kontrolama ustanovljeno je da su u tumorskom tkivu korelacije u ekspresiji izoformi znatno brojnije nego u zdravom tkivu. Pozitivna i značajna povezanost relativnih ekspresija i u tumorskom i u zdravom tkivu bila je prisutna između izoforme S wt sa S 2 $\alpha$  i S 2B, potom S 2 $\alpha$  sa S2B i S 3, te S3B sa S 3 $\gamma$ M. U istraživanju Eckerle i suradnici (2009.) na uzorcima neuroblastoma nađena je također pozitivna korelacija ekspresija S wt i S2B, kao i u ovom istraživanju (121). Nadalje, Trnski i suradnici također opisuju pozitivnu korelaciju izražaja izoformi kod karcinoma jajnika za izoforme S wt, S 2 $\alpha$ , S 2B, S 3B i S  $\Delta$ ex3 (115), a Vincetić opisuje pozitivnu korelaciju većine izoformi u tumorskom tkivu dojke (S wt, S 2 $\alpha$ , S 2B, S 3 $\alpha$  S 3B), dok izoforme u zdravim kontrolama nisu pozitivno korelirale (116). Pavlidou i suradnici (2014.) također su na uzorcima karcinoma dojke ukazali na pozitivnu međusobnu korelaciju između tri izoforme gena *BIRC5*, S 2B, S wt i S  $\Delta$ ex3 (122).

Analizom relativnih ekspresija izoformi u odnosu na spol nađena je statistički značajno povećana ekspresija izoforme S 3B ( $P = 0,037$ ) kod muškaraca u odnosu na žene, dok su kod zdravih kontrola izoforme S 2 $\alpha$  ( $P = 0,044$ ) i S 2B ( $P = 0,040$ ) bile pojačano eksprimirane kod žena.

Ekspresije izoformi S wt ( $P = 0,040$ ), S 2 $\alpha$  ( $P = 0,014$ ), S  $\Delta$ ex3 ( $P = 0,009$ ) statistički značajno su pojačano eksprimirane u bolesnika pušača, dok kod pušača u zdravim kontrolama nije pronađena statistički značajna razlika, što se može tumačiti statistički značajnom razlikom u distribuciji pušača i nepušača unutar ispitivane skupine zdravih kontrola.

Nadalje, nađena je statistički je značajna povezanost između relativne ekspresije izoforme S  $\Delta$ ex3 i sijela primarnog tumora. Izoforma S  $\Delta$ ex3 bila je jače eksprimirana kod tumora orofarinksa u odnosu na tumore usne šupljine. Upravo je izoforma S  $\Delta$ ex3 povezana s agresivnijim varijantama tumora kod kojih je primijećena veća ekspresija (120,123).

### 6.3. Polimorfizmi gena *BIRC5* u bolesnika i zdravih kontrola

Ukupno je pronađeno sedamnaest polimorfizama gena *BIRC5* u DNK 48 uzoraka krvi pacijenata oboljelih od planocelularnog karcinoma usne šupljine i orofarinksa i 45 uzoraka krvi zdrave sluznice kontrolnih ispitanika. Dvanaest polimorfizama pronađeno je kod obje skupine uzoraka, dok su tri polimorfizma pronađena samo u bolesnicima, a dva samo u zdravim kontrolama.

Polimorfizmi rs17878731 (c.-267G>A) i rs17882627 (c.\*104G>A) nađeni su samo u kontrolama, dok su rs2071214 (c.385G>A), rs7885521 (c.\*50G>C) i rs761692199 (c.\*111G>C) pronađeni samo u uzorcima krvi bolesnika.

Statistički značajne promjene u pojavnosti polimorfizama kod pacijenata u odnosu na kontrole, pronađene su u frekvencijama alela kod polimorfizma c.-1547C>T ( $p = 0,0149$ ), u frekvencijama i genotipa i alela kod polimorfizama c.-625G>C i c.\*385G>A, te granično na razini frekvencije genotipa kod polimorfizma c.\*1373C>A.

Dobiveni podatci slični su rezultatima prethodno obavljenih studija. Tako Mehdi i suradnici (2019.) izdvajaju polimorfizam c.-31G>C kao genetski rizik za oralni karcinom (124), a Weng i suradnici (2012.) povezuju pojavnost polimorfizama c.-31G>G, c.385G>A i c.\*571T>C kod tumora glave i vrata (125).

Nadalje, jedanaest SNP-ova s frekvencijom manjeg alela (MAF) > 5% u uzorcima bolesnika i zdravih kontrola odabrano je za analizu neravnoteže povezivanja. Analiza je pokazala da postoje razlike u broju polimorfizama u neravnoteži povezivanja (LD) između uzoraka bolesnika i zdravih kontrola na više lokusa. Ovakva neravnoteža povezivanja često se nalazi u različitim tipovima tumora (115). Uzorci bolesnika pokazali su povećanu neslučajnu povezanost alela kod tri kombinacije alela: rs3764383 (c.-1547C>T) i rs2239680 (c.\*148T>C) (s 0,4 na 0,79), potom rs3764383 (c.-1547C>T) i rs2661694 (c.\*1373C>A) (s 0,43 na 0,7) i rs8073903 (c.-644T>C) i rs1042489 (c.\*571T>C) (s 0,03 na 0,64) koji najviše raste. Prve dvije kombinacije nađene su u studiji Shi i suradnika (126), dok su rs8073903 (c.-644T>C) i rs1042489 (c.\*571T>C) (s 0,03 na 0,64) nađene u studijama autora Sušac i suradnici (127) i Shi i suradnici (126).

U bolesnika neslučajna povezanost alela pada samo u slučaju polimorfizama rs8073903 (c.-644T>C) i rs8073069 (c.-625G>C) gdje  $R^2$  pada (s 0,73 na 0.48).

U zdravim kontrolama su rs2239680 (c.\*148T>C) i rs2661694 (c.\*1373C>A) u potpunoj neravnoteži povezivanja ( $R^2=1$ ), a nešto padaju u bolesnima ( $R^2=0,79$ ), za razliku od Trnski i suradnika gdje su (c.\*148T>C) i (c.\*1373C>A) u karcinomima jajnika imali gotovo jednaku neravnotežu povezivanja i u zdravim i u bolesnim (0,86 i 0,89) (115). Ovakva neravnoteža povezivanja često se nalazi u različitim tipovima tumora (115).

#### **6.4. Povezanost ekspresija izoformi i polimorfizama gena BIRC5**

U ovom istraživanju postoji statistički značajna povezanost između polimorfizama u genu *BIRC5* i ekspresije njegovih pojedinih izoformi. Nađena je povezanost između polimorfizma c.-31G>C i izoforme S 3  $\gamma$ M, polimorfizma c.221+209T>C i izoforme S 3 $\alpha$ , polimorfizma c.385G>A i izoforme S 3 $\gamma$ V, polimorfizma c.\*148T>C i izoforme S 3 $\alpha$  i polimorfizma c.\*571T>C s izoformama S 3 $\gamma$ V i S 3 $\gamma$ M. Kod polimorfizma c.-31G>C rjeđi alel C povezan je s manjom ekspresijom izoforme 3 $\gamma$ M. Homozigotni CC genotip u polimorfizmu c.-31G>C se razlikuje od GG i GC, koji se međusobno ne razlikuju u ekspresiji, u 3  $\gamma$ M izoformi. Nadalje, alel C u polimorfizmu c.221+209T>C ima statistički veću ekspresiju od alela T u izoformi S 3 $\alpha$ . Genotip divljeg tipa TT polimorfizma c.221+209T>C ima statistički značajnije manju ekspresiju od heterozigotnog oblika TC u izoformi S 3 $\alpha$ . U polimorfizmu c.385G>A alel A ima statistički značajno veću ekspresiju od alela G u izoformi S 3 $\gamma$ V. Homozigotni genotip AA u polimorfizmu c.385G>A ima statistički značajno veću ekspresiju u izoformi S3 $\gamma$ V. U polimorfizmu c.\*148T>C alel T je statistički značajno češći u izoformi S 3 $\alpha$ . Genotipovi CC i TC imaju različitu pojavnost od TT u polimorfizmu c.\*148T>C kod izoforme S 3 $\alpha$ . U polimorfizmu c.\*571T>C alel C je statistički češći u izoformi S 3 $\gamma$ V. Homozigotni genotip CC je različiti od TT kod polimorfizma c.\*571T>C u izoformi S 3 $\gamma$ V. U do sada objavljenoj literaturi malo je podataka objavljeno o povezanosti pojedinih ekspresijskih obrazaca izoformi ovog gena s pojavnosću polimorfizama.

