



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Јелена Сотировић

**КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ЦИТОКИНА У СЕРУМУ КОД
ПАЦИЈЕНАТА СА ПЛАОЦЕЛУЛАРНИМ
КАРЦИНОМОМ ЛАРИНКСА**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2017. године

„Ниједан човек није острво“

John Donne

енглески песник

Желим да се најлепше захвалим:

свом ментору доц. др Александру Перићу, јер је бољег ментора немогуће имати,

особљу Института за медицинска истраживања ВМА, а посебно проф. др Данилу Војводићу, јер без њих израда ове докторске тезе не би била могућа,

др Ивану Залетелу на несебичној помоћи и дивном пријатељству,

свим колегиницама и колегама Клинике за оториноларингологију ВМА, а пре свега медицинским сестрама, које су ми пружиле безрезервну подршку у прикупљању узорака,

својим пријатељима који мој живот чине лепшим и бољим.

И на крају, али и на сваком почетку, мајци Љупки, оцу Драгославу и брату Александру због којих сам оно што јесам.

Садржај

1. УВОД.....	5
1.1. АНАТОМИЈА И ЕМБРИОЛОГИЈА ЛАРИНКСА.....	5
1.2. ЕПИДЕМИОЛОШКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ МАЛИГНИХ ТУМОРА ЛАРИНКСА.....	11
1.3. ПЛАНОЦЕЛУЛАРНИ КАРЦИНОМ ЛАРИНКСА.....	12
1.4. ФАКТОРИ РИЗИКА ЗА НАСТАНАК КАРЦИНОМА ЛАРИНКСА.....	13
1.5. ИМУНСКИ ОДГОВОР КОД ПЛАНОЦЕЛУЛАРНОГ КАРЦИНОМА ЛАРИНКСА.....	14
1.6. ДИЈАГНОСТИКА ПЛАНОЦЕЛУЛАРНОГ КАРЦИНОМА ЛАРИНКСА.....	17
1.6.1. Дијагностичке методе.....	17
1.6.2. Одређивање стадијума болести.....	18
2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА.....	23
2.1. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА.....	23
2.2. ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА.....	23
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД.....	25
3.1. ДИЗАЈН СТУДИЈЕ.....	25
3.2. ИСПИТАНИЦИ.....	25
3.3. ДИЈАГНОСТИЧКЕ МЕТОДЕ И ОДРЕЂИВАЊЕ СТАДИЈУМА БОЛЕСТИ.....	26
3.3.1. Дијагностичке методе.....	26
3.3.2. Патохистолошка дијагностика.....	26
3.3.3. Одређивање стадијума болести.....	26
3.4. УЗОРКОВАЊЕ И АНАЛИЗА СЕРУМА ИСПИТАНИКА.....	27
3.4.1. Узорковање серума испитаника.....	27
3.4.2. Одређивање серумских концентрација цитокина.....	27
3.5. СНАГА СТУДИЈЕ И ВЕЛИЧИНА УЗОРКА.....	30

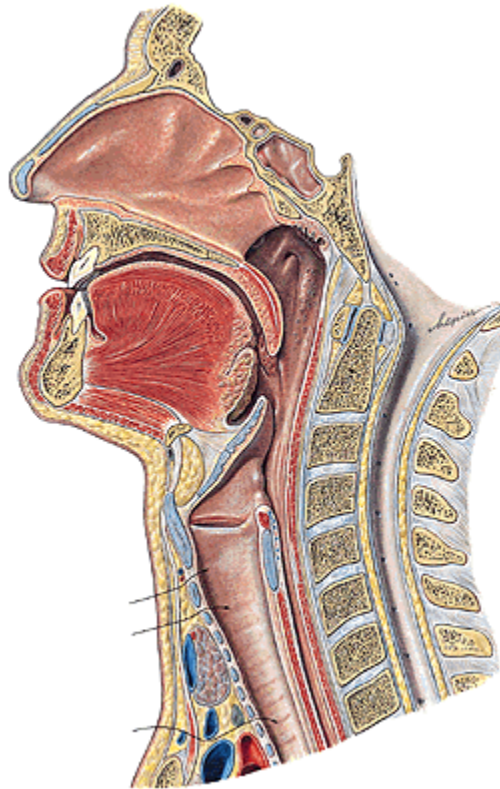
3.6. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА.....	31
4. РЕЗУЛТАТИ.....	32
4.1. ДЕМОГРАФСKE КАРАКТЕРИСТИКЕ ИСПИТАНИКА.....	32
4.2. КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ЦИТОКИНА У СЕРУМУ ОБОЛЕЛИХ И ЗДРАВИХ ИСПИТАНИКА.....	35
4.3. КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ЦИТОКИНА У СЕРУМУ ОБОЛЕЛИХ ОД ПЦКЛ У ОДНОСУ НА СТАДИЈУМ БОЛЕСТИ.....	39
4.3.1. Концентрације цитокина у серуму оболелих у односу на величину примарног тумора.....	39
4.3.2. Концентрације цитокина у серуму оболелих у односу на присуство регионалних метастаза.....	43
4.4. КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ЦИТОКИНА У СЕРУМУ ОБОЛЕЛИХ ОД ПЦКЛ У ОДНОСУ НА КЛИНИЧКО ПАТОЛОШКЕ ПАРАМЕТРЕ.....	47
4.4.1. Концентрације цитокина у серуму оболелих у односу на субрегион ларинкса.....	47
4.4.2. Концентрације цитокина у серуму оболелих у односу на хистолошки граду тумора.....	52
4.5. КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ЦИТОКИНА У СЕРУМУ ИСПИТАНИКА У ОДНОСУ НА ПУШЕЊЕ ЦИГАРЕТА И УПОТРЕБУ АЛКОХОЛА.....	56
4.5.1. Дистрибуција испитаника у односу на пушење цигарета и употребу алкохола.....	56
4.5.2. Концентрације цитокина у серуму испитаника у односу на пушење цигарета.....	57
4.5.2.1. Концентрације цитокина оболелих у односу на пушење цигарета.....	57
4.5.2.2. Концентрације цитокина здравих у односу на пушење цигарета.....	61
4.5.2.3. Концентрације цитокина пушача оболелих од ПЦКЛ и здравих.....	65
4.5.3. Концентрације цитокина у серуму испитаника у односу на злоупотребу алкохола.....	69
4.5.3.1. Концентрације цитокина оболелих у односу на злоупотребу алкохола.....	69
4.5.3.2. Концентрације цитокина здравих у односу на злоупотребу алкохола.....	70
4.5.3.3. Концентрације цитокина оболелих и здравих који злоупотребљавају алкохол.....	71
5. ДИСКУСИЈА.....	80
6. ЗАКЉУЧЦИ.....	109
7. ЛИТЕРАТУРА.....	110

1. УВОД

1.1. АНАТОМИЈА И ЕМБРИОЛОГИЈА ЛАРИНКСА

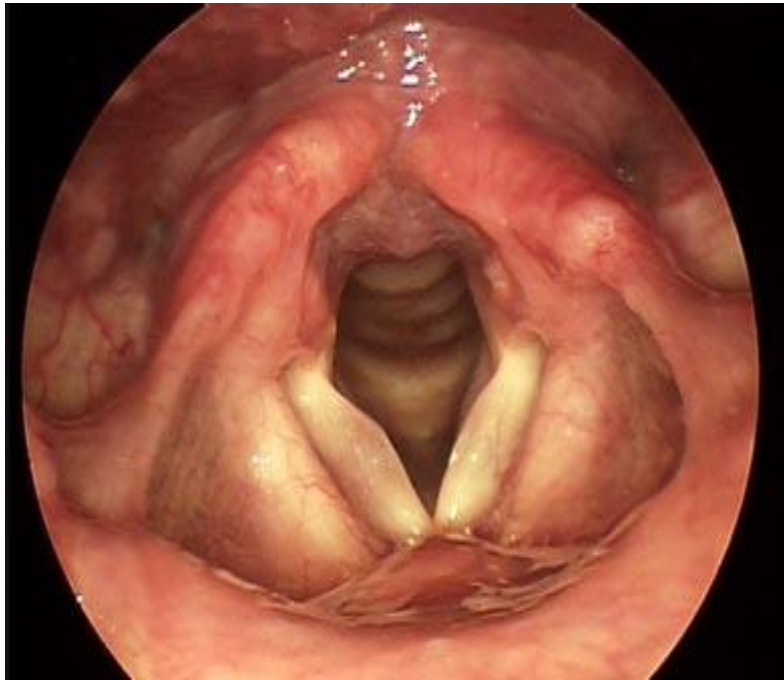
Ларинкс (гркљан) је непарни орган који се налази у средишњој линији врата и пружа се од базе језика до трахеје (душника), у пројекцији од трећег до шестог вратног кичменог пршљена. Латерално од ларинкса налазе се велики крвни судови врата, а испред се налазе кожа, фасције и инфрахиоидни мишићи. Величина ларинкса до пубертета једнака је код припадника оба пола, а након пубертета ларинкс мушкараца је значајно већи у односу на ларинкс код жена (1).

Ларинкс се налази на раскршћу путева за дисање и гутање (Слика 1). Основна функција ларинкса је трострука: део је дисајног пута, представља сфинктер приликом акта гутања и једини је орган за стварање гласа (фонацију).



Слика 1. Схематски приказ попречног пресека ларинкса и околних анатомских структура

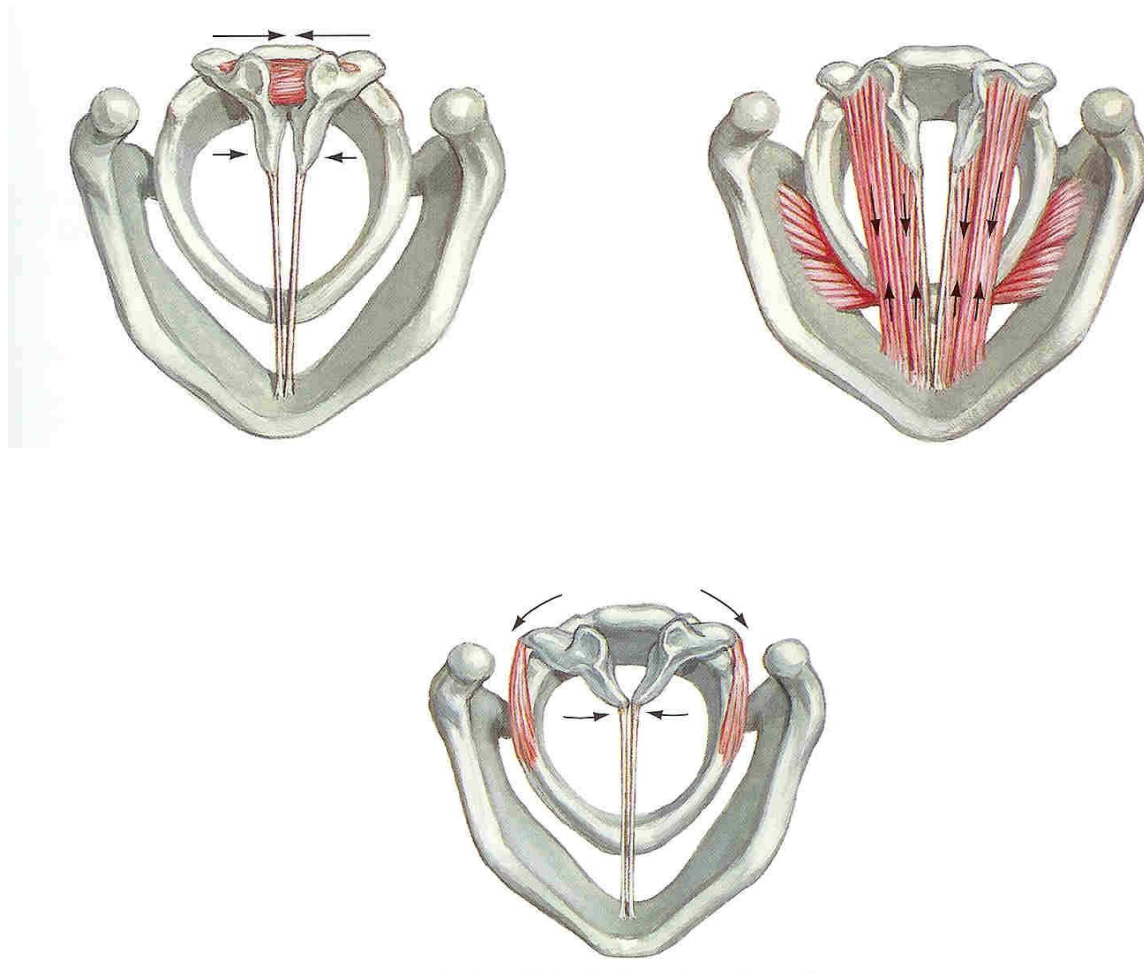
Зидове ларинкса (Слика 2) изграђују слузокожа, хрскавице ларинкса и спољашњи везивни омотач (туника адвентиција – *tunica adventitia*) (2).



Слика 2.Ендоскопски приказ ендоларингеалних структура

Слузокожа (*tunica mucosa*) се састоји од епитела (*lamina epithelialis*) и субепителијалног везивног слоја – ламине проприје (*lamina propria*). Епител ларинкса је највећим делом респираторног типа, осим у пределу гласница где је присутан плочасто-слојевити епител без орожавања. Ламина проприја је грађена од растреситог везивног ткива у коме у пределу вокалних набора има доста еластичних и колагених влакана која граде вокални лигамент (*ligamentum vocale*). У везиву ламине проприје налазе се и мешовите ларингеалне жлезде, које изостају у пределу вокалних набора, као и лимфно ткиво у виду лимфних фоликула (2). Испод слузокоже се налазе скелетни висцерални мишићи ларинкса. Мишићи ларинкса деле се на спољашње и унутрашње. Спољашњи мишићи везују ларинкс за околне анатомске структуре и својом активношћу доводе до вертикалних покрета ларинкса током

фонације и гутања. Унутрашњи мишићи ларинкса учествују у процесима фонације и респирације (Слика 3).



Слика 3. Схематски приказ функције унутрашњих мишића ларинкса у фонацији и респирацији

Ларингеалне хрскавице образују скелет ларинкса (Слика 4). Тиреоидна и крикоидна су хијалиног, док су остале еластичног типа (2). Непарне хрскавице ларинкса су епиглотис, крикоидна и тиреоидна хрскавица, а од парних клинички значај имају аритеноидне хрскавице. Хрскавице ларинкса су међусобно повезане лигаментима и фиброзним

мембранама, а прекривене мишићима који учествују у кретању ларинкса при говору и гутању.



Слика 4.Схематски приказ хрскавичавог скелета ларинкса

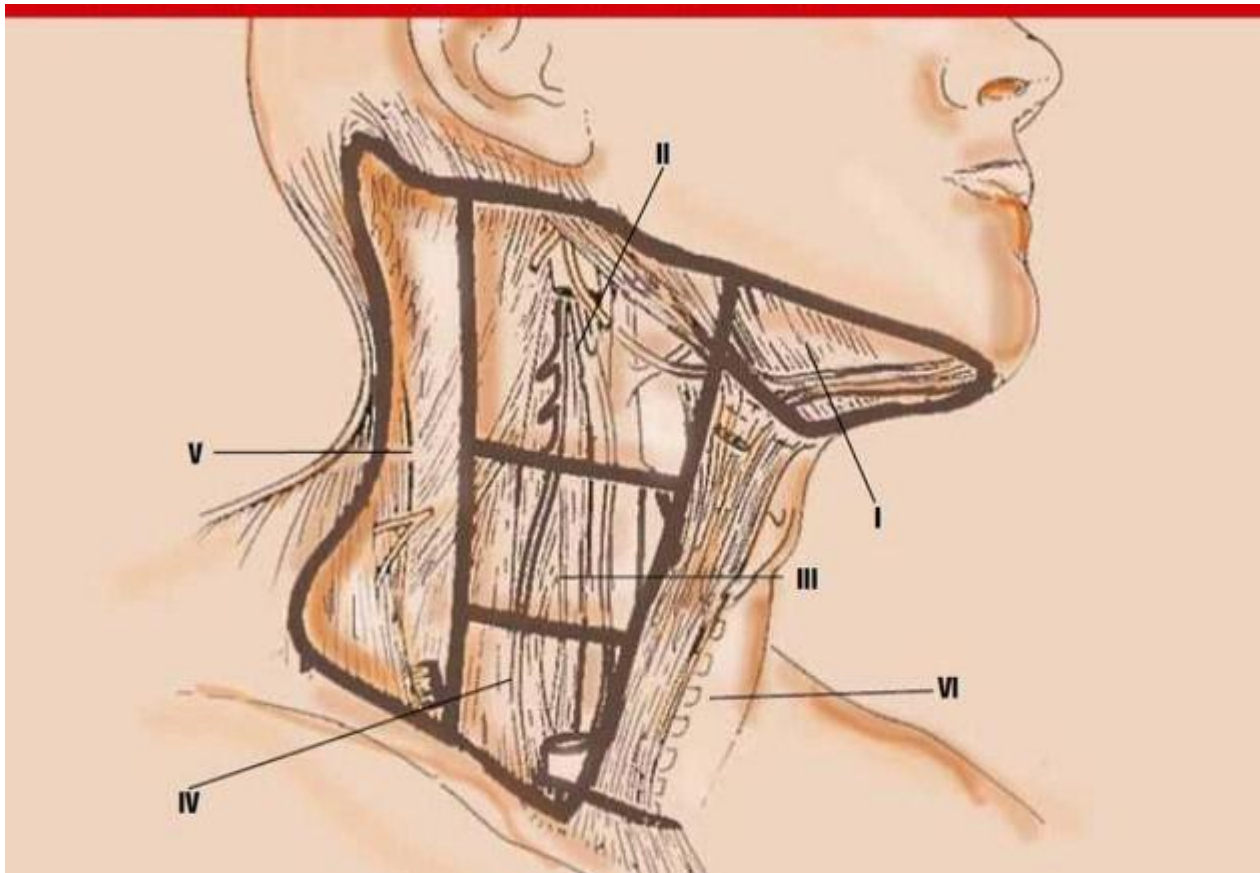
Адвентиција је периферни слој зида ларинкса који га причвршћује за околне структуре.

Артеријска васкуларизација гркљана потиче из горње ларингеалне артерије (*a. laryngeasuperior*), гране спољашње каротидне артерије (*a. carotis externa*) и доње ларингеалне артерије (*a. laryngea inferior*), која је грана артерије субклавије (*a. subclavia*).

Вене прате артеријске крвне судове. Горње ларингеалне вене дренирају се у горње

тиреоидне вене, гране вене југуларис интерне (*v. jugularis interna*). Доње ларингеалне вене дренирају се у доње тиреоидне вене, које се обично уливају у леву брахиоцефаличну вену (*v.brachiocephalica sinistra*) (1).

Лимфни судови ларинкса уливају се у дубоке лимфне чворове врата. Лимфни чворови врата се према Америчкој академији за отоларингологију, хирургију главе и врата (*American Academy of Otolaryngology Head and Neck Suregery, AAOHNS*) из 1991. године деле на 6 субрегиона (Слика 5). Лимфни судови гркљана уливају се највећим делом у други (горњи југуларни), трећи (средњи југуларни) и четврти (доњи југуларни) субрегион (3).



Слика 5. Схематски приказ поделе лимфних чворова врата на нивое према *AAOHNS* (*American Academy of Otolaryngology Head and Neck Suregery*)

Инервација ларинкса потиче од унутрашњих и спољашњих грана горњег ларингеалног нерва (*n. laryngeus superior*), рекурентног ларингеалног нерва (*n. laryngeus recurrens*) и симпатичких влакана. Унутрашње гране горњег ларингеалног нерва су сензорне, спољашње гране су моторног типа, док је рекурентни ларингеални нерв мешовитог типа. Сензорна инервација горњег спрата ларинкса потиче од горњег ларингеалног нерва, доњег спрата од рекурентног ларингеалног нерва, док се у пределу гласница преклапају у сензорној инервацији. Сви унутрашњи мишићи ларинкса инервисани су од стране рекурентног ларингеалног нерва осим крикотиреоидног мишића чија инервација потиче од спољних грана горњег ларингеалног нерва (1).

У клиничком смислу ларинкс се дели на три спрата (субрегиона): горњи, средњи и доњи (4).

Горњи (супраглотишни) спрат ларинкса, сачињавају епиглотис, ариепиглотски набори, вентрикуларни набори, Моргањијеви вентрикулуси и аритеноидне хрскавице.

Средњи (глотишни) спрат ларинкса обухвата гласнице.

Доњи (субглотишни) спрат ларинкса простире се испод гласница до доње ивице крикоидне хрскавице.

Субрегиони ларинкса разликују се међу собом по ембриолошком пореклу и лимфној дренажи, те, у складу с тим, и малигни тумори различитих спратова имају различито клиничко понашање.

Супраглотисни део ларинкса потиче од трећег и четвртог шкржног лука, а глотисни и субглотисни спрат од петог и шестог шкржног лука. Различито ембриолошко порекло условљава и карактеристично ширење малигнух тумора ларинкса (5). Што се лимфне дренаже тиче, лева половина ларинкса независна је у односу на десну, док је лимфна дренажа супраглотишног дела ларинкса независна у односу на ниже (глотисне и субглотисне) структуре. Супраглотисни субрегион ларинкса веома је богат лимфним

судовима, а лимфна дренажа је билатерална. Глотични спрат практично нема лимфне судове (4).

1.2. ЕПИДЕМИОЛОШКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ МАЛИГНИХ ТУМОРА ЛАРИНКСА

Малигни тумори ларинкса (МТЛ) су ређи у поређењу са малигним туморима плућа, дојке, простате, дебелог црева. Према подацима Института за јавно здравље „Др Милан Јовановић Батут“ за 2013. годину, малигни тумори ларинкса у централној Србији заступљени су у 3,4% случајева свих малигних тумора код мушкараца, што је значајно ређе у поређењу са, рецимо, малигноима плућа и бронха који су заступљени са 20,2%, колона и ректума са 12,8% или простате са 11,0%. Према наведеним епидемиолошким подацима, код жена ларинкс не представља водећу локализацију обољевања и умирања од малигне болести (6).

Учесталост МТЛ је различита у различитим деловима света и углавном је у позитивној корелацији са употребом дувана и алкохола (7).

Учесталост карцинома одређеног субрегиона ларинкса такође варира од земље до земље и повезана је са навикама употребе алкохола и дувана (4).

МТЛ се чешће јавља код особа старије животне доби. Према подацима Института за јавно здравље „Др Милан Јовановић Батут“ најчешће се јавља код мушкараца старости 60-64 година, потом 55-59, док је код жена најчешћи у старосној доби преко 75 година и у доби 60-64 године (6). Значајно се чешће јавља код особа мушког пола, али се однос полова међу оболелима у последњих десетак година мења. Однос оболелих мушкараца и жена је 1956. године био 15:1, а данас је 5:1 што се повезује са чешћом употребом дувана код жена последњих деценија (4).

1.3. ПЛАНОЦЕЛУЛАРНИ КАРЦИНОМ ЛАРИНКСА

Више од 95% примарних малигних тумора ларинкса су планоцелуларни карциноми (ПЦК) (*engl. Squamous Cell Carcinoma, SCC*), при чему планоцелуларни карциноми ларинкса (ПЦКЛ) (*engl. Laryngeal Squamous Cell Carcinoma, LSCC*) представљају четвртину свих ПЦК главе и врата. Укупно петогодишње преживљавање код ПЦКЛ износи око 70% (4). Малигни тумори ларинкса могу значајно утицати на дисање и гутање. Додатни значај ових малигних тумора лежи у великом утицају који ларинкс има за квалитет живота с обзиром да се ради о једином органу фонације код човека.

Планоцелуларни карциноми (*engl. squamous cell carcinoma*) су малигни тумори који производе орожавајуће ћелије (8).

Ретко се у ларинксу могу наћи и други патохистолошки типови: верукозни карцином, *spindle cell* карцином, базалоидни карцином, аденоидцистични карцином, неуроендокрини малигни тумори, саркоми, мукозни меланом и други (9).

Сматра се да настанку ПЦКЛ претходи настанак премалигних, диспластичних лезија слузнице ларинкса.

Дисплазија подразумева поремећену, али ненеопластичну пролиферацију и јавља се претежно у епителу. Она представља губитак униформности и архитектурне оријентације појединих ћелија. Диспластичне ћелије испољавају значајан плеоморфизам, често са хиперхроматичним и ненормално великим једром у односу на величину ћелије. Митозе су бројније него што је уобичајено и често нису локализоване на нормалној позицији унутар епитела. У диспластичном плочасто слојевитом епителу митозе нису ограничене на базални слој, где се нормално појављују, већ се могу наћи у свим нивоима, укључујући и површинске ћелије. Постоји изражен поремећај архитектонике (грађе). Када су диспластичне промене изражене и захватају епител целом дебљином, промена се назива *carcinoma in situ*, што је преинвазивни стадијум малигног тумора. Епителна дисплазија скоро увек претходни појави канцера, али не неминовно. Промене лаког и средњег степена које не захватају целу дебљину епитела могу бити реверзибилне када се уклони претпостављени узрочни фактор када епител поново постаје нормалан (8).

Планоцелуларни карцином ларинкса почиње као *in situ* лезија која касније постаје бисерносива, наборана плоча на мукозној површини, а на крају улцерише и поприма печуркаст облик (10).

Степен диферентованости тумора изражава се хистолошким градусом. Хистолошки градус тумора може бити *G (grade)1*- добро диферентован тумор, *G2*- умерено диферентован тумор, *G3*- слабо диферентован тумор (11). Хистолошки градус, сам по себи, не мора представљати прогностички фактор, али представља основну туморску карактеристику (12).

Клинички ток и биолошко понашање ПЦКЛ зависи од захваћеног субрегиона ларинкса, што је у блиској вези са лимфном дренажом одређеног субрегиона. У целини гледано, супраглотични тумори су чешће слабије диферентовани, имају агресивнији клинички ток и лошију прогнозу. Са друге стране, глотични тумори су по правилу добро диферентовани и мање су агресивног биолошког понашања (4). Малигни тумори који се примарно јављају у субглотису су изузетно ретки.

Прогноза карцинома ларинкса углавном се базира на морфолошким и клиничким параметрима тумора. Новија истраживања усмерена су на откривање нових молекуларних, биохемијских и генетских прогностичких параметара у циљу раног откривања и тачнијег одређивања стадијума болести, што у крајњем ефекту има за циљ одговарајућу терапију и боље преживљавање ових болесника.

1.4. ФАКТОРИ РИЗИКА ЗА НАСТАНАК КАРЦИНОМА ЛАРИНКСА

Фактори ризика који се најчешће повезују са настанком планоцелуларног карцинома ларинкса су дуван и алкохол. Осим ових, у факторе ризика за настанак ПЦКЛ спадају и рефлукс желудачне киселине, фактори исхране, изложеност дрвној прашини, азотна једињења, азбест и јонизујуће зрачење (4).