Boidot i suradnici, 2009. i Li i suradnici, 2013. objavili su rezultate istraživanja u kojima su ispitivali utjecaj različitih polimorfizama na ukupnu ekspresiju survivina, pri čemu je posebna pažnja posvećena polimorfizmu c.-31G>C (99,128). Također je proučavana povezanost

polimorfizama c.-31G>C i c.\*148T>C s ekspresijom izoformi gena *BIRC5* u kolorektalnom karcinomu, a utvrđeno je da genotip c.\*148T>C korelira s ekspresijom izoforme S 2 $\alpha$  (128,129). Nadalje, nađena je i značajna povezanost između češćih homozigotnih genotipova polimorfizama c.\*148T>C (TT) i c.\*1373C>A (CC) te povišene ekspresije izoformi S 2 $\alpha$  i S 3B u karcinomu jajnika (115).

### 6.5. Povezanost polimorfizama i kliničko-patoloških parametara

Jedanaest polimorfizama s frekvencijom rjeđeg alela (MAF) > 5 % uspoređeno je s kliničko-patološkim nalazima.

Četiri polimorfizma (c.-644T>C, c.-625G>C, c.-241C>T i i c.\*571T>C) nisu pokazala nikakvu ili samo slabu povezanost s kliničko-patološkim nalazima. Sedam polimorfizama pokazalo je značajnu povezanost s jednim ili više kliničko-patoloških nalaza.

Za rs3764383 (c.-1547C>T), rjeđi alel C i rjeđi genotipovi CC i CT pokazali su značajnu korelaciju s pozitivnim statusom limfnih čvorova, a također i s pušenjem. Rjeđi alel T je bio statistički učestaliji kod bolesnika. Unatoč tome što se polimorfizam obično naziva C>T, u svim populacijama navedenim u bazi podataka NCBI SNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) (pristupljeno 27. svibnja 2024.), C je sporedni alel. U nekim se radovima naziva c.-1547A/G i nije povezan s pozitivnim limfnim čvorovima, ali je povezan s lošijim preživljavanjem kod karcinoma pluća nemalih stanica (108) i ranijom dobi pojave raka jajnika i dojke (127,130).

Za polimorfizam c.-625G>C (rs8073069) rjeđi alel C i genotip CC značajno su manje zastupljeni u bolesnicima. Nalazi se u promotorskoj regiji i smatra se da bi mogao mijenjati mjesto vezanja transkripcijskih faktora (131). Wang i suradnici (2019) našli su povezanost alela C s boljim preživljenjem u pacijentima s karcinomom jednjaka (132), kao i Szczyrek u raku pluća (131) gdje je nađeno značajno manje alela C i homozigotnog genotipa CC u bolesnima. Rezultati meta analize povezanosti polimorfizama gena *BIRC5* sa sklonosti razvoju tumora pokazuju značajnu povezanost rs8073069 (c.-625G>C) s povećanim rizikom od tumora gastrointestinalnog trakta i mjehura kod Azijata (133).

Rs17887126 (c.-235G>A) je relativno rijedak polimorfizam i nije zabilježen u nekim azijskim populacijama. Smješten je na veznom mjestu za nekoliko transkripcijskih faktora (127,134). U

ovom je istraživanju u bolesnika utvrđena nešto veća učestalost rjeđeg alela A i heterozigotnog genotipa GA. Slični rezultati nađeni su istraživanjem na uzorcima tumora janika dobivenih od hrvatskih bolesnika (115). Sporedni alel A i heterozigotni genotip GA također su pokazali granično značajnu korelaciju s lokacijom tumora (češće u usnoj šupljini) i višim Brodersovim statusom, ali i negativnim limfnim čvorovima. Osim toga, ovi aleli su bili značajno češći u žena, dok su češći alel G i glavni genotip divljeg tipa GG bili su značajno povezani s pušenjem.

Kod polimorfizma rs9904341 (c.-31G>C), alel G i genotip GG bili su povezani s pozitivnim limfnim čvorovima i višim TNM statusom u ovoj studiji. Ovaj polimorfizam je do sada najviše proučavan *BIRC5* polimorfizam (108) i bio je predmet nekoliko meta analiza (135–137). Povezan je s osjetljivošću za razvoj karcinoma usne šupljine (125), jednjaka (132), kolorektalnog karcinoma (129,138), raka pluća (139) i mokraćnog sustava (106,136,137), preživljenjem oboljelih kod kolorektalnog karcinoma (129) i raka pluća (124). Povezan je i s dobi nastanka tumora kod oboljelih od raka jajnika (130) i prostate (114). Kao i u ovoj studiji, pronađena je povezanost rs9904341 (c.-31G>C) sa stadijem i statusom limfnih čvorova kod raka usne šupljine (140), mokraćnog mjehura (106,136,137), plućnog (141) i kolorektalnog raka (129). No, s druge strane, iako su Aynaci i sur. otkrili da nositelji heterozigotnog GC genotipa imaju niži rizik od razvoja raka pluća, nisu našli nikakvu povezanost sa stadijem tumora, statusom limfnih čvorova ili metastatskim statusom (142). Kawata i suradnici su našli povezanost između ovog polimorfizma s gradusom ili stadijem tumora kod karcinoma mokraćnog mjehura (136,143). Podaci iz literature vrlo su kontradiktorni za ovaj polimorfizam, jer neki radovi navode da je C alel povezan s patološkim čimbenicima, dok drugi navode da je nađena povezanost s G alelom. To se može objasniti činjenicom da je u nekim populacijama učestalost oba alela gotovo jednaka (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) (pristupljeno 27. svibnja 2024.), a u drugim ne (139). Većina se autora slaže da je ovaj polimorfizam bolji prediktor preživljenja u azijskoj populaciji (137).

Polimorfizam rs4789551 (c.221+209T>C) je relativno rijedak polimorfizam koji se nalazi u intronu 2 gena *BIRC5*. U ovoj studiji, rjeđi alel C i heterozigotni genotip TC bili su češći u žena, dok su alel T i glavni genotip TT bili značajno povezani s pušenjem. U literaturi se ovaj polimorfizam povezuje s lošijim preživljenjem kod oboljelih od karcinoma pluća nemalih stanica (108).

Za polimorfizam rs2071214 (c.385G>A, poznat i kao c.9194G>A), rjeđi G alel i heterozigotni AG genotip bili su značajno povezani s manjom veličinom, negativnim limfnim čvorovima i nižim TNM statusom u ovoj studiji. S druge strane, rjeđeg alela G uopće nije bilo u zdravima. To je jedini polimorfizam u ovoj studiji koji bi se mogao povezati sa zaštitnom ulogom. Iako se ovaj polimorfizam obično naziva G>A u svim populacijama navedenim u bazi podataka NCBI SNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) (pristupljeno 27.svibnja 2024.), G je rjeđi alel. Ovaj polimorfizam se obično označavao kao c.9194G>A. Iako Kawata i sur. nisu pronašli korelaciju ovog polimorfizma sa stupnjem ili stadijem tumora, otkrili su da su genotipovi AG i GG povezani sa značajno manjim rizikom od razvoja raka mokraćnog mjehura (143). S druge strane, utvrđeno je da su genotipovi GG i GA povezani s povećanim rizikom od nastanka raka dojke i prostate (144).

Za polimorfizam rs2239680 (c.\*148T>C, poznat i kao c.9386T>C), sporedni C alel i CC genotip bili su povezani s pozitivnim limfnim čvorovima u ovoj studiji. Rjeđi alel C također je bio povezan s pušenjem. U većini prethodnih publikacija, ovaj polimorfizam ima oznaku c.9386T>C. U literaturi se C alel povezuje s povećanim rizikom od nastanka raka pluća (145) i prostate (144), kao i višim stadijem raka pluća (145). S druge strane, glavni T alel je povezan s ranijom dobi početka raka dojke (127).

Za polimorfizam rs2661694 (c.\*1373C>A, poznat i kao c.10611C>A) sporedni alel A i genotipovi AA i CA bili su povezani s pozitivnim limfnim čvorovima u ovoj studiji. AA alel je granično manje prisutan u bolesnima te je bio slabo povezan s pušenjem. Rezultati obavljenih studija pokazuju da ovaj polimorfizam nije dobar prognostički biljeg za rak dojke (131), a nisu pronađene ni statistički značajne povezanosti s osjetljivošću na rak pluća (108), jajnika (115) ili dojke (127).