Дуван је најзначајнији фактор ризика за настанак ПЦКЛ, без обзира да ли се ради о пушењу цигарета, цигара или луле. Карцином ларинкса се изузетно јавља код особа које

никада нису пушиле. У овим случајевима се највероватније ради о утицају хуманог папилома вируса (*HPV*) који је значајан кофактор у карциногенези у целом аеродигестивном тракту (13).

Претерана употреба алкохола се повезује са настанком малигнух тумора ларинкса и то на начин да највероватније појачава већ постојећи ризик настао употребом дувана. Алкохол изазива оштећење и инфламацију слузнице горњег аеродигестивног тракта, а представља и значајан фактор за настанак гастроэзофагеалног и ларингофарингеалног рефлукса што додатно може довести до променаслузнице ларинкса. На ефекат који алкохол има на настанак карцинома ларинкса утицај има и нутритивни дефицит који често постоји код алкохоличара (14). Према истраживањима, алкохол је значајнији фактор ризика за настанак супраглотичних у односу на глотичне малигне туморе (4).

Сматра се да вишегодишња изложеност факторима ризика доводи до хиперплазије и метаплазије епитела ларинкса. Постојање дисплазије (атипије) у овако измењеном епителу говори у прилог могуће малигне трансформације.

Као и код других карцинома аеродигестивног тракта, и код ПЦКЛ треба имати у виду могућност настанка других ПЦК- синхроних и метахроних. У случају ПЦКЛ најчешћи метахрони тумор налази се у плућима, што се повезује са истим факторима ризика за настанак обе врсте карцинома.

1.5. ИМУНСКИ ОДГОВОР КОД ПЛАНОЦЕЛУЛАРНОГ КАРЦИНОМА ЛАРИНКСА

Малигно обољење представља хиперпролиферативни поремећај који подразумева морфолошке и ћелијске промене, поремећај апоптозе, неконтролисану ћелијску пролиферацију, инвазивност, ангиогенезу и метастазирање (15). Биолошко понашање малигнух тумора зависи у једној мери од степена ћелијске диферентованости, што корелише са потенцијалом за метастазирање у регионалне лимфне чворове. Са друге

стране, на клинички ток имају утицаја и однос тумор-домаћин и перитуморски инфламаторни одговор, као и васкуларна и перинеурална инвазија.

Имунски систем човека способан је да препозна малигно трансформисане ћелије. Појам имунолошког надзора, који су увели Луис Томас (*Lewis Thomas*) и МекФерлејн Барнет (*McFerlande Burnet*) педесетих година прошлог века, подразумева препознавање и уништавање туморских ћелија од стране домаћина (8). Међутим, осим одбрамбене функције, имунски систем може и да подстакне раст тумора тако што активирани лимфоцити и макрофаги стварају факторе раста за туморске ћелије (8).

Анти-туморски имунски одговор подразумева дејство урођеног (*Natural killer- NK* ћелије, макрофаги) и стеченог (*T* и *B* лимфоцити) имунског одговора (16). Када је анти-туморски имунски одговор слабији од туморске имуносупресивне активности, туморске ћелије успевају да успешно избегну имунски надзор домаћина и започињу убрзан раст, што је основна карактеристика малигнух тумора. А када је анти-туморска активност домаћина јача од туморске имуносупресивне активности, туморске ћелије буду елиминисане (17).

Доминантни анти-туморски механизам *in vivo* је ћелијски имунски одговор. Иако се могу створити антитела против тумора, није доказано да они играју значајну улогу у борби против малигнух тумора, иако примена моноклонских антитела против туморских ћелија има терапијску ефикасност, као што је случај примене моноклонског антитела против *CD20*, површинског антигена *B* ћелија, у циљу лечења Нон-Хочкиновог лимфома (8).

У ефекторне ћелије имунског одговора спадају природне ћелије убице (*engl. Natural Killer, NK* ћелије), цитотоксични *T*-лимфоцити (*engl. Cytotoxic T Lymphocyte, CTL*), и макрофаги. *NK* ћелије су лимфоцити који представљају прву линију одбране против туморских ћелија, а активира их интерлеукин (*IL*)-2. *T*-ћелије, *NK* ћелије и макрофаги могу да сарађују у анти-туморској реакцији, будући да је *Interferon gamma (IFN- γ)*, цитокин који луче *T*-ћелије и *NK* ћелије, снажан активатор макрофага (8).

Субпопулација *T* лимфоцита који експримују *CD4* молекула (*CD4+*) називају се помоћнички *T* (*engl. helper, Th*) лимфоцити зато што секретују солубилне молекуле

(citoкине) који помажу Б лимфоцитима да стварају антитела и макрофагима у фагоцитози (18).

Th лимфоцити откривени су почетком осамдесетих година прошлог века и деле се на 2 субпопулације- *Th1* и *Th2*. У основи, након контакта са антиген-презентујућим ћелијама (*engl. Antigen Presenting cells, APCs*), *naive CD+ T* ћелије диференцирају се или у *Th1* лимфоците које са моноклеарним фагоцитима уништавају интрацелуларне патогене или у *Th2* лимфоците које учествују у диференцијацији Б лимфоцита и продукцији антитела.

Th1 лимфоцити продукују *IL-2* и *IFN-γ*, који активира макрофаге и проинфламаторне цитокине као што су *Tumor Necrosis Factor (TNF)-α* и *TNF-β*. *IL-12* представља снажан фактор диференцијације *Th1* лимфоцита, а сматра се да ову улогу има и *IFN-γ* (19). *Th1* одговор учествује у одбрани против интраћелијских патогена, али и у настанку неких инфламаторних болести као што је инфламаторна болест црева, и аутоимуних болести као што су дијабетес и реуматоидни артритис (20).

Th2 лимфоцити продукују *IL-4*, *IL-5*, *IL-9*, *IL-10* и *IL-13*. *Th2* одговор укључен је у хуморални имунски одговор и важан је у борби против екстрацелуларних патогена (19). Такође, *Th2* одговор учествује у мукозном имунитету плућа и настанку алергија (20).

Th17 представљају врсту *Th* лимфоцита који су откривени у новије време. Ова субпопулација лимфоцита продукује *IL-17* који индукује инфламацију и учествују у аутоимуним процесима и алергијским реакцијама (19,20). Новије студије показују да *IL-17* има важну улогу у настанку тумора, ангиогенези и метастазирању тумора (21). *IL-22* је такође продукт *Th17* ћелија и доводи се у везу са настанком карцинома плућа, јетре, колона, тироидне жлезде, коже (22).

Цитокини су полипептидни производи више типова ћелија, углавном активираних лимфоцита и макрофага, који делују као медијатори инфламације и имунског одговора преко интеракције са специфичним мембранским рецепторима (18). Они представљају велику, хетерогену групу секретујућих протеина чија номенклатура углавном одражава биолошку активност коју имају (као што је *Tumor Necrosis Factor, TNF*), док велику групу сачињавају интерлеукини јер се сматрало да они представљају производ и механизам

комуникације између леукоцита. Цитокини се стварају и секретују као одговор на неки стимулус (продукт микроорганизама, антиген или други цитокин). Дејство цитокина може бити аутокринно (на саму ћелију која продукује тај цитокин), паракринно (делује на околне ћелије) и, најређе, ендокрино (делује на места удаљена од места продукције). Дејство цитокина је плеотропно, односно један цитокин има ефекте на више типова ћелија, а такође цитокини испољавају редувантност (исто дејство могу имати различити цитокини) (23). Из тих разлога је испитивање улоге цитокина веома комплексно.

Бекер (*Becker*) је у својој студији поставио хипотезу да код болесника са малигном болешћу долази до поремећаја односа *Th1/Th2* имунског одговора у смислу преминације *Th2* одговора, те да би одређивање *Th2* серумског одговора представљало индикатор присуства малигног тумора, уколико се искључи постојање алергије код болесника. У том смислу, дејство на инхибирани анти-туморски имунски одговор могло би представљати нову методу лечења (24).

У новије време, стручни радови показали су поремећај односа медијатора *Th1* и *Th2* имунског одговора код пацијената са ПЦКЛ (24-26).

Поремећен механизам инфламације се често доводи у везу са настанком и прогресијом малигног тумора (27,28). Кандидо (*Candido*) са сарадницима је истакао да неопластичне ћелије продукују велике количине проинфламаторних медијатора, а цитокини, као медијатори, могли би бити потенцијални циљ анти-туморске терапије (29).

У новије време публиковани су радови на тему повезаности *IL-17* и ПЦКЛ, мада су резултати ових студија опречни (30-32). Детаљним прегледом нама доступне литературе нисмо нашли студију која је испитала повезаност *IL-22* са ПЦКЛ.

1.6. ДИЈАГНОСТИКА ПЛАНОЦЕЛУЛАРНОГ КАРЦИНОМА ЛАРИНКСА

1.6.1. Дијагностичке методе

Дефинитивна дијагноза ПЦКЛ поставља се биопсијом и патохистолошком анализом туморског ткива. Биопсија се обично обавља у општој ендотрахеалној анестезији када се, током директоскопског прегледа (ларингомикроскопија са хипофарингоскопијом) процењује и проширеност тумора на структуре ларинкса и околне структуре. Додатне податке о проширености тумора унутар ларинкса (захваћеност хрскавице, параглотисног и преепиглотисног простора), регионалном и удаљеном ширењу болести пружа радиолошка дијагностика. Врста радиолошке дијагностике зависи од клиничке процене величине тумора, а обухвата ултразвучни преглед врата, скенер врата, магнетну резонанцу врата, рендгенски снимак плућа, скенер плућа, ултразвучни преглед абдомена, а по потреби и друге.

1.6.2. Одређивање стадијума болести

Одређивање стадијума малигне болести омогућава адекватан одабир модалитета лечења и поређење резултата лечења. Према Америчком удружењу за малигне болести (*American Joint Committee on Cancer, AJCC*) одређивање стадијума болести врши се према *TNM* систему, при чему *T* одредница представља величину примарног тумора, *N* представља захваћеност регионалних лимфних чворова, а *M* присуство удаљених метастаза. Примарно одређивање стадијума болести врши се на основу клиничких параметара – *clinical, cTNM*. Након оперативног лечења и патохистолошке дијагностике, добијају се информације о патохистолошкој класификацији- *pathological, pTNM*. *TNM* класификација за сваки од субрегиона ларинкса, као и за регионалне и удаљене метастазе дата је у Табелама 1, 2, 3, 4 и 5.

Табела 1. Класификација T стадијума малигнух тумора глотиса

ГЛОТИС	
Tx	Примарни тумор се не може одредити
T0	Нема знакова примарног тумора
Tis	<i>Carcinoma in situ</i>
T1	Тумор ограничен на гласнице, укључујући и предњу и задњу комисуру, са нормалном покретљивошћу
T1a	Тумор ограничен на једну гласницу
T1b	Тумор захвата обе гласнице
T2	Тумор се шири на супраглотис и/или субглотис, и/или са смањеном покретљивошћу гласница
T3	Тумор ограничен на ларинкс са фиксацијом гласница уз непокретну гласницу и/или инвазија параглотског простора и/или захваћеност унутрашњег перихондријума тиреоидне хрскавице
T4a	Тумор се шири кроз тиреоидну хрскавицу и/или постоји захватање структура изван ларинкса (трахеје, меких ткива врата укључујући спољашње мишиће језика, инфрахиоидне мишиће, тиреоидну жлезду, једњак)
T4b	Тумор захвата превертебрални простор, обухвата каротидну артерију, инвадира медијастиналне структуре

Табела 2. Класификација Т стадијума малигнух тумора супраглотиса

СУПРАГЛОТИС	
Tx	Примарни тумор се не може одредити
T0	Нема знакова постојања примарног тумора
Tis	<i>Carcinoma in situ</i>
T1	Тумор ограничен на један субрегион супраглотиса уз нормалну покретљивост гласница
T2	Тумор захвата слузницу више од једног субрегиона супраглотиса или глотиса или регије ван супраглотиса (слузницу базе језика, валекуле, мадијалног зида пирифомног синуса) без фикације ларинкса
T3	Тумор ограничен на ларинкс уз фикацију гласнице и/или инвадира следеће структуре: посткрикоидну регију, преепиглотисни простор, параглотисни простор и/или унутрашњи перихондријум тиреоидне хрскавице
T4a	Тумор се шири кроз тиреоидну хрскавицу и/или постоји захватање структура изван ларинкса (трахеје, меких ткива врата укључујући спољашње мишиће језика, инфрахиоидне мишиће, тиреоидну жлезду, једњак)
T4b	Тумор захвата превертебрални простор, обухвата каротидну артерију, инвадира медијастиналне структуре

Табела 3. Класификација Т стадијума малигнух тумора субглотиса

СУБГЛОТИС	
Tx	Примарни тумор се не може одредити
T0	Нема знакова постојања примарног тумора
Tis	<i>Carcinoma in situ</i>
T1	Тумор ограничен на субглотис
T2	Тумор се шири на једну или обе гласнице уз нормалну или ограничену покретљивост гласнице
T3	Тумор ограничен на ларинкс уз фикацију гласнице
T4a	Тумор захвата крикоидну или тиреоидну хрскавицу и/или постоји захватање структура изван ларинкса (трахеје, меких ткива врата укључујући спољашње мишиће језика, инфрахиоидне мишиће, тиреоидну жлезду, једњак)
T4b	Тумор захвата превертебрални простор, обухвата каротидну артерију, инвадира медијастиналне структуре

Табела 4. Класификација метастатски измењених лимфних чворова на врату

РЕГИОНАЛНИ ЛИМФНИ ЧВОРОВИ (N)	
Nx	Регионални лимфни чворови се не могу одредити
N0	Нема метастаза у регионалним лимфним чворовима
N1	Метастаза у једном ипсилатералном лимфном чвору највећег дијаметра ≤ 3 cm
N2	Метастаза у једном ипсилатералном лимфном чвору > 3 cm али не већег од 6 cm у највећем дијаметру; или метастазе у више ипсилатералних лимфних чворова од којих ни један није > 6 cm у највећем дијаметру; или метастазе у билатералним или контралатералним лимфним чворовима од којих ни један није > 6 cm у највећем дијаметру
N2a	Метастаза у једном ипсилатералном лимфном чвору > 3 cm али не већег од 6 cm у највећем дијаметру
N2b	Метастазе у више ипсилатералних лимфних чворова од којих ни један није > 6 cm у највећем дијаметру
N2c	Метастазе у билатералним или контралатералним лимфним чворовима од којих ни један није > 6 cm у највећем дијаметру
N3	Метастаза у лимфном чвору која је > 6 cm у највећем дијаметру

Табела 5. Класификација присуства удаљених метастаза

УДАЉЕНЕ МЕТАСТАЗЕ (M)	
M0	Нема удаљених метастаза
M1	Постоје удаљене метастазе

2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА

2.1. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

1. Одредити концентрације *IL-1 β* , *IL-2*, *IL-4*, *IL-5*, *IL-6*, *IL-9*, *IL-10*, *IL-12*, *IL-13*, *IL-17*, *IL-22*, *IFN- γ* и *TNF- α* у узорцима серума болесника са ПЦКЛ пре започињања специфичне онколошке терапије.
2. Одредити концентрације *IL-1 β* , *IL-2*, *IL-4*, *IL-5*, *IL-6*, *IL-9*, *IL-10*, *IL-12*, *IL-13*, *IL-17*, *IL-22*, *IFN- γ* и *TNF- α* у узорцима серума здравих испитаника.
3. Упоредити концентрације испитиваних цитокина у серуму болесника са ПЦКЛ у односу на захваћени субрегион ларинкса, стадијум болести и хистолошки градус малигног тумора, пушење и злоупотребу алкохола.
4. Упоредити концентрације цитокина у серуму оболелих од ПЦКЛ и здравих испитаника.

2.2. ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА

1. Серумске вредности *Th1* цитокина (*IL-2*, *IL-12* и *IFN- γ*) су снижене, а вредности *Th2* (*IL-4*, *IL-5*, *IL-9*, *IL-10* и *IL-13*), *IL-17*, *IL-22* и проинфламаторних цитокина (*IL-6*, *IL-1 β* и *TNF- α*) повећане су у болесника са ПЦКЛ у односу на здраве испитанике.
2. Концентрације *Th1* цитокина су ниже у одмаклим (*T3/T4*) у односу на почетне (*T1/T2*) *T* стадијуме ПЦКЛ.
3. Концентрације *Th2* цитокина, *IL-17*, *IL-22* и проинфламаторних цитокина су више у одмаклим (*T3/T4*) у односу на почетне (*T1/T2*) *T* стадијуме болести.
4. Концентрације *Th1* цитокина су ниже код пацијената са ПЦКЛ код којих постоји регионална проширеност болести (*N+*).
5. Концентрације *Th2* цитокина, *IL-17*, *IL-22* и проинфламаторних цитокина су више код болесника са ПЦКЛ код којих постоји регионална проширеност болести (*N+*).
6. Концентрације *Th1* цитокина су ниже, а *Th2* цитокина, *IL-17*, *IL-22* и проинфламаторних цитокина у серуму су више код пацијената са ПЦКЛ у групи оних који пуше у односу на оболеле који не пуше.

7. Концентрације *Th1* цитокина су ниже, а *Th2*, *IL-17*, *IL-22* и проинфламаторних цитокина у серуму су више код пацијената са ПЦКЛ у групи оних који злоупотребљавају алкохол у односу на оболеле који то не чине.
8. Концентрације *Th1* цитокина су ниже, а *Th2*, *IL-17*, *IL-22* и проинфламаторних цитокина у серуму су више у групи здравих активних пушача у односу на здраве непушаче.
9. Концентрације *Th1* цитокина су ниже, а *Th2*, *IL-17*, *IL-22* и проинфламаторних цитокина у серуму су више у групи здравих испитаника који претерано конзумирају алкохол у односу на здраве који претерано не конзумирају алкохол.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД

3.1. ДИЗАЈН СТУДИЈЕ

Истраживање је дизајнирано као проспективна клиничка опсервациона студија пресека.

3.2. ИСПИТАНИЦИ

Студија је спроведена у Војномедицинској академији (ВМА) у Београду након одобрења Етичког одбора ВМА од 28.1.2015.

Испитанике у студији чинили су болесници са дијагностикованим планоцелуларним карциномом ларинкса пре започињања онколошког лечења и клинички здрави испитаници. У испитивање је укључено 59 болесника са ПЦКЛ дијагностикованих у Клиници за оториноларингологију ВМА у периоду јануар-децембар 2015. године. Контролну групу сачињавало је 44 здравих испитаника, добровољних давалаца крви у Институту за трансфизиологију и хемобиологију ВМА.

Сви испитаници укључени у студију потписали су Образац информисаног пристанка, одобрен од стране Етичког одбора ВМА, у коме су детаљно објашњене процедуре током извођења студије и поверљивост добијених података. Подаци о навикама (пушење цигарета или цигара, узимање алкохола) и здравственом стању добијени су у личном контакту са испитаницима.

Пушачима су дефинисани испитаници који у последњих 5 година пуше најмање 20 цигарета на дан. Алкохоличарима су дефинисани мушкарци који су током последњих годину дана конзумирали више од 14 стандардних јединица алкохола недељно или више од 4 јединице алкохола дневно и жене које су конзумирале више од 7 стандардних јединица алкохола недељно или више од 3 дневно. Стандардна јединица алкохола дефинисана је као боца пива од 350 ml, чаша вина од 150 ml или 45 ml жестоког пића (33).

Критеријуми за искључивање из студије су били: болесници са рецидивом карцинома ларинкса, симптоми и знаци акутне инфекције, аутоимуне болести, постојање алергије,

постојање друге малигне болести, претходна радиотерапија или хемиотерапија, узимање кортикостероидне или имуносупресивне терапије.

3.3. ДИЈАГНОСТИЧКЕ МЕТОДЕ И ОДРЕЂИВАЊЕ СТАДИЈУМА БОЛЕСТИ

3.3.1 Дијагностичке методе

Дијагноза ПЦКЛ постављена је на основу ларингомикроскопског и хипофарингоскопског прегледа са биопсијом у општој ендотрахеалној анестезији и патохистолошке анализе биоптираног ткива.

Додатна дијагностичка испитивања рађена су према индикацијама за сваког пацијента понаособ, а у склопу израде одговарајућег плана лечења. Радиолошка испитивања обухватала су ултразвучни преглед врата, мултислајсну компјутеризовану томографију врата и ларинкса (*engl. Multislice Computed Tomography, MSCT*), рендгенски снимак плућа, мултислајсну компјутеризовану томографију грудног коша, ултразвучни преглед абдомена.

3.3.2. Патохистолошка дијагностика

Туморски препарати дела или целог ларинкса са одстрањеним тумором су били 24 сата фиксирани у 4% пуферованом раствору формалина. Потом су препарати испирани водом и дехидрирани у алкохолу (етанолу) растуће концентрације (70% до апсолутног), а затим липофилизовани у ксилолу и калупљени у парафин. Парафински блокови су сечени микротомом на дебљину узорака 3-5 μm и потом бојени хематоксилин-еозин техником (*Hematoxylin & Eosin*) и анализирани према протоколу AJCC (34). Патохистолошка анализа подразумевала је одређивање хистолошког типа и хистолошког градуса (*HG*) тумора, патохистолошку анализу одстрањених лимфних чворова врата и одређивање патохистолошког стадијума болести (*pTNM*).

3.3.3. Одређивање стадијума болести

Одређивање стадијума болести рађено је према *TNM* класификацији Америчког удружења за малигне болести (*American Joint Committee on Cancer, AJCC, 2009.*), а на основу потребних дијагностичких испитивања (35). Стадијум болести према *TNM* класификацији одређиван је према најдетаљнијој информацији добијеној у току дијагностике или хируршког лечења пацијената- *c* (клинички), *p* (патохистолошки) *TNM*.

Према *TNM* класификацији, испитаници са ПЦКЛ су подељени у групу са раним (*T1/T2*) и касним (*T3/T4*) *T* стадијумом болести. На основу радиографски и/или патохистолошки потврђеним метастатски измењеним лимфним чворовима на врату болесници са ПЦКЛ подељени су у групу без (*N0*) и са (*N+*) регионалним метастазама, а према присуству удаљених метастаза на болеснике без (*M0*) и са (*M1*) удаљеним метастазама.

3.4. УЗОРКОВАЊЕ И АНАЛИЗА СЕРУМА ИСПИТАНИКА

3.4.1. Узорковање серума испитаника

Испитаницима који су укључени у студију узиман је узорак од 5 ml периферне венске крви из вене надлактичне јаме. Епрувете су обележене редним бројевима према редоследу узимања узорка.

3.4.2. Одређивање серумских концентрација цитокина

Мерење концентрације испитиваних цитокина рађено је у Институту за медицинска истраживања ВМА.

Један сат након узимања, узорак крви је центрифугован на 1000 јединица Земљине теже (*g*) током 10 минута у циљу одвајања серума од ћелијских елемената, а затим је серум одвојен и замрзнут на температури од -70°C до завршетка прикупљања свих узорака и мерења концентрација цитокина.

Концентрације цитокина *IL-1 β* , *IL-2*, *IL-4*, *IL-5*, *IL-6*, *IL-9*, *IL-10*, *IL-12*, *IL-13*, *IL-17*, *IL-22*, *IFN- γ* и *TNF- α* мерене су у сваком од узорака серума методом проточне цитометрије (*flow-cytometry*), заснованом на примени перлица од полистирола (*bead-based multiple analyte detection*), обложених моноклонским антителима, уз коришћење комерцијалног проточног цитометријског кита (*Flow Cytomix, Bender Med Systems, USA*). Мерења су вршена на апарату проточном цитофлуориметру (*Beckman Coulter XL-MCL, USA*), који је био повезан са *BMS* софтвером (*Flow Cytomix Pro 2.2 Software*).

Цитометријски кит који је коришћен за ово истраживање је омогућавао мерење концентрација до 20 медијатора (*Multiple Analyte Detection System*). Наиме, у једном проточно-цитометријском киту комбинују се полистиролске перлице различитих димензија, означене флуорохромним обележивачима (бојама) различитих интензитета отпуштања фотона.

Мерење концентрација цитокина вршено је на следећи начин (36-37):

Одмрзнути узорци серума се мешају са комерцијалним проточним цитометријским китом. Кит се састоји од смеше перлица од полистирола, које су обложене моноклонским антителом које специфично реагује са одговарајућим медијатором који се мери. Нова смеша антиген-антитело је инкубирана један сат на собној температури (18–25°C).

1. Смеси, у којој је сваки од медијатора већ одреаговао са примарним антителом на перлицама, додају се секундарна антитела, обележена биотином, која се специфично везују за сваки од молекула одговарајућег медијатора. Ова инкубација траје 2 сата на температури од 18° до 25°C.

2. У циљу детекције, описаној смеси се додаје раствор стрептавидин-фикоеритина, који се састоји од моноклонских антитела обележених флуорохромом, а која се специфично везују за биотин-коњуговано антитело. Ова инкубација траје 1 сат на температури од 18° до 25°C.

3. Смеса се центрифугира два пута по 5 минута на 200 g. Након тога је смеша припремљена за проточну цитометрију.

4. Методом проточне цитометрије одвајају се одговарајуће популације перлица према величини перлица и флуоресценцији. Проточна цитометрија је квантитативна метода чији је основни принцип сортирање ћелија. У основи ради се о одвајању (сортирању) ћелија у протоку на основу флуоресценце. Након што се смеша разлије у тзв. вибрирајућу проточну комору, обележене перлице улазе у ток. На једном месту се комора сужава у канал, ширине дијаметра једне обележене перлице. У једној тачки свака од усмерених перлица наилази на ласерски сноп, чија је таласна дужина 690 нанометара. Када ласер погоди специфичну боју којом је обележен молекул стрептавидин-фикоеритина, он побуди електроне, који прелазе на више орбите. Након изласка из снопа, електрони се враћају у претходне орбите и тада емитују фотонски сноп, који региструје фотодетектор апарата. Интензитет фотонског сигнала је директно пропорционалан концентрацији мереног медијатора у смеси.

5. Софтвер (*Flow Cytomix™ Pro Software*) израчунава концентрације испитиваних медијатора у узорку. Софтвер прорачунава укупан број перлица које флуоресцирају на исти начин и тако одређује интензитет сигнала (средњег логаритма интензитета флуоресценце) који се конвертује у вредност концентрације одговарајућег цитокина, изражену у пикограмима по милилитру (*pg/ml*). За сваки од цитокина софтвер одређује одговарајућу стандардну криву, којој су на апсциси вредности концентрације цитокина, а на ординати вредности интензитета детектованог сигнала. Концентрација медијатора измереног у узорку се бележе у односу на стандардну криву.

Праг детекције за сваки од испитиваних медијатора зависи од типа апарата проточног цитометра, као и од проточног цитометријског кита који се користи за мерење.

Вредности прага детекције за медијаторе који су мерени у нашој студији и максималне вредности концентрација које се могу измерити за сваки од медијатора, приказани су у Табели 6.