Usporedbom vremena sveukupnog preživljenja nije pronađena statistički značajna razlika nakon usporedbe s nađenim polimorfizmima niti nakon usporedbe s razinama relativnih ekspresija izoformi.

Usporedbom polimorfizama i ekspresijskih obrazaca izoformi s preživljenjem specifičnim za bolest nađena je statistički značajna razlika samo kod izoforme S wt, pri čemu je niža razina ekspresije izoforme S wt povezana s lošijim preživljenjem. Usporedbom literature Faladt Beding



i suradnici (2022.) došli su do istog zaključka pri čemu je sveukupno preživljenje kod ispitivane skupine oboljelih od pločastog karcinoma pluća i cistadenokarcinoma jajnika bilo bolje u skupini pacijenata s većom ekspresijom Swt (146).

Zaključno, ovo je istraživanje identificiralo ukupno 17 polimorfizama u genu *BIRC5*, od kojih je 11 imalo frekvenciju rjeđih alela (MAF) veću od 5% u karcinomu skvamoznih stanica glave i vrata (HNSCC). Nađeno je da je pet od ovih polimorfizama (c.-1547C>T, c.-31G>C, c.385G>A, c.\*148T>C, c.\*1373C>A) povezano s uznapredovalim kliničkim i patološkim stanjem limfnih čvorova (cN i pN) kao i s višim TNM stadijima (i kliničkim i patološkim). Dobiveni rezultati pokazuju da ovi *BIRC5* polimorfizmi nemaju značajan utjecaj na preživljenje bolesnika te usmjeravaju pažnju na daljnja istraživanja povezana s ekspresijom pojedinih izoformi ovog gena, kao što je izoforma S  $\Delta$ ex3, s progresijom HNSCC-a.

## 7. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- 1) Sve ispitivane izoforme gena *BIRC5* nađene su u tumorskom tkivu s većom učestalošću i razinom ekspresije nego u zdravoj sluznici (kontrola), a najviše su eksprimirane izoforme S wt, S 2 $\alpha$  i S 2B.
- 2) Izoforma S  $\Delta$ ex3 jače je eksprimirana u karcinomima orofarinksa u odnosu na karcinome usne šupljine.
- 3) Izoforma S  $\Delta$ ex3 pojačano je eksprimirana u uznapredovalijim stadijima tumora.
- 4) Izoforma S wt povezana s lošijim preživljenjem.
- 5) Ukupno je pronađeno 17 polimorfizama od kojih 12 u obje skupine ispitanika, dva samo u zdravim kontrolama (c.-267G>A i c.104G>A), a tri samo u skupini bolesnika (c.385G>A, c.50G>C i c.111G>C).
- 6) Polimorfizmi c.-1547C>T, c.-31G>C, c.385G>A, c.\*148T>C i c.\*1373C>A povezani su s veličinom primarnog tumora, kliničkim i patološkim stadijem limfnih čvorova, kao i kliničkim i patološkim TNM stadijem. Ovi polimorfizmi nemaju značajan utjecaj na preživljenje bolesnika.
- 7) Polimorfizmi imaju utjecaj na ekspresiju samo nekoliko izoformi (polimorfizmi c.-31G>C i c.\*571T>C na izoformu S 3  $\gamma$ M, polimorfizmi c.221+209T>C i c.\*148T>C na izoformu S 3 $\alpha$ , c.385G>A i c.\*571T>C na izoformu S 3 $\gamma$ V).
- 8) Ovo istraživanje daje značajan znanstveni doprinos razumijevanju molekularne osnove nastanka karcinoma orofarinksa i karcinoma usne šupljine budući da do sada nisu objavljeni podaci o rezultatima određivanja korelacije polimorfizama gena *BIRC5* i ekspresije izoformi u pločastim karcinomima usne šupljine i orofarinksa te je dobra osnova za daljnja znanstvena istraživanja ove problematike.

## 8. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Odrediti ekspresiju različitih izoformi gena *BIRC5* u tumorskom tkivu pacijenata s pločastim karcinomom usne šupljine i orofarinksa u usporedbi s tkivom zdravih kontrola. Odrediti polimorfizme gena *BIRC5* iz uzoraka krvi bolesnika i zdravih kontrola, te usporediti njihove korelacije kao i korelacije s kliničko patohistološkim parametrima.

**Nacrt studije:** Istraživanje je postavljeno kao retrospektivna studija.

**Ispitanici i metode:** U istraživanje su uključeni bolesnici kod kojih je patohistološki potvrđen pločasti karcinom usne šupljine i orofarinksa. Kao kontrolna skupina korišteni su uzorci bukalne sluznice i periferne krvi pacijenata koji su liječeni na Zavodu za maksilofacijalnu i oralnu kirurgiju, zbog neke druge nemaligne bolesti. Iz krvi je izolirana genomska DNK za analizu polimorfizama metodama PCR, analizom heterodupleksa i sekvenciranjem, a ekspresije izoformi određivane su metodom qPCR iz ukupne RNK tumorskih uzoraka i uzoraka zdrave sluznice.

**Rezultati:** Ukupno je ispitivano osam izoformi gena *BIRC5* čije su relativne ekspresije pronađene i u tumorskom tkivu kao i u uzorcima zdravih kontrola. Sve izoforme statistički značajnije su izraženije u tumorskom tkivu, s tim da su najizraženije izoforme S wt, S 2 $\alpha$  i S 2B. U usporedbi s kliničko-patološkim parametrima statistički značajnom pokazala se je relativna ekspresija izoforme S  $\Delta$ ex3 u orofaringealnih sijela, kao i kod uznapredovalijih kliničkih stadija (III. i IV.) oba tumorska sijela. Nadalje, nađeno je ukupno 17 polimorfizama, od kojih se 11 pojavilo u tumorima usne šupljine i orofarinksa s učestalošću rjeđih alela (MAF) većom od 5%. Pet polimorfizama (c.-1547C>T, c.-31G>C, c.385G>A, c.\*148T>C, c.\*1373C>A) značajno je povezano s veličinom tumora, stadijem tumora i pozitivnim limfnim čvorovima.

**Zaključak:** Survivin, proteinski produkt gena *BIRC5*, potencijalni je biomarker agresivnosti ili pokazatelja ishoda liječenja kod oboljelih od pločastog karcinoma usne šupljine i orofarinksa. Sve izoforme survivina jače su eksprimirane u tumorskim tkivima, a njihova se ekspresija uglavnom ne može povezati s kliničko patološkim parametrima, osim izoforme S  $\Delta$ ex3. Rezultati pokazuju da ovi *BIRC5* polimorfizmi nemaju značajan utjecaj na preživljenje

bolesnika te usmjeravaju pažnju na daljnja istraživanja povezana s ekspresijom pojedinih izoformi ovog gena, kao što je izoforma S  $\Delta$ ex3, s progresijom HNSCC-a.

**Ključne riječi:** pločasti karcinom glave i vrata, survivin, ekspresija gena, izoforme RNK, polimorfizmi *BIRC5* gena, izoforme, tumorski biomarkeri;

## 9. SUMMARY

### **Prognostic significance of gene *BIRC5* polymorphisms and expressions of isoforms in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma**

**Objectives:** To determine the expression of different isoforms of the gene *BIRC5* in the tumor tissue of patients with oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma compared to the tissue of healthy controls. To determine gene *BIRC5* polymorphisms from blood samples of patients and healthy controls, and to compare their correlations as well as correlations with clinical pathohistological parameters.

**Study design:** The research was designed as a retrospective study.

**Participants and methods:** The study included patients with pathohistologically confirmed oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. As a control group, samples of buccal mucosa and peripheral blood of patients who were treated at the Department of Maxillofacial and Oral Surgery for some other non-malignant diseases were used. Genomic DNA was isolated from blood for analysis of polymorphisms by PCR, heteroduplex analysis and sequencing, and isoform expressions were determined by qPCR from total RNA of tumor samples and samples of healthy mucosa.