Табела 6. Праг детекције и максималне вредности испитиваних цитокина

Медијатор	Праг детекције(<i>pg/ml</i>)	Максимална вредност(<i>pg/ml</i>)
<i>IL-2</i>	16,4	27 - 20000
<i>IL-12</i>	1,5	27 - 20000
<i>IFN- γ</i>	1,6	27 - 20000
<i>IL-4</i>	20,8	27 - 20000
<i>IL-5</i>	1,6	27 - 20000
<i>IL-6</i>	1,2	27 - 20000
<i>IL-10</i>	1,9	27 - 20000
<i>IL-13</i>	4,5	27 - 20000
<i>IL-17</i>	2,5	13,7 - 10000
<i>IL-9</i>	1,5	2,7 - 2000
<i>IL-1β</i>	4,2	27 - 20000
<i>TNF-α</i>	3,2	27 - 20000
<i>IL-22</i>	43,3	110 - 80000

3.5. СНАГА СТУДИЈЕ И ВЕЛИЧИНА УЗОРКА

Резултати студије коју су реализовали Хатавеј (Hathaway) и сарадници указују да вредности *IL-10*, медијатора *Th2* имунског одговора, у серуму пацијената са планоцелуларним карциномом главе и врата показују значајну разлику у односу на његове концентрације у серуму клинички здравих особа (2,9 *pg/ml* у односу на 1,6 *pg/ml*) (38). Уз критеријуме да је очекивана снага ефекта 0,63 (последича великих разлика средњих вредности између група, али и велике варијабилности вредности цитокина унутар група), да је неопходна снага студије најмање 80%, а вероватноћа грешке првог типа 0,05 ($\alpha = 0,05$), применом непараметарског *Mann Whitney U* теста је утврђено да је укупан број

испитаника 86. То значи да у свакој од испитиваних група треба да буде минимално по 43 испитаника. За израчунавање величина група коришћен је комерцијални софтвер *GPower*, 3.1.

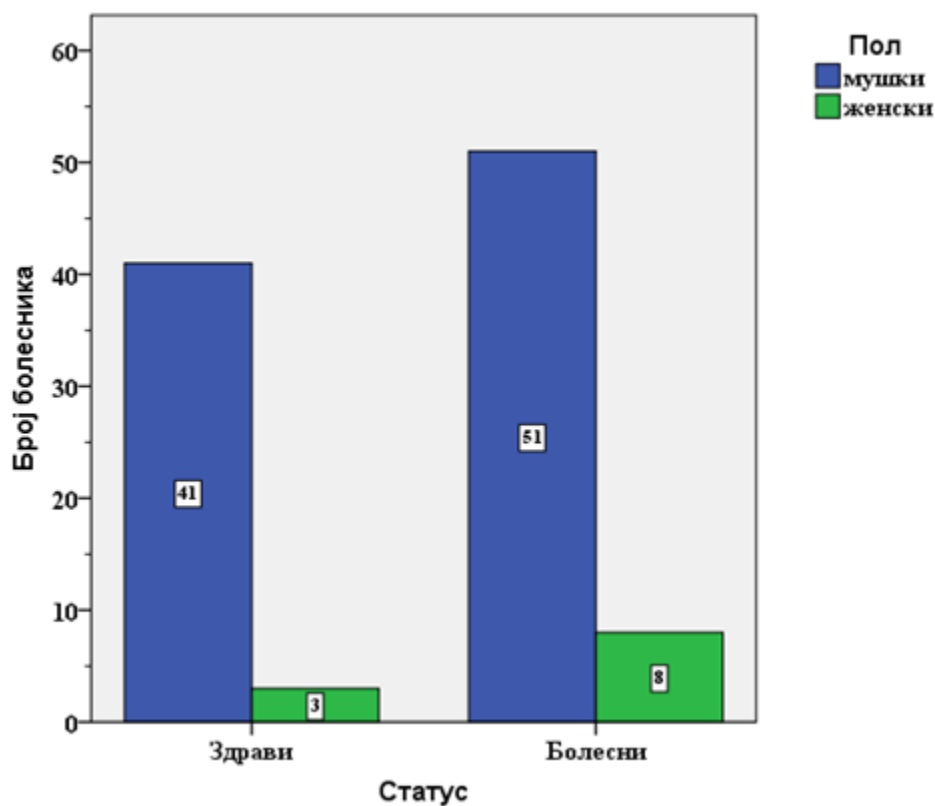
3.6. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

Поређења концентрација цитокина међу различитим групама вршена је применом непараметарског *Mann Whitney U* теста. Разлике су сматране статистички значајним уколико је p био мањи или једнак 0,05, а високо статистички значајним уколико је p био мањи или једнак 0,01. Резултати су представљени као средња вредност \pm стандардна девијација (*Mean \pm SD*). Сви статистички прорачуни урађени су коришћењем програма *Graph Pad Prism 5 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA)*.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. ДЕМОГРАФСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ИСПИТАНИКА

У студију је било укључено укупно 103 испитаника- 59 пацијената са дијагностикованим ПЦКЛ и 44 контролна испитаника. Распон година у групи пацијената био је од 41 до 90 година (просечан број година 64), а у контролној групи распон година се кретао од 44 до 78 година (просечан број година 51,5). Међу пацијентима са ПЦКЛ било је 51 испитаника мушког пола и 8 жена, док је у контролној групи било 41 мушкараца и 3 жене (Слика 6).



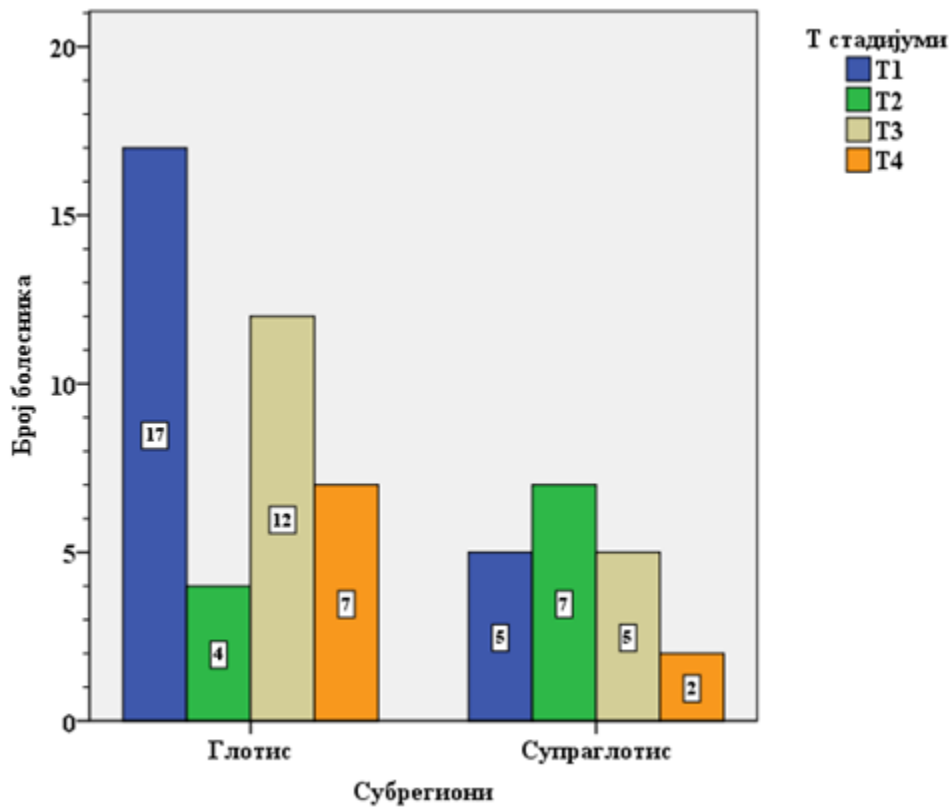
Слика 6. Дистрибуција испитаника према полу

Дистрибуција пацијената према примарној локализацији тумора, *T* и нодалном статусу (*TNM* класификација) болести приказана је у Табели 7. У групи пацијената није било испитаника са удаљеним метастазама, односно сви пацијенти су имали *M0* статус према *TNM* класификацији.

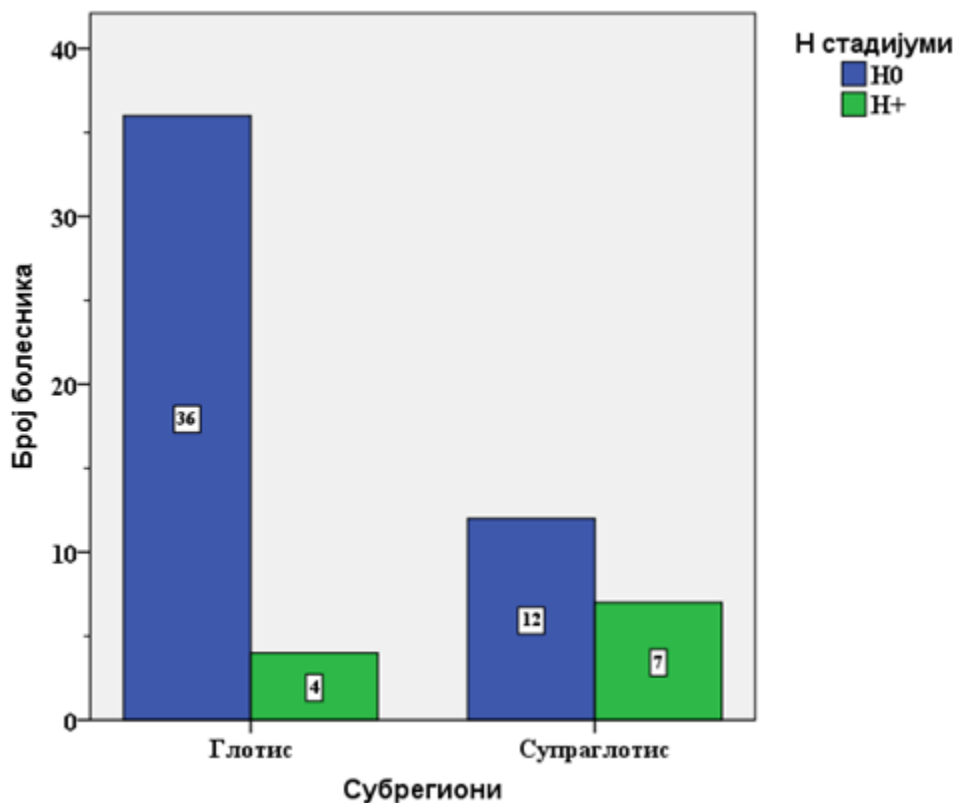
Табела 7. Демографске карактеристике испитаника и дистрибуција пацијената са ПЦКЛ према *T* и *N* статусу (*TNM* класификација). М- мушкарци, Ж- жене

Испитаници		Старост <i>Median (range)</i>	Пол		<i>T</i> стадијум				Нодални статус	
			М	Ж	<i>T1</i>	<i>T2</i>	<i>T3</i>	<i>T4</i>	<i>N0</i>	<i>N+</i>
Глотис	40	64 (41-90)	35	5	17	4	12	7	36	4
Супраглотис	19	64 (47-78)	16	3	5	7	5	2	12	7
Пацијенти	59	64 (41-90)	51	8	22	11	17	9	48	11
Контроле	44	51,50 (44-78)	41	3						

Дистрибуција пацијената према *T* и нодалном статусу у односу на субрегион ларинкса приказана је на Слици 7 и Слици 8.



Слика 7. Дистрибуција болесника са ПЦКЛ глотисне и супраглотисне регије ларинкса у односу на *T* статус (*TNM* класификација)



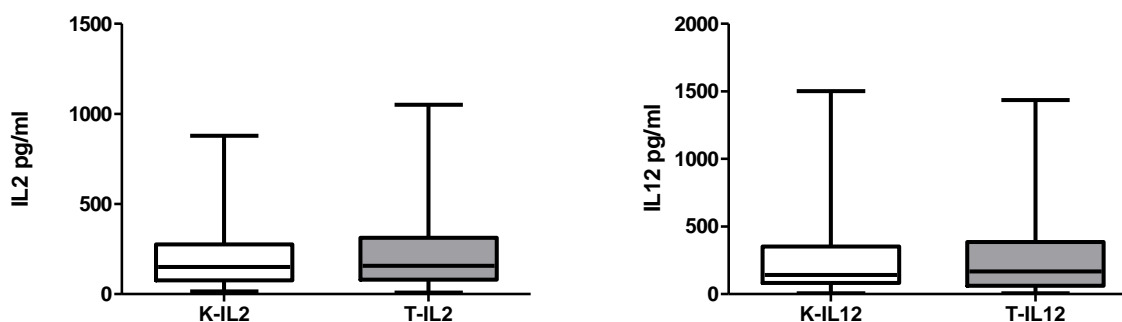
Слика 8. Дистрибуција болесника са ПЦКЛ глотисне и супраглотисне регије ларинкса у односу на нодални (N) статус (TNM класификација)

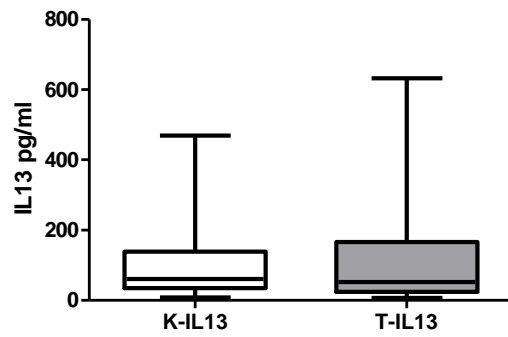
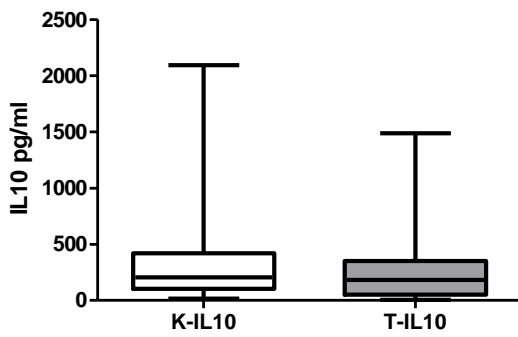
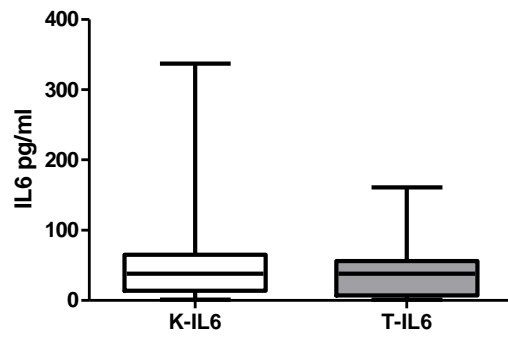
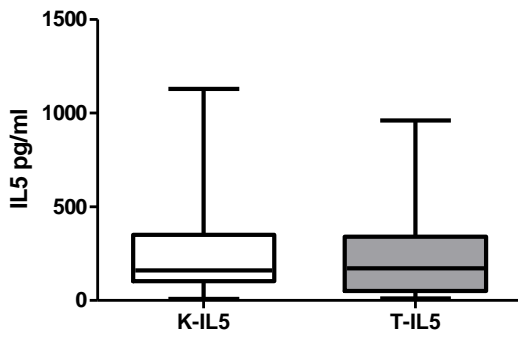
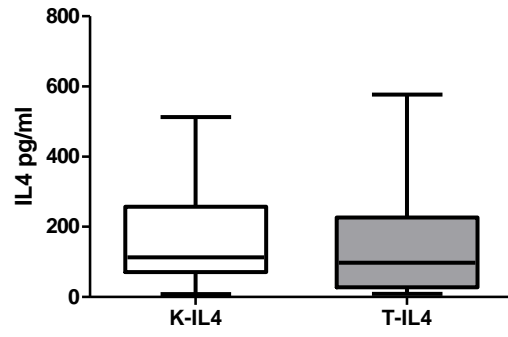
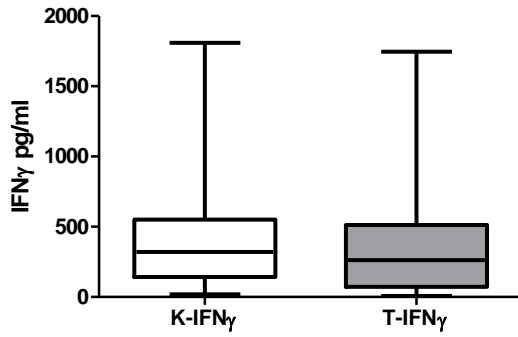
4.2. КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ЦИТОКИНА У СЕРУМУ БОЛЕЛИХ И ЗДРАВИХ ИСПИТАНИКА

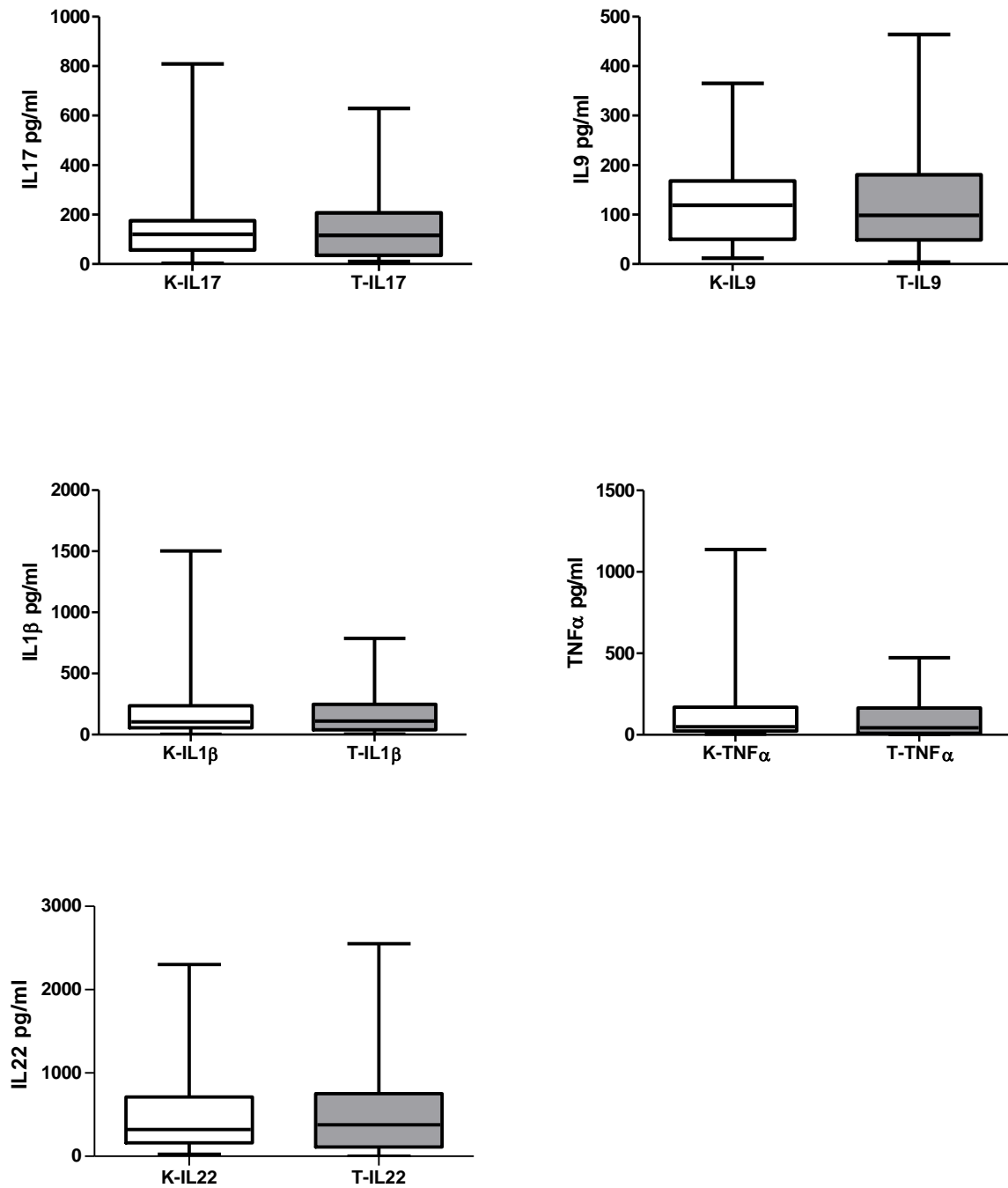
Поређењем средњих вредности концентрација испитиваних цитокина у групи болесника са ПЦКЛ и контролној групи, нисмо нашли статистички значајну разлику ни за један од испитиваних медијатора. Резултати су приказани у Табели 8 и на Слици 9.

Табела 8. Концентрације испитиваних цитокина (*Mean ± SD*) у групи болесника са ПЦКЛ и здравих испитаника. ПЦКЛ- планоцелуларни карцином ларинкса

Цитокин	Концентрација цитокина, <i>Mean ± SD</i> (<i>pg/ml</i>)		Вредност <i>P</i>
	ПЦКЛ	Здрави	
<i>IL-2</i>	217,8 ± 209,6	207,4 ± 190,1	0,8219
<i>IL-12</i>	268,9 ± 317,4	259,0 ± 320,6	0,8193
<i>IFN- γ</i>	374,5 ± 387,4	397,3 ± 401,6	0,5292
<i>IL-4</i>	147,1 ± 142,5	165,6 ± 127,6	0,2593
<i>IL-5</i>	221,7 ± 185,7	263,5 ± 257,6	0,5684
<i>IL-6</i>	39,81 ± 37,17	58,36 ± 76,26	0,4787
<i>IL-10</i>	252,9 ± 291,4	374,8 ± 445,4	0,2530
<i>IL-13</i>	100,2 ± 109,1	103,8 ± 103,5	0,4956
<i>IL-17</i>	137,3 ± 121,5	151,0 ± 150,6	0,6797
<i>IL-9</i>	131,7 ± 102,2	124,8 ± 84,56	0,9762
<i>IL-1β</i>	158,6 ± 156,3	192,3 ± 264,3	0,8185
<i>TNF-α</i>	121,7 ± 144,6	146,1 ± 213,4	0,3236
<i>IL-22</i>	499,7 ± 506,7	525,4 ± 531,3	0,7060







Слика 9. Просечне вредности испитиваних цитокина у групи пацијената са ПЦКЛ и контролној групи. *K*- контроле, *T*- тумор

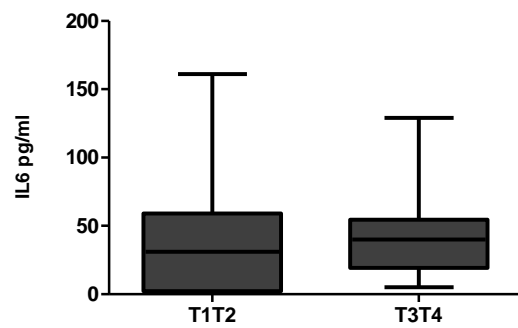
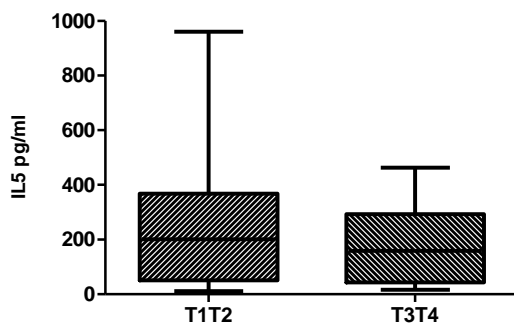
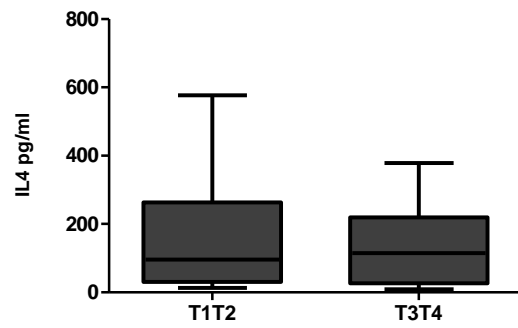
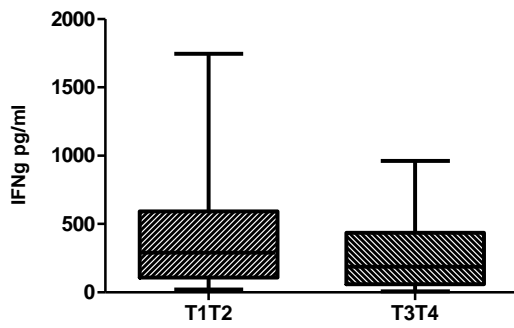
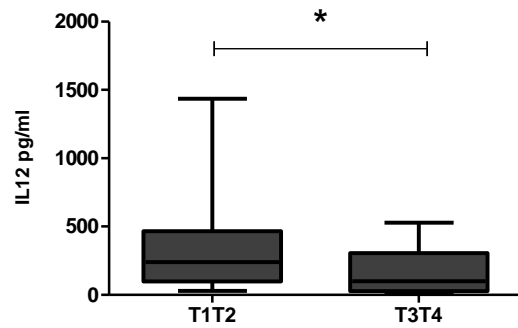
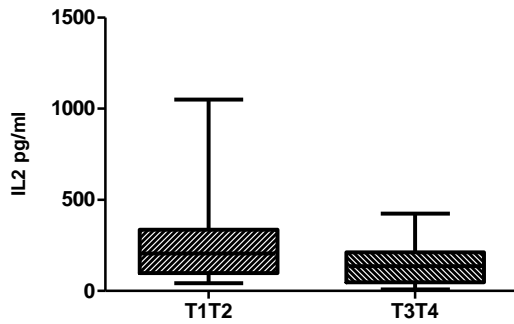
4.3. КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ЦИТОКИНА У СЕРУМУ ОБОЛЕЛИХ ОД ПЦКЛ У ОДНОСУ НА СТАДИЈУМ БОЛЕСТИ