**Results:** A total of eight isoforms of the *BIRC5* gene were examined, whose relative expressions were found both in tumor tissue and in healthy control samples. All isoforms are statistically significantly more expressed in tumor tissue, with the most expressed isoforms being S wt, S 2 $\alpha$  and S 2B. In comparison with the clinical and pathological parameters, the relative expression of the S  $\Delta$ ex3 isoform in oropharyngeal lesions, as well as in advanced clinical stages (III and IV) of both tumor lesions, was statistically significant. Furthermore, a total of 17 polymorphisms were found, of which 11 appeared in tumors of the oral cavity and oropharynx with a minor allele frequency (MAF) greater than 5%.

**Conclusion:** Survivin, the protein product of the *BIRC5* gene, is a potential biomarker of aggressiveness or an indicator of the outcome of treatment in patients with oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. All isoforms of survivin are more strongly expressed

in tumor tissues, and their expression generally cannot be correlate with clinical-pathological parameters, except isoform S  $\Delta$ ex3. Five polymorphisms (c.-1547C>T, c.-31G>C, c.385G>A, c.\*148T>C, c.\*1373C>A) were significantly associated with tumor size, tumor stage and positive lymph nodes . The results show that these *BIRC5* polymorphisms do not have a significant impact on patient survival and suggest for further research related to the expression of individual isoforms of this gene, such as the S  $\Delta$ ex3 isoform, with the progression of HNSCC.

**Key words:** head and neck squamous cell carcinoma, survivin, gene expression, RNA isoforms, *BIRC5* gene polymorphisms, isoforms, tumor biomarkers;

**10. LITERATURA**

1. Johnson DE, Burtneß B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR. Head and neck squamous cell carcinoma. Vol. 6, Nature Reviews Disease Primers. Nature Research; 2020.
2. Wise-Draper TM, Draper DJ, Gutkind JS, Molinolo AA, Wikenheiser-Brokamp KA, Wells SI. Future directions and treatment strategies for head and neck squamous cell carcinomas. *Translational Research*. 2012 Sep;160(3):167–77.
3. Cramer JD, Burtneß B, Le QT, Ferris RL. The changing therapeutic landscape of head and neck cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019 Nov 12;16(11):669–83.
4. 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 May 4;71(3):209–49.
5. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin*. 2021 Jan 12;71(1):7–33.
6. [https://ecis.jrc.ec.europa.eu/explorer.php?%0-0%1-AE27%4-1%20%3-All%6-0,%20%5-2022,%2022%7-7%2-All%CEstByCancer%X0\\_8-3%CEstRelativeCanc%X1\\_8-3%X1\\_9-AE27%CEstBySexByCancer%X2\\_8-3%X2\\_-1-1](https://ecis.jrc.ec.europa.eu/explorer.php?%0-0%1-AE27%4-1%20%3-All%6-0,%20%5-2022,%2022%7-7%2-All%CEstByCancer%X0_8-3%CEstRelativeCanc%X1_8-3%X1_9-AE27%CEstBySexByCancer%X2_8-3%X2_-1-1). European cancer information system (pristupljeno 5.1.2024).
7. Dotiwala AK, Samra NS. *Anatomy, Head and Neck, Tongue*. 2023.
8. <https://www.shutterstock.com/image-illustration/anatomy-mouth-digital-illustration-636022079>. <https://www.shutterstock.com/image-illustration/anatomy-mouth-digital-illustration-636022079>.
9. Montero PH, Patel SG. Cancer of the Oral Cavity. *Surg Oncol Clin N Am*. 2015 Jul;24(3):491–508.
10. Hrvatska enciklopedija L zavod MK. usna šupljina. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2013. – 2024. Pristupljeno 8.6.2024. <<https://www.enciklopedija.hr/clanak/usna-supljina>>.

11. Noguti J, De Moura CFG, De Jesus GPP, Da Silva VHP, Hossaka TA, Oshima CTF, et al. Metastasis from oral cancer: an overview. *Cancer Genomics Proteomics*. 2012;9(5):329–35.
12. Iwanaga J, Lofton C, He P, Dumont AS, Tubbs RS. Lymphatic System of the Head and Neck. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2021 Jul;32(5):1901–5.
13. Anatomie des lymphatiques de l’homme. *J Am Med Assoc*. 1932 Nov 12;99(20):1716.
14. Chong V. Cervical lymphadenopathy: what radiologists need to know. *Cancer Imaging*. 2004;4(2):116–20.
15. Robbins KT, Medina JE, Wolfe GT, Levine PA, Sessions RB, Pruet CW. Standardizing Neck Dissection Terminology: Official Report of the Academy’s Committee for Head and Neck Surgery and Oncology. *Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery*. 1991 Jun 1;117(6):601–5.
16. Robbins KT, Clayman G, Levine PA, Medina J, Sessions R, Shaha A, et al. Neck Dissection Classification Update. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2002 Jul 1;128(7):751.
17. Globocan crude incidence rate of oral cancer worldwide; <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/cancers/1-lip-oral-cavity-fact-sheet.pdf>.
18. Hashibe M, Brennan P, Chuang S chun, 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 Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2009 Feb 1;18(2):541–50.
19. Badwelan M, Muaddi H, Ahmed A, Lee KT, Tran SD. Oral Squamous Cell Carcinoma and Concomitant Primary Tumors, What Do We Know? A Review of the Literature. *Current Oncology*. 2023 Mar 27;30(4):3721–34.
20. Rhodus NL, Kerr AR, Patel K. Oral Cancer. *Dent Clin North Am*. 2014 Apr;58(2):315–40.



21. León X, Venegas M del P, Orús C, López M, García J, Quer M. Influence of the persistence of tobacco and alcohol use in the appearance of second neoplasm in patients with a head and neck cancer. A case–control study. *Cancer Causes & Control*. 2009 Jul 6;20(5):645–52.
22. Hyodo T, Kuribayashi N, Fukumoto C, Komiyama Y, Shiraishi R, Kamimura R, et al. The mutational spectrum in whole exon of p53 in oral squamous cell carcinoma and its clinical implications. *Sci Rep*. 2022 Dec 15;12(1):21695.
23. Castellsagué X, Quintana MJ, Martínez MC, Nieto A, Sánchez MJ, Juan A, et al. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *Int J Cancer*. 2004 Feb 20;108(5):741–9.
24. Boffetta P, Hecht S, Gray N, Gupta P, Straif K. Smokeless tobacco and cancer. *Lancet Oncol*. 2008 Jul;9(7):667–75.
25. Bagnardi V, Blangiardo M, Vecchia C La, Corrao G. A meta-analysis of alcohol drinking and cancer risk. *Br J Cancer*. 2001 Dec 27;85(11):1700–5.
26. Znaor A, Brennan P, Gajalakshmi V, Mathew A, Shanta V, Varghese C, et al. Independent and combined effects of tobacco smoking, chewing and alcohol drinking on the risk of oral, pharyngeal and esophageal cancers in Indian men. *Int J Cancer*. 2003 Jul 10;105(5):681–6.
27. Lee SU, Moon SH, Choi SW, Cho KH, Park JY, Jung Y, et al. Prognostic significance of smoking and alcohol history in young age oral cavity cancer. *Oral Dis*. 2020 Oct 4;26(7):1440–8.
28. Perry BJ, Zammit AP, Lewandowski AW, Bashford JJ, Dragovic AS, Perry EJ, et al. Sites of Origin of Oral Cavity Cancer in Nonsmokers vs Smokers. *JAMA Otolaryngology–Head & Neck Surgery*. 2015 Jan 1;141(1):5.
29. Mashberg A, Samit A. Early diagnosis of asymptomatic oral and oropharyngeal squamous cancers. *CA Cancer J Clin*. 1995 Nov 1;45(6):328–51.

30. Zumsteg ZS, Luu M, Rosenberg PS, Elrod JK, Bray F, Vaccarella S, et al. Global epidemiologic patterns of oropharyngeal cancer incidence trends. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2023 Aug 21;
31. Giraldi L, Collatuzzo G, Hashim D, Franceschi S, Herrero R, Chen C, et al. Infection with Human Papilloma Virus (HPV) and risk of subsites within the oral cancer. *Cancer Epidemiol*. 2021 Dec;75:102020.
32. Trivedy CR, Craig G, Warnakulasuriya S. The oral health consequences of chewing areca nut. *Addiction Biology*. 2002 Jan;7(1):115–25.
33. Tran Q, Maddineni S, Arnaud EH, Divi V, Megwalu UC, Topf MC, et al. Oral cavity cancer in young, non-smoking, and non-drinking patients: A contemporary review. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2023 Oct 1;190:104112.
34. Chattopadhyay I, Verma M, Panda M. Role of Oral Microbiome Signatures in Diagnosis and Prognosis of Oral Cancer. *Technol Cancer Res Treat*. 2019 Jan 1;18:153303381986735.
35. 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 Feb 10;38(1):9–22.
36. Parakh MK, Ulaganambi S, Ashifa N, Premkumar R, Jain AL. Oral potentially malignant disorders: clinical diagnosis and current screening aids: a narrative review. *European Journal of Cancer Prevention*. 2020 Jan;29(1):65–72.
37. Lee JJ, Hong WK, Hittelman WN, Mao L, Lotan R, Shin DM, et al. Predicting cancer development in oral leukoplakia: ten years of translational research. *Clin Cancer Res*. 2000 May;6(5):1702–10.
38. Warnakulasuriya S, Ariyawardana A. Malignant transformation of oral leukoplakia: a systematic review of observational studies. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 2016 Mar 20;45(3):155–66.

39. Mehanna HM, Rattay T, Smith J, McConkey CC. Treatment and follow-up of oral dysplasia — A systematic review and meta-analysis. *Head Neck*. 2009 Dec 19;31(12):1600–9.
40. Parlatescu I, Gheorghe C, Coculescu E, Tovar S. Oral leukoplakia - an update. *Maedica (Bucur)*. 2014 Mar;9(1):88–93.
41. 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 Jul;81(1):59–71.
42. Wetzel SL, Wollenberg J. Oral Potentially Malignant Disorders. *Dent Clin North Am*. 2020 Jan;64(1):25–37.
43. Speight PM, Khurram SA, Kujan O. Oral potentially malignant disorders: risk of progression to malignancy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2018 Jun;125(6):612–27.
44. Bombeccari GP, Guzzi G, Tettamanti M, Gianni AB, Baj A, Pallotti F, et al. Oral lichen planus and malignant transformation: a longitudinal cohort study. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2011 Sep;112(3):328–34.
45. Cariati P, Ozan DP, Gonzalez Corcóles C, Tursun R, Arroyo Rodriguez S. Risk factors for distant metastasis in oral cancer and a strategy preoperative detection. *Front Oral Maxillofac Med*. 2021 Sep;3:24–24.
46. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershewald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition <sc>AJCC</sc> Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(2):93–9.
47. Ghantous Y, Nashef A, Sidransky D, Abdelraziq M, Alkeesh K, Araidy S, et al. Clinical and Prognostic Significance of the Eighth Edition Oral Cancer Staging System. *Cancers (Basel)*. 2022 Sep 23;14(19):4632.

48. Almangush A, Mäkitie AA, Triantafyllou A, de Bree R, Strojan P, Rinaldo A, et al. Staging and grading of oral squamous cell carcinoma: An update. *Oral Oncol.* 2020;107:104799.
49. BRODERS AC. SQUAMOUS-CELL EPITHELIOMA OF THE LIP. *J Am Med Assoc.* 1920 Mar 6;74(10):656.
50. Dik EA, Ipenburg NA, Kessler PA, van Es RJJ, Willems SM. The value of histological grading of biopsy and resection specimens in early stage oral squamous cell carcinomas. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery.* 2018 Jun;46(6):1001–6.
51. Boxberg M, Jesinghaus M, Dorfner C, Mogler C, Drecoll E, Warth A, et al. Tumour budding activity and cell nest size determine patient outcome in oral squamous cell carcinoma: proposal for an adjusted grading system. *Histopathology.* 2017 Jun 28;70(7):1125–37.
52. Shimizu S, Miyazaki A, Sonoda T, Koike K, Ogi K, Kobayashi J ichi, et al. Tumor budding is an independent prognostic marker in early stage oral squamous cell carcinoma: With special reference to the mode of invasion and worst pattern of invasion. *PLoS One.* 2018 Apr 19;13(4):e0195451.
53. van Lanschot CGF, Klazen YP, de Ridder MAJ, Mast H, ten Hove I, Hardillo JA, et al. Depth of invasion in early stage oral cavity squamous cell carcinoma: The optimal cut-off value for elective neck dissection. *Oral Oncol.* 2020 Dec;111:104940.
54. Shim SJ, Cha J, Koom WS, Kim GE, Lee CG, Choi EC, et al. Clinical outcomes for T1-2N0-1 oral tongue cancer patients underwent surgery with and without postoperative radiotherapy. *Radiation Oncology.* 2010 Dec 27;5(1):43.
55. Berdugo J, Thompson LDR, Purgina B, Sturgis CD, Tuluc M, Seethala R, et al. Measuring Depth of Invasion in Early Squamous Cell Carcinoma of the Oral Tongue: Positive Deep Margin, Extratumoral Perineural Invasion, and Other Challenges. *Head Neck Pathol.* 2019 Jun 26;13(2):154–61.
56. Wahab A, Onkamo O, Pirinen M, Almangush A, Salo T. The budding and depth of invasion model in oral cancer: A systematic review and meta-analysis. *Oral Dis.* 2022 Mar 25;28(2):275–83.

57. Frunza A, Slavescu D, Lascar I. Perineural invasion in head and neck cancers - a review. *J Med Life*. 2014 Jun 15;7(2):121–3.
58. Misztal CI, Green C, Mei C, Bhatia R, Velez Torres JM, Kamrava B, et al. Molecular and Cellular Mechanisms of Perineural Invasion in Oral Squamous Cell Carcinoma: Potential Targets for Therapeutic Intervention. *Cancers (Basel)*. 2021 Nov 29;13(23):6011.
59. Subash A, Rao VUS, Bylapudi BP, Sinha P, Thakur S, Tazeen S. The Impact and Prognostic Significance of Extra-Nodal Extension in Clinically N0 Oral Cancer: A Prospective Clinical Study. *Indian Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery* [Internet]. 2023;75(4):3786–91. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12070-023-03761-x>
60. Higaki M, Koizumi K, Ando T, Ito N, Obayashi F, Hamada A, et al. Extranodal extension in oral squamous cell carcinoma: Clinical and histopathological analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* [Internet]. 2024; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212440324001263>
61. O’Sullivan B, Brierley J, Byrd D, Bosman F, Kehoe S, Kossary C, et al. The TNM classification of malignant tumours—towards common understanding and reasonable expectations. *Lancet Oncol*. 2017 Jul;18(7):849–51.
62. Membreno P V., Luttrell JB, Mamidala MP, Schwartz DL, Hayes DN, Gleysteen JP, et al. Outcomes of primary radiotherapy with or without chemotherapy for advanced oral cavity squamous cell carcinoma: Systematic review. *Head Neck*. 2021 Oct 24;43(10):3165–76.
63. Prgomet D. Head and Neck Carcinoma – Current Possibilities and Perspectives in Treatment. *Lijec Vjesn*. 2021 Sep 7;143(7–8).
64. Lacas B, Bourhis J, Overgaard J, Zhang Q, Grégoire V, Nankivell M, et al. Role of radiotherapy fractionation in head and neck cancers (MARCH): an updated meta-analysis. *Lancet Oncol*. 2017 Sep;18(9):1221–37.
65. Bernier J, Dommenege C, Ozsahin M, Matuszewska K, Lefèbvre JL, Greiner RH, et al. Postoperative Irradiation with or without Concomitant Chemotherapy for Locally

- Advanced Head and Neck Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2004 May 6;350(19):1945–52.
66. Bernier J, Cooper JS, Pajak TF, van Glabbeke M, Bourhis J, Forastiere A, et al. Defining risk levels in locally advanced head and neck cancers: A comparative analysis of concurrent postoperative radiation plus chemotherapy trials of the EORTC (#22931) and RTOG (# 9501). *Head Neck*. 2005 Oct;27(10):843–50.
67. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kawecki A, Rottey S, et al. Platinum-Based Chemotherapy plus Cetuximab in Head and Neck Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2008 Sep 11;359(11):1116–27.
68. Ferris RL, Haddad R, Even C, Tahara M, Dvorkin M, Ciuleanu TE, et al. Durvalumab with or without tremelimumab in patients with recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma: EAGLE, a randomized, open-label phase III study. *Annals of Oncology*. 2020 Jul;31(7):942–50.
69. Vellanki PJ, Mulkey F, Jaigirdar AA, Rodriguez L, Wang Y, Xu Y, et al. FDA Approval Summary: Nivolumab with Ipilimumab and Chemotherapy for Metastatic Non–small Cell Lung Cancer, A Collaborative Project Orbis Review. *Clinical Cancer Research*. 2021 Jul 1;27(13):3522–7.
70. Larkins E, Blumenthal GM, Yuan W, He K, Sridhara R, Subramaniam S, et al. FDA Approval Summary: Pembrolizumab for the Treatment of Recurrent or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma with Disease Progression on or After Platinum-Containing Chemotherapy. *Oncologist*. 2017 Jul 1;22(7):873–8.
71. Burtneß B, Harrington KJ, Greil R, Soulières D, Tahara M, de Castro G, et al. Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. *The Lancet*. 2019 Nov;394(10212):1915–28.
72. Heyd C, Yellon R. *Anatomy, Head and Neck, Pharynx Muscles*. 2023.
73. Bui T, M Das J. *Anatomy, Head and Neck, Pharyngeal Muscles*. 2023.