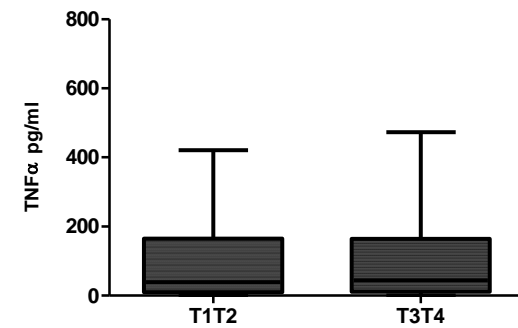
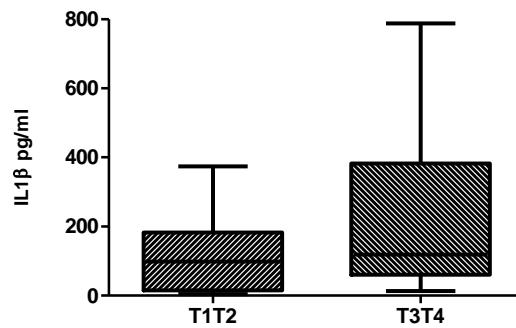
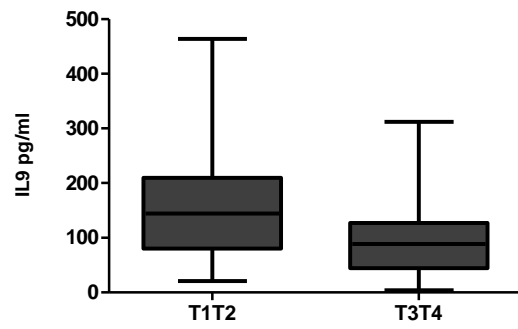
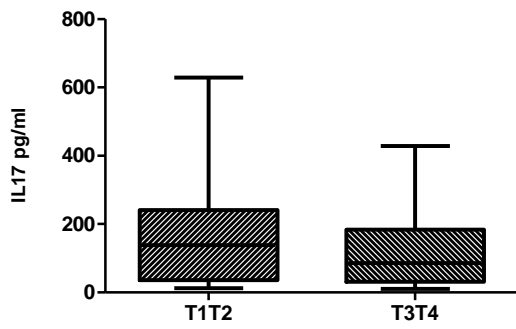
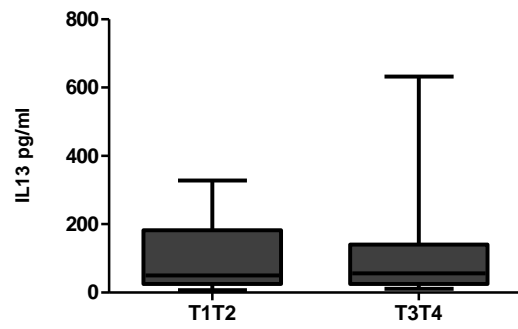
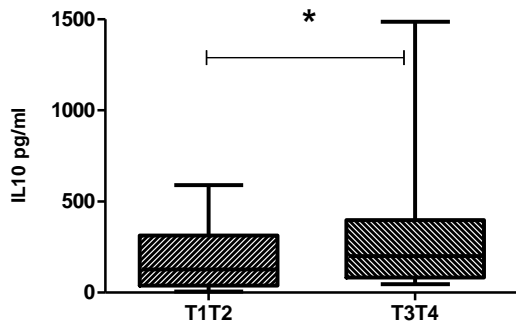
4.3.1. Концентрације цитокина у серуму оболелих у односу на величину примарног тумора

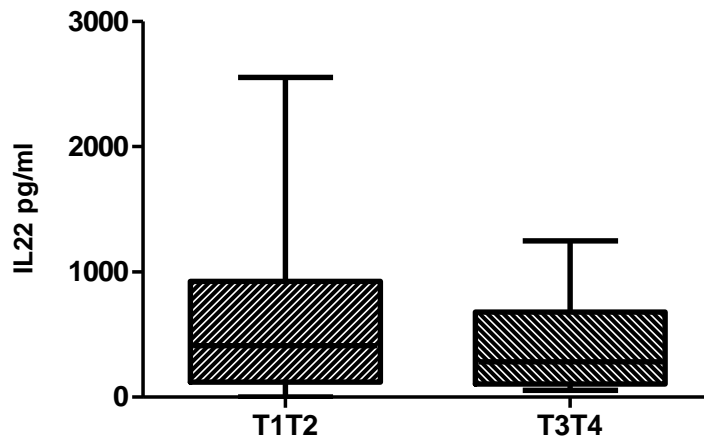
Поређењем средњих вредности цитокина у групи болесника са раним (*T1/T2*) и касним (*T3/T4*) *T* стадијумом ПЦКЛ нађено је да је концентрација цитокина *IL-12* статистички значајно већа у групи болесника са раним *T* стадијумом ($p < 0,05$), док је концентрација *IL-10* статистички значајно већа у групи касног *T* стадијума ПЦКЛ ($p < 0,05$) (Табела 9). Преосталих 11 испитиваних цитокина нису показали статистички значајну разлику концентрација у испитиваним групама. Резултати просечних концентрација у серуму болесника у односу на рани и касни *T* стадијум болести приказани су на Слици 10. Звездицом (*) је обележена статистичка значајност $p < 0,05$.

Табела 9. Концентрације испитиваних цитокина (*Mean ± SD*) код болесника са ПЦКЛ у односу на Т стадијум

Цитокин	Концентрација цитокина, <i>Mean ± SD</i> (<i>pg/ml</i>)		Вредност <i>P</i>
	<i>T1/T2</i>	<i>T3/T4</i>	
<i>IL-2</i>	274,3 ± 254,5	156,7 ± 125,3	0,0698
<i>IL-12</i>	365,5 ± 396,8	168,5 ± 158,7	0,0295
<i>IFN- γ</i>	445,5 ± 454,2	289,4 ± 273,3	0,2301
<i>IL-4</i>	161,7 ± 165,9	130,1 ± 110,4	0,7813
<i>IL-5</i>	240,0 ± 216,2	197,7 ± 137,2	0,7196
<i>IL-6</i>	36,48 ± 38,91	45,05 ± 34,52	0,2205
<i>IL-10</i>	180,9 ± 169,4	344,6 ± 381,5	0,0383
<i>IL-13</i>	95,09 ± 90,78	106,7 ± 130,7	0,6817
<i>IL-17</i>	150,3 ± 134,4	122,3 ± 105,2	0,4697
<i>IL-9</i>	157,3 ± 112,9	102,2 ± 80,48	0,0733
<i>IL-1β</i>	120,9 ± 112,1	209,3 ± 192,5	0,0662
<i>TNF-α</i>	115,2 ± 134,3	129,1 ± 158,0	0,7970
<i>IL-22</i>	570,0 ± 589,9	406,8 ± 360,6	0,5300







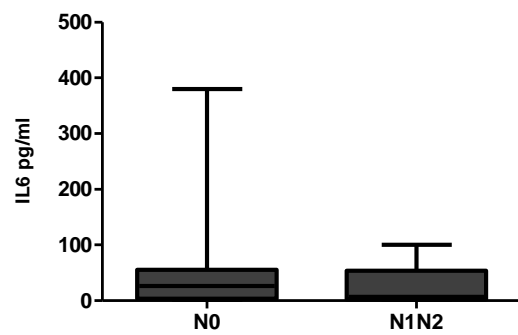
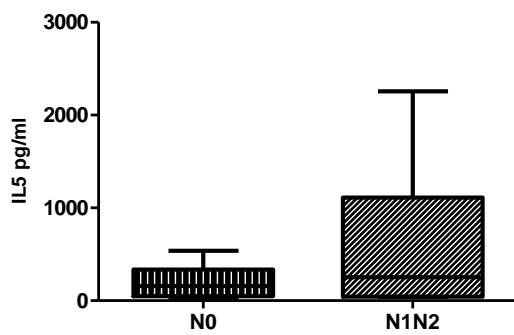
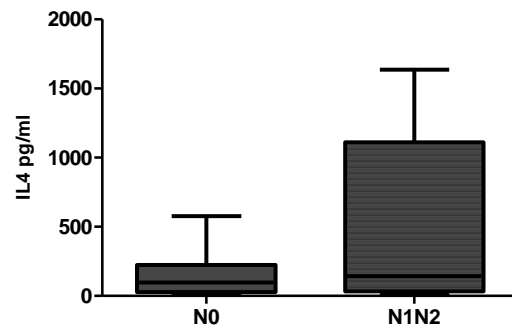
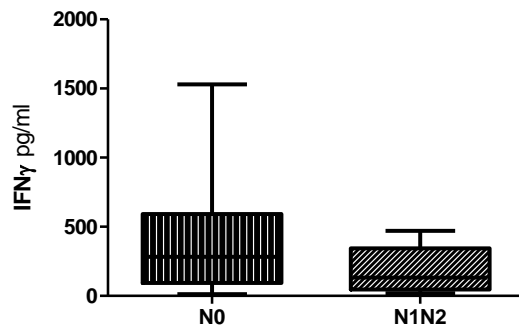
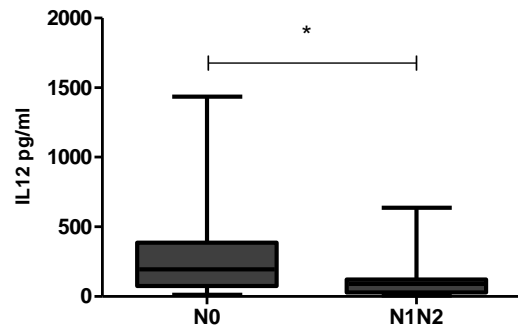
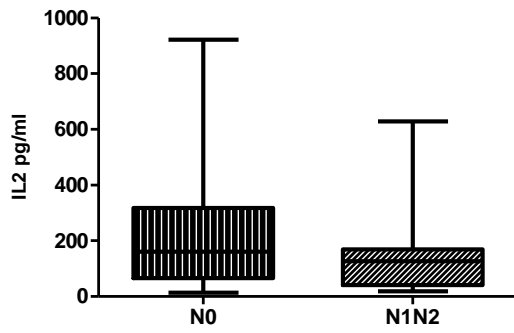
Слика 10. Просечне вредности цитокина у раном ($T1/T2$) и касном ($T3/T4$) T стадијуму ПЦКЛ

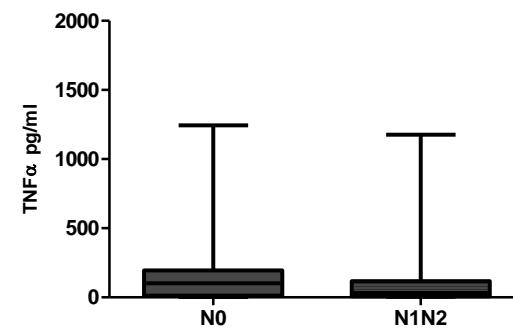
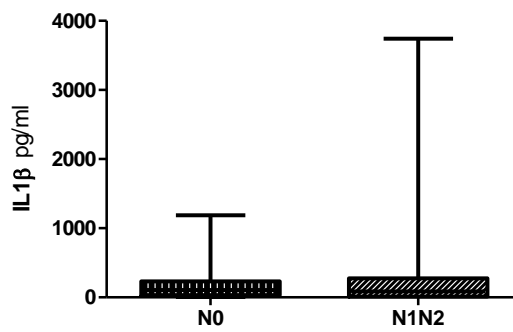
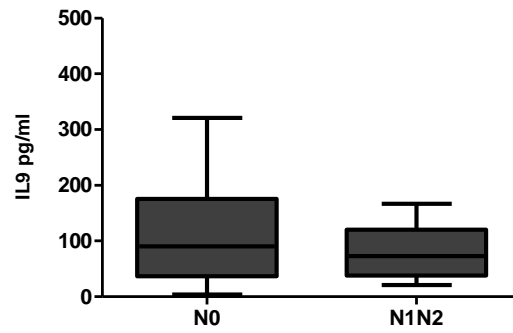
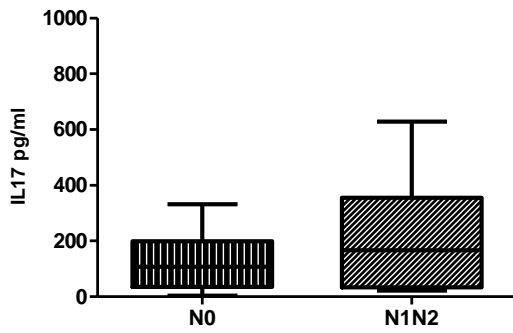
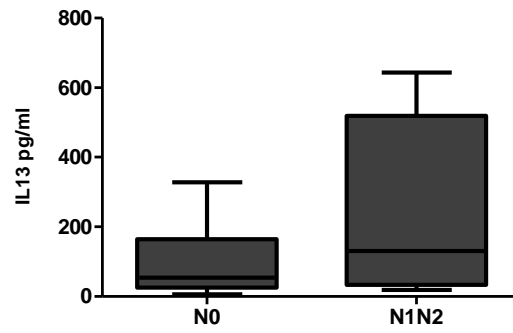
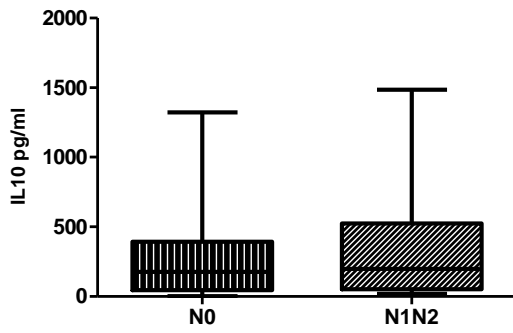
4.3.2. Концентрације цитокина у серуму оболелих у односу на присуство регионалних метастаза

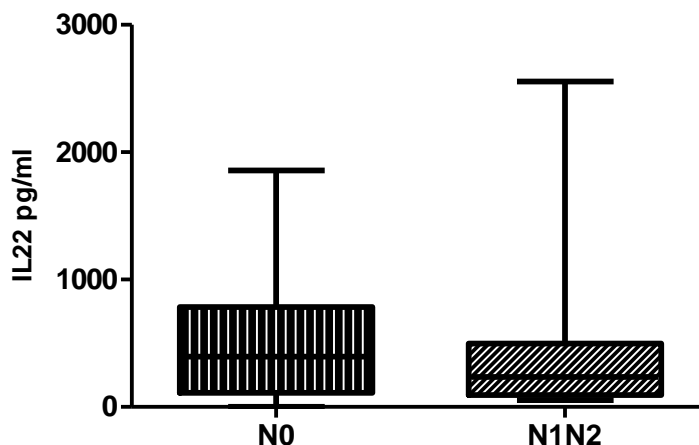
Испитивање средњих концентрација цитокина у серуму оболелих од ПЦКЛ у односу на присуство регионалних метастаза показало је статистички значајно нижу концентрацију $IL-12$ ($p < 0,05$) у групи болесника са радиографски и/или патохистолошки дијагностикованим метастатским променама на врату (Табела 10). Просечне вредности испитиваних цитокина у односу на регионалну проширеност болести приказане су на Слици 11. Звездицом (*) је обележена статистичка значајност $p < 0,05$.

Табела 10. Концентрације испитиваних цитокина (*Mean ± SD*) код болесника са ПЦКЛ у односу на нодални (*N*) стадијум болести.