74. de Martel C, Ferlay J, Franceschi S, Vignat J, Bray F, Forman D, et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol.* 2012 Jun;13(6):607–15.
75. Varier I, Keeley BR, Krupar R, Patsias A, Dong J, Gupta N, et al. Clinical characteristics and outcomes of oropharyngeal carcinoma related to high-risk non-human papillomavirus16 viral subtypes. *Head Neck.* 2016 Sep 15;38(9):1330–7.
76. Elrefaey S, Massaro MA, Chiocca S, Chiesa F, Ansarin M. HPV in oropharyngeal cancer: the basics to know in clinical practice. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2014 Oct;34(5):299–309.
77. Kim SY, Beer M, Tshering Vogel DW. Imaging in head and neck cancers: Update for non-radiologist. *Oral Oncol.* 2021 Sep;120:105434.
78. Lydiatt WM, Patel SG, O’Sullivan B, Brandwein MS, Ridge JA, Migliacci JC, et al. Head and neck cancers—major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* 2017 Mar 27;67(2):122–37.
79. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, et al. Human Papillomavirus and Survival of Patients with Oropharyngeal Cancer. *New England Journal of Medicine.* 2010 Jul;363(1):24–35.
80. Clark GM, Zborowski DM, Culbertson JL, Whitehead M, Savoie M, Seymour L, et al. Clinical utility of epidermal growth factor receptor expression for selecting patients with advanced non-small cell lung cancer for treatment with erlotinib. *J Thorac Oncol.* 2006 Oct;1(8):837–46.
81. Fernández-Mateos J, Seijas-Tamayo R, Klain JCA, Borgoñón MP, Pérez-Ruiz E, Mesía R, et al. Analysis of autophagy gene polymorphisms in Spanish patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Sci Rep.* 2017 Jul 31;7(1):6887.
82. Fernández-Mateos J, Seijas-Tamayo R, Adansa Klain J, Pastor Borgoñón M, Pérez-Ruiz E, Mesía R, et al. Genetic Susceptibility in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in a Spanish Population. *Cancers (Basel).* 2019 Apr 7;11(4):493.

83. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Chi AC. Oral and maxillofacial pathology. Fifth edition. Elsevier Health Sciences; 2023.
84. Rajabi-Moghaddam M, Abbaszadeh H. Gene polymorphisms and risk of head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review. *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy*. 2022 Dec 29;27(6):1058–76.
85. 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 Apr 24;11(5):651.
86. Budhidarmo R, Day CL. IAPs: Modular regulators of cell signalling. *Semin Cell Dev Biol*. 2015;39:80–90.
87. Lopez J, Meier P. To fight or die — inhibitor of apoptosis proteins at the crossroad of innate immunity and death. *Curr Opin Cell Biol*. 2010;22(6):872–81.
88. Gyrd-Hansen M, Meier P. IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF- $\kappa$ B, inflammation and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(8):561–74.
89. Zhang Z, Qin Y, Brewer G, Jing Q. MicroRNA degradation and turnover: regulating the regulators. *WIREs RNA*. 2012 Jul 28;3(4):593–600.
90. de Almagro MC, Vucic D. The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy. *Exp Oncol*. 2012;34(3):200–11.
91. Liang J, Zhao W, Tong P, Li P, Zhao Y, Li H, et al. Comprehensive molecular characterization of inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) for therapeutic targeting in cancer. *BMC Med Genomics*. 2020 Dec 21;13(1):7.
92. Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins---suppressors of apoptosis. *Genes Dev*. 1999;13(3):239–52.
93. [https://atlasgeneticsoncology.org/gene/797/birc5-\(baculoviral-iap-repeat-containing-5\)](https://atlasgeneticsoncology.org/gene/797/birc5-(baculoviral-iap-repeat-containing-5)).



94. Uren AG, Wong L, Pakusch M, Fowler KJ, Burrows FJ, Vaux DL, et al. Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype. *Current Biology*. 2000 Nov;10(21):1319–28.
95. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med*. 1997;3(8):917–21.
96. Wheatley SP, Altieri DC. Survivin at a glance. *J Cell Sci*. 2019;132(7).
97. WHEATLEY S, MCNEISH I. Survivin: A Protein with Dual Roles in Mitosis and Apoptosis. *Int Rev Cytol*. 2005;247:35–88.
98. Verdecia MA, Huang H, Dutil E, Kaiser DA, Hunter T, Noel JP. Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement. *Nat Struct Biol*. 2000;7(7):602–8.
99. Boidot R, Vegran F, Lizard-Nacol S. Predictive value of survivin alternative transcript expression in locally advanced breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Int J Mol Med*. 2009;23(2):285–91.
100. Kabagwira J, Wall N. An Argument to Examine Exosomal Survivin Splice Variant Expression and Patient Survival in Pancreatic Cancer. *Clinics in Oncology*. 2017 May 26;2.
101. Necochea-Campion R de, Chen CS, Mirshahidi S, Howard FD, Wall NR. Clinico-pathologic relevance of Survivin splice variant expression in cancer. *Cancer Lett*. 2013 Oct;339(2):167–74.
102. Végran F, Mary R, Gibeaud A, Mirjolet C, Collin B, Oudot A, et al. Survivin-3B Potentiates Immune Escape in Cancer but Also Inhibits the Toxicity of Cancer Chemotherapy. *Cancer Res*. 2013 Sep 1;73(17):5391–401.
103. Sampath J, Pelus L, Sampath J, Pelus L. Alternative Splice Variants of Survivin as Potential Targets in Cancer. *Curr Drug Discov Technol*. 2007 Oct 1;4(3):174–91.
104. Mahotka C, Liebmann J, Wenzel M, Suschek C V, Schmitt M, Gabbert HE, et al. Differential subcellular localization of functionally divergent survivin splice variants. *Cell Death Differ*. 2002;9(12):1334–42.

105. Warriar NM, Agarwal P, Kumar P. Emerging Importance of Survivin in Stem Cells and Cancer: the Development of New Cancer Therapeutics. *Stem Cell Rev Rep*. 2020 Oct 20;16(5):828–52.
106. Mittal RD, Jaiswal P, Goel A. Survivin: A molecular biomarker in cancer. *Indian Journal of Medical Research*. 2015;141(4):389.
107. Wang X, Huang L, Xu Y, Shi Z, Wang Y, Zhang J, et al. Association between survivin –31G>C promoter polymorphism and cancer risk: a meta-analysis. *European Journal of Human Genetics*. 2012;20(7):790–5.
108. Dai J, Jin G, Dong J, Chen Y, Xu L, Hu Z, et al. Prognostic Significance of Survivin Polymorphisms on Non-small Cell Lung Cancer Survival. *Journal of Thoracic Oncology*. 2010;5(11):1748–54.
109. Münscher A, Prochnow S, Gulati A, Sauter G, Lörincz B, Blessmann M, et al. Survivin expression in head and neck squamous cell carcinomas is frequent and correlates with clinical parameters and treatment outcomes. *Clin Oral Investig*. 2019;23(1):361–7.
110. Khan SA, Burke M, Zhu F, Yang DH, Dubyk C, Mehra R, et al. Survivin expression and impact on head and neck cancer outcomes. *Oral Oncol*. 2021 Jan 1;112.
111. Liu S, Shi L, Yang X, Ye D, Wang T, Dong C, et al. Nuclear survivin promoted by acetylation is associated with the aggressive phenotype of oral squamous cell carcinoma. *Cell Cycle*. 2017;16(9):894–902.
112. Zhou L qing, Hu Y, Xiao H jun. The prognostic significance of survivin expression in patients with HNSCC: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*. 2021;21(1):424.
113. Xing H, Chen X, Sun H, Han Y, Ding L, Chen X. Association of regenerating gene 1A single-nucleotide polymorphisms and nasopharyngeal carcinoma susceptibility in southern Chinese population. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 2020 Jan 20;277(1):221–6.

114. Koike H, Sekine Y, Kamiya M, Nakazato H, Suzuki K. Gene Expression of Survivin and Its Spliced Isoforms Associated With Proliferation and Aggressive Phenotypes of Prostate Cancer. *Urology*. 2008 Dec;72(6):1229–33.
115. Trnski D, Gregorić M, Levanat S, Ozretić P, Rinčić N, Vidaković T, et al. Regulation of Survivin Isoform Expression by GLI Proteins in Ovarian Cancer. *Cells*. 2019;8(2):128.
116. Vincetić M. Polimorfizmi gena BIRC5 i ekspresija izoformi proteina survivina u karcinomu dojke [Diplomski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet; 2020 [pristupljeno 27.05.2024.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:093083>.
117. Adida C, Crotty PL, McGrath J, Berrebi D, Diebold J, Altieri DC. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. *Am J Pathol*. 1998 Jan;152(1):43–9.
118. Lodi G, Franchini R, Bez C, Sardella A, Moneghini L, Pellegrini C, et al. Detection of survivin mRNA in healthy oral mucosa, oral leucoplakia and oral cancer. *Oral Dis*. 2010 Jan;16(1):61–7.
119. Angelin D, Nair BJ. Comparative evaluation of survivin expression in leukoplakia, lichen planus, and oral squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Ther*. 2020;16(3):569–74.
120. Waligórska-Stachura J, Andrusiewicz M, Sawicka-Gutaj N, Biczysko M, Jankowska A, Kubiczak M, et al. Survivin Delta Ex3 Overexpression in Thyroid Malignancies. *PLoS One*. 2014 Jun 19;9(6):e100534.
121. Eckerle I, Muth D, Batzler J, Henrich KO, Lutz W, Fischer M, et al. Regulation of BIRC5 and its isoform BIRC5-2B in neuroblastoma. *Cancer Lett*. 2009 Nov;285(1):99–107.
122. Pavlidou A, Kroupis C, Goutas N, Dalamaga M, Dimas K. Validation of a Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Method for the Quantification of 3 Survivin Transcripts and Evaluation in Breast Cancer Tissues. *Clin Breast Cancer* [Internet]. 2014;14(2):122–31. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1526820913002498>

123. De Maria S, Pannone G, Bufo P, Santoro A, Serpico R, Metafora S, et al. Survivin gene-expression and splicing isoforms in oral squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2009 Jan 19;135(1):107–16.
124. Mehdi RF, Shaikh F, Khan R, Fawad B, Ul Haq A. Survivin Promoter Polymorphism (-31 C/G): A Genetic Risk Factor for Oral Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2019 Apr 1;20(4):1289–93.
125. Weng CJ, Hsieh YH, Chen MK, Tsai CM, Lin CW, Yang SF. *Survivin* SNP-carcinogen Interactions in Oral Cancer. *J Dent Res*. 2012;91(4):358–63.
126. Shi H, Bevier M, Johansson R, Enquist-Olsson K, Henriksson R, Hemminki K, et al. Prognostic impact of polymorphisms in the MYBL2 interacting genes in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2012;131(3):1039–47. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1826-2>
127. Sušac I, Ozretić P, Gregorić M, Levačić Cvok M, Sabol M, Levanat S, et al. Polymorphisms in Survivin (*BIRC5* Gene) Are Associated with Age of Onset in Breast Cancer Patients. *J Oncol*. 2019;2019:1–10.
128. Li XB, Li SN, Yang ZH, Cao L, Duan FL, Sun XW. Polymorphisms of *Survivin* and Its Protein Expression Are Associated with Colorectal Cancer Susceptibility in Chinese Population. *DNA Cell Biol*. 2013 May;32(5):236–42.
129. Antonacopoulou AG, Floratou K, Bravou V, Kottorou A, Dimitrakopoulos FI, Marousi S, et al. The survivin -31 snp in human colorectal cancer correlates with survivin splice variant expression and improved overall survival. *Anal Cell Pathol (Amst)*. 2010;33(5):177–89.
130. Han CH, Wei Q, Lu KK, Liu Z, Mills GB, Wang LE. Polymorphisms in the survivin promoter are associated with age of onset of ovarian cancer. *Int J Clin Exp Med*. 2009 Oct 31;2(4):289–99.
131. Szczyrek M, Mlak R, Szudy-Szczyrek A, Wojas-Krawczyk K, Kędzióra K, Milanowski J. Polymorphism of Baculoviral Inhibitor of Apoptosis Repeat-Containing 5 (*BIRC5*) Can Be Associated with Clinical Outcome of Non-Small Cell Lung Cancer. *Cells* [Internet]. 2022;11(6). Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/11/6/956>

132. Wang N, Li Y, Zhou RM, Cui SJ, Cao SR, Huang X, et al. The effect of polymorphisms in the promoter of the BIRC5 gene on the risk of oesophageal squamous cell carcinoma and patient's outcomes. *Mutagenesis*. 2019;34(4):307–13.
133. Zhu Y, Li Y, Zhu S, Tang R, Liu Y, Li J. Association of Survivin Polymorphisms with Tumor Susceptibility: A Meta-Analysis. *PLoS One*. 2013 Sep 30;8(9):e74778.
134. Boidot R, Végran F, Jacob D, Chevrier S, Cadouot M, Feron O, et al. The transcription factor GATA-1 is overexpressed in breast carcinomas and contributes to survivin upregulation via a promoter polymorphism. *Oncogene*. 2010 Apr 29;29(17):2577–84.
135. Xu M, Hu X, Zhang M, Ge Y. What is the impact of BIRC5 gene polymorphisms on urinary cancer susceptibility? Evidence from 9348 subjects. *Gene*. 2020 Apr;733:144268.
136. Moazeni-Roodi A, Ghavami S, Hashemi M. Survivin rs9904341 polymorphism significantly increased the risk of cancer: evidence from an updated meta-analysis of case–control studies. *Int J Clin Oncol*. 2019;24(4):335–49.
137. Mazoochi T, Karimian M, Ehteram H, Karimian A. *Survivin* c.-31G>C (rs9904341) gene transversion and urinary system cancers risk: a systematic review and a meta-analysis. *Per Med*. 2019;16(1):67–78.
138. Fathy W. MenoufiaMedJ321296-3489835\_094138.
139. Jang JS, Kim KM, Kang KH, Choi JE, Lee WK, Kim CH, et al. Polymorphisms in the survivin gene and the risk of lung cancer. *Lung Cancer*. 2008 Apr;60(1):31–9.
140. Fathy W. MenoufiaMedJ321296-3489835\_094138.
141. Wang N, Huang X, Cheng J. BIRC5 promotes cancer progression and predicts prognosis in laryngeal squamous cell carcinoma. *PeerJ*. 2022;10:e12871–e12871.
142. Aynaci E, Coskunpinar E, Eren A, Kum O, Oltulu YM, Akkaya N, et al. Association between survivin gene promoter -31G/C and -644C/T polymorphisms and non-small cell lung cancer. *Genetics and Molecular Research*. 2013;12(3):3975–82.

143. Kawata N, Tsuchiya N, Horikawa Y, Inoue T, Tsuruta H, Maita S, et al. Two survivin polymorphisms are cooperatively associated with bladder cancer susceptibility. *Int J Cancer*. 2011 Oct 15;129(8):1872–80.
144. Bogdanovic L, Lazic M, Bogdanovic J, Soldatovic I, Nikolic N, Radunovic M, et al. Polymorphisms of survivin -31 G/C gene are associated with risk of urothelial carcinoma in Serbian population. *J BUON*. 2017;22(1):270–7.
145. Radojevic-Skodric S, Basta-Jovanovic G, Brasanac D, Nikolic N, Bogdanovic L, Milicic B, et al. Survivin Gene Promoter –31 G/C Polymorphism Is Associated With Wilms Tumor Susceptibility in Serbian Children. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2012 Nov;34(8):e310–4.
146. Fäldt Beding A, Larsson P, Helou K, Einbeigi Z, Parris TZ. Pan-cancer analysis identifies BIRC5 as a prognostic biomarker. *BMC Cancer*. 2022;22(1):322.

## 11. ŽIVOTOPIS

**Ime i prezime:** Ivan Mumlek

**Adresa:** Josipa Huttlera 20B, Osijek

**Mob:** +385 92 204 1138

**E-mail:** imumlek@gmail.com

**Državljanstvo:** hrvatsko

**Datum rođenja:** 28.11.1983.

### **Obrazovanje:**

2023. položen EACMFS Postgraduate Programme 2023: Head and neck surgery - Oncology, pri Europskom društvu za kraniomaksilofacijsnu kirurgiju – EACMFS (engl. *European association for craniomaxillofacial surgery*), Beč, 2023.

20.1.2022. subspecijalistički ispit iz Plastične kirurgije glave i vrata, KB Dubrava

2020.- 2022. uža specijalizacija iz područja plastične kirurgije glave i vrata, KBC Osijek i KB Dubrava;

17.5.2018. položen specijalistički ispit iz maksilofacijale kirurgije, KB Dubrava

2017.- 2018. Poslijediplomski stručni studij Maksilofacijsna kirurgija, Medicinski fakultet Zagreb;

2012. – danas Poslijediplomski doktorski studij biomedicina i zdravstvo, Medicinski fakultet Osijek

2012.- 2018. specijalizant maksilofacijalne kirurgije KBC Osijek, KB Dubrava i KBC Zagreb

2002.-2009. Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku;

1998.-2002. Opća gimnazija Valpovo

### **Zaposlenje:**

2024.g. Bexorg Inc., New Haven, CT, USA

2012.- 2024.g. Zavod za maksilofacijalnu i oralnu kirurgiju, KBC Osijek

2017.- danas: vanjski suradnik Katedre za otorinolaringologiju i maksilofacijalnu kirurgiju, Medicinskog fakulteta Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku

2011.-2012. liječnik u T1 HMP OBŽ

2010. pripravnički staž, Dom zdravlja Osijek;

### **Znanstvena i stručna djelatnost:**

#### **Objavljeni znanstveni radovi:**

1. Leović M, Jakovčević A, **Mumlek I**, Zagorac I, Sabol M, Leović D. A Pilot Immunohistochemical Study Identifies Hedgehog Pathway Expression in Sinonasal Adenocarcinoma. *Int J Mol Sci.* 2024 Apr 24;25(9):4630. doi: 10.3390/ijms25094630. PMID: 38731849; PMCID: PMC11083810.
2. **Mumlek I**, Ozretić P, Sabol M, Leović M, Glavaš-Obrovac L, Leović D, Musani V. BIRC5 Gene Polymorphisms Are Associated with a Higher Stage of Local and Regional Disease in Oral and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinomas. *Int J Mol Sci.* 2023 Dec 14;24(24):17490. doi: 10.3390/ijms242417490. PMID: 38139318; PMCID: PMC10743484.
3. Kopačin V, Zubčić V, **Mumlek I**, Mužević D, Rončević A, Lazar AM, Pavić AK, Koruga AS, Krivdić Z, Martinović I, Koruga N. Personalized 3D-printed cranial implants for complex cranioplasty using open-source software. *Surg Neurol Int.* 2024 Feb 9;15:39. doi: 10.25259/SNI\_906\_2023. PMID: 38468644; PMCID: PMC10927182.
4. Šimić L, Kopačin V, **Mumlek I**, Butković J, Zubčić V. Improved technique of personalised surgical guides generation for mandibular free flap reconstruction using an open-source tool. *Eur Radiol Exp.* 2021 Jul 28;5(1):30. doi: 10.1186/s41747-021-00229-x. PMID: 34318382; PMCID: PMC8316532.
5. Siber S, Matijević M, Sikora M, Leović D, **Mumlek I**, Macan D. Assessment of Oro-Maxillofacial Trauma According to Gender, Age, Cause and Type of the Injury. *Acta*



Stomatol Croat. 2015 Dec;49(4):340-7. doi: 10.15644/asc49/4/10. PMID: 27688419; PMCID: PMC4945335.

6. Kvolik Pavić A, Tabak L, Lazar AM, Butković J, **Mumlek I**, Guljaš S, Zubčić V. SPECIAL CONSIDERATIONS IN PEDIATRIC TRACHEOSTOMY - A NARRATIVE REVIEW. Acta Clin Croat. 2023 Apr;62(Suppl1):113-118. doi: 10.20471/acc.2023.62.s1.14. PMID: 38746619; PMCID: PMC11090221.

### Kongresna priopćenja, sažetci i poster:

1. **Mumlek I**, Principles of microvascular reconstruction in head and neck surgery; OSCON, 5. studentski kongres, Osijek, travanj, 2024.
2. **Mumlek I**, Korištenje MSAP režnja u rekonstrukcijama defekta glave i vrata, XVI. Međunarodni kongres društva za maksilofacijalu i plastičnu kirurgiju glave i vrata, Opatija, rujan, 2022.
3. **Mumlek I**, Butković J, Zubčić V, Primjena osteotomija ličnog skeleta u bolesnika s teškim oblicima OSA-a, 1. hrvatski kongres o poremećajima spavanja u neurologiji, svibanj, 2022. Osijek
4. Leović D, Zubčić V, Popić B, Dražić D, Kopic V, Siber S, Matijević M, Dinjar K, **Mumlek I**, Janković B. Maksilofacijalna traumatologija u KBC Osijek: trinaest-godišnji pregled. Acta Stomat Croat 2013;47:267-86.
5. **Mumlek I**, Sabol I, Zubčić V, Leović D. Izolirani recidiv vrata: njegov prognostički značaj i povezanost s tipom disekcije. Acta Stomat Croat 2013;47:267-86.
6. Zubčić V, Leović D, Štimac D, Zubčić Ž, **Mumlek I**, Janković B. Rekonstrukcija kompozitnih defekata nakon resekcije kožnih tumora. II kongres HD za tumore glave i vrata s međunarodnim sudjelovanjem. Zadar, 23.-25.10.2014.
7. **Mumlek I**, Oskomić Ž, Zubčić V, Popović Z, Leović D. Prognostički značaj gustoće limfnih čvorova vrata kod karcinoma usne šupljine i orofarinksa. II kongres HD za tumore glave i vrata s međunarodnim sudjelovanjem. Zadar, 23.-25.10.2014.
8. Zubčić V, Leović D, **Mumlek I**. Rekonstrukcija mandibule fibula mikrovaskularnim režnjem. XII kongres HD za maksilofacijalnu, plastičnu i rekonstrukcijsku kirurgiju glave i vrata. VI kongres HD za oralnu kirurgiju. Osijek, 2.-4.6.2016.

9. Zubčić V, Zupčić B, Zubčić Ž, **Mumlek I**, Leović D. 10- godišnje iskustvo upotrebe perforatorskog mikrovaskularnog režnja lateralne cirkumfleksne femoralne arterije u rekonstrukciji defekata glave i vrata. XII kongres HD za maksilofacijalnu, plastičnu i rekonstrukcijsku kirurgiju glave i vrata. VI kongres HD za oralnu kirurgiju. Osijek, 2.-4.6.2016.
10. Zubčić V, Leović D, Štimac D, Zubčić Ž, **Mumlek I**, Janković B. Rekonstrukcija kompozitnih defekata nakon resekcije kožnih tumora. II kongres HD za tumore glave i vrata s međunarodnim sudjelovanjem. Zadar, 23.-25.10.2014.
11. Zubčić V, Leović D, **Mumlek I**, Janković B. Čeoni režanj u rekonstrukciji defekata nosa nakon resekcije kožnih tumora. II kongres HD za tumore glave i vrata s međunarodnim sudjelovanjem. Zadar, 23.-25.10.2014.
12. **Mumlek I**, Zubčić V, Leović D, Štimac D. Rijetki mekotkвинi, neepitelijalni tumori orbitalnog, infratemporalnog i parafaringealnog prostora. II kongres HD za tumore glave i vrata s međunarodnim sudjelovanjem. Zadar, 23.- 25.10.2014

#### **Članstva:**

1. Hrvatsko društvo za maksilofacijalnu plastičnu i rekonstruktivnu kirurgiju
2. EACMFS, Europsko društvo za kraniomaksilofacijalnu kirurgiju
3. Internacionalna akademija za oralnu onkologiju (IAOO).
4. HDBGVSB, Hrvatsko društvo za bolesti glave i vrata Slavonije i Baranje