Цитокин	Концентрација цитокина, <i>Mean ± SD</i> (<i>pg/ml</i>)		Вредност <i>P</i>
	<i>N0</i>	<i>N1/N2</i>	
<i>IL-2</i>	207,3 ± 188,2	164,1 ± 183,2	0,3564
<i>IL-12</i>	280,0 ± 295,0	128,4 ± 164,8	0,0249
<i>IFN-γ</i>	394,4 ± 375,1	183,1 ± 167,3	0,0774
<i>IL-4</i>	146,0 ± 142,3	483,8 ± 622,9	0,1774
<i>IL-5</i>	200,6 ± 157,7	556,5 ± 724,6	0,3023
<i>IL-6</i>	43,19 ± 62,15	28,91 ± 38,56	0,4128
<i>IL-10</i>	272,1 ± 315,1	436,2 ± 535,1	0,4248
<i>IL-13</i>	93,19 ± 85,72	233,3 ± 253,2	0,1842
<i>IL-17</i>	123,0 ± 96,92	216,0 ± 211,0	0,2499
<i>IL-9</i>	114,4 ± 88,95	79,80 ± 48,23	0,4524
<i>IL-1β</i>	164,2 ± 209,8	426,1 ± 1052	0,9926
<i>TNF-α</i>	155,6 ± 216,5	184,7 ± 362,0	0,5058
<i>IL-22</i>	487,4 ± 454,6	468,3 ± 698,8	0,5358







Слика 11. Просечне вредности цитокина код пацијената са ПЦКЛ без (*N0*) регионалних метастаза и са регионалним метастазама на врату (*N1/N2*).

4.4. КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ЦИТОКИНА У СЕРУМУ ОБОЛЕЛИХ У ОДНОСУ НА КЛИНИЧКО-ПАТОЛОШКЕ ПАРАМЕТРЕ

4.4.1. Концентрације цитокина у серуму оболелих у односу на субрегион ларинкса

Поредећи просечне концентрације раног (*T1/T2*) и касног (*T3/T4*) *T* стадијума болести у односу на субрегион ларинкса (супраглотис или глотис) добијени су потпуно другачији резултати. У раном *T* стадијуму болести (*T1/T2*), пацијенти са супраглотисним карциномима ларинкса имали су статистички значајно више концентрације цитокина *IL-12*, *IL-9*, *IL-10*, *IL-13*, *IL-1β* ($p < 0,05$) и *IL-6* ($p < 0,01$). Просечне концентрације испитиваних цитокина уз стандардне девијације (*SD*) приказане су у Табели 11.

Табела 11. Просечне вредности цитокина (*Mean ± SD*) болесника раног Т стадијума у односу на субрегион ларинкса.

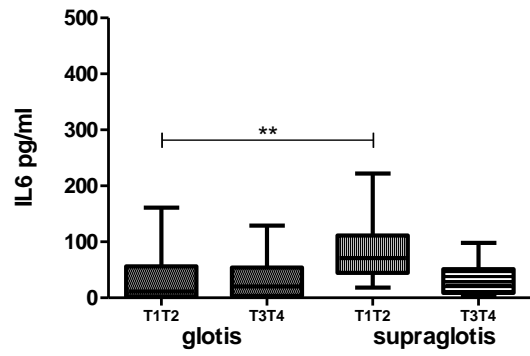
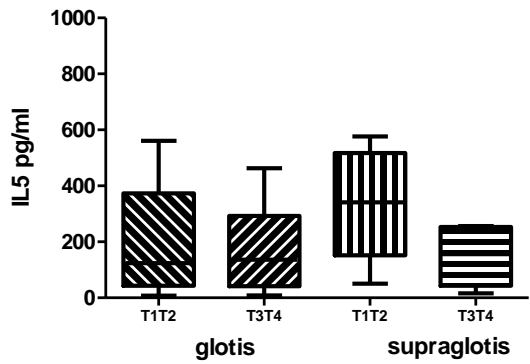
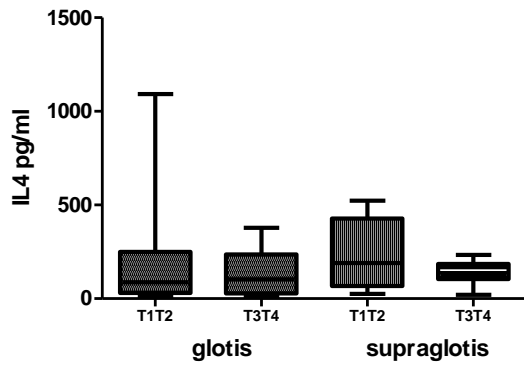
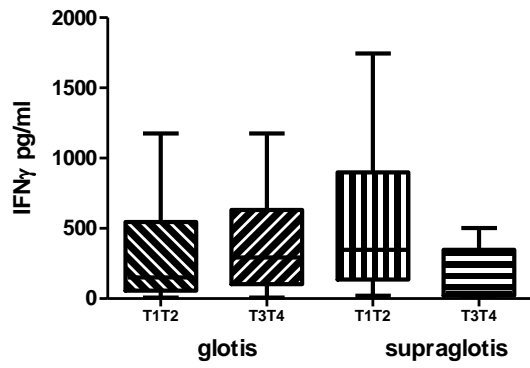
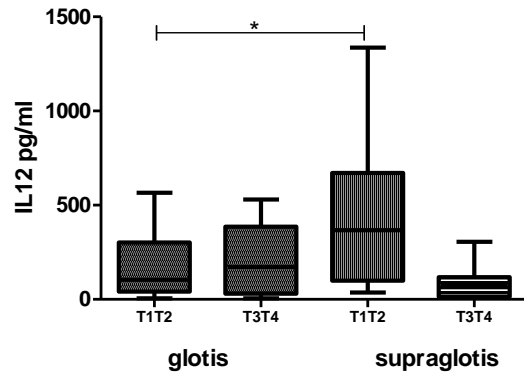
Цитокин	Концентрација цитокина Т1/Т2 стадијума, <i>Mean ± SD</i> (pg/ml)		Вредност <i>P</i>
	Супраглотис	Глотис	
<i>IL-2</i>	195,6 ± 114,7	249,5 ± 250,1	0,5109
<i>IL-12</i>	477,0 ± 461,7	169,5 ± 175,0	0,0430
<i>IFN- γ</i>	394,4 ± 375,1	183,1 ± 167,3	0,0774
<i>IL-4</i>	233,7 ± 187,5	183,1 ± 259,3	0,2115
<i>IL-5</i>	321,2 ± 184,2	197,0 ± 180,8	0,0909
<i>IL-6</i>	83,78 ± 60,34	35,00 ± 43,80	0,0094
<i>IL-10</i>	377,6 ± 391,4	161,6 ± 168,0	0,0493
<i>IL-13</i>	152,0 ± 109,4	86,00 ± 88,93	0,0361
<i>IL-17</i>	178,8 ± 179,0	114,1 ± 98,15	0,4770
<i>IL-9</i>	191,2 ± 111,5	105,6 ± 98,52	0,0332
<i>IL-1β</i>	165,4 ± 136,2	86,00 ± 88,93	0,0410
<i>TNF-α</i>	209,0 ± 200,2	123,3 ± 154,6	0,0950
<i>IL-22</i>	640,9 ± 559,3	500,9 ± 525,1	0,4210

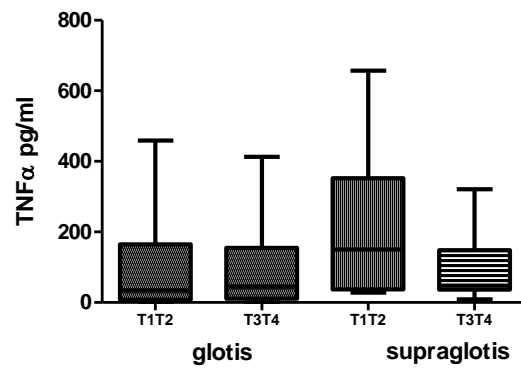
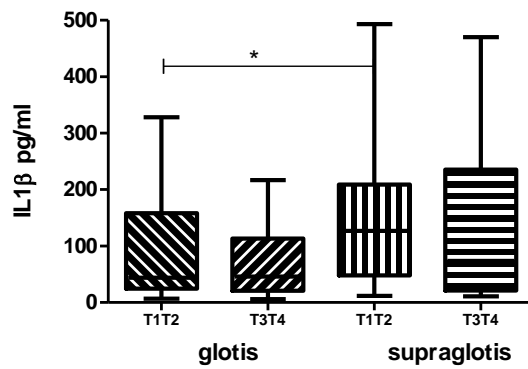
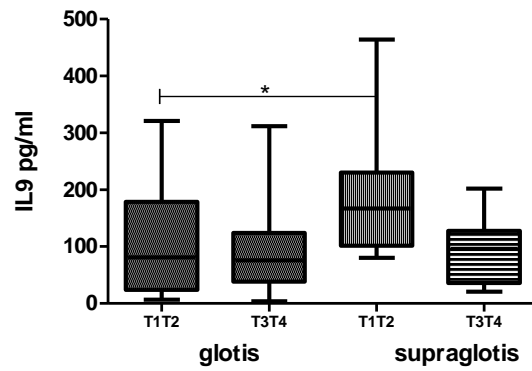
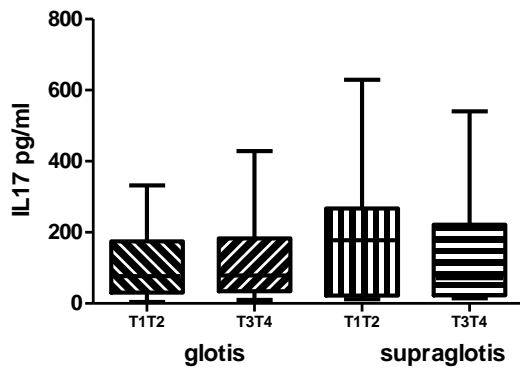
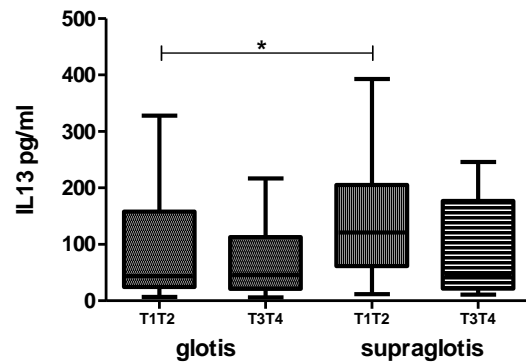
Поређећи средње вредности серумских концентрација цитокина код болесника касног (Т3/Т4) Т стадијума болести нисмо нашли статистички значајну разлику у односу на субрегион ларинкса (Табела 12).

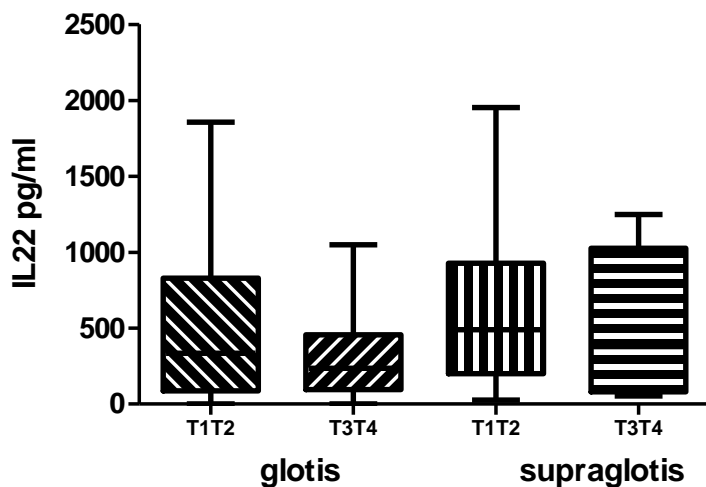
Табела 12. Просечне вредности цитокина (*Mean ± SD*) болесника касног *T* стадијума у односу на субрегион ларинкса

Цитокин	Концентрација цитокина <i>T3/T4</i> стадијума, <i>Mean ± SD (pg/ml)</i>		Вредност <i>P</i>
	Супраглотис	Глотис	
<i>IL-2</i>	259,1 ± 223,7	161,2 ± 129,3	0.3527
<i>IL-12</i>	98,86 ± 100,3	188,8 ± 168,8	0.3856
<i>IFN- γ</i>	394,4 ± 375,1	183,1 ± 167,3	0.0774
<i>IL-4</i>	134,6 ± 64,07	139,7 ± 121,8	0.7388
<i>IL-5</i>	146,6 ± 92,50	177,9 ± 154,3	0.9079
<i>IL-6</i>	33,11 ± 30,44	34,42 ± 37,21	0,7866
<i>IL-10</i>	366,1 ± 439,2	172,7 ± 163,1	0.4103
<i>IL-13</i>	88,00 ± 89,09	72,42 ± 66,16	0.8525
<i>IL-17</i>	139,3 ± 163,4	124,1 ± 112,3	1,0000
<i>IL-9</i>	92,33 ± 57,85	101,6 ± 88,53	0,8439
<i>IL-1β</i>	140,9 ± 159,2	72,42 ± 66,16	0,5068
<i>TNF-α</i>	92,00 ± 105,5	110,5 ± 135,7	0,7299
<i>IL-22</i>	525,4 ± 475,1	330,7 ± 295,1	0,4105

Сумарни приказ концентрација испитиваних цитокина у односу на *T* стадијум болести и субрегион ларинкса приказана је на Слици 12. Звездицом (*) су обележене статистичке значајности $p < 0,05$, док две звездице (**) означавају статистичку значајност $p < 0,01$.







Слика 12. Просечне вредности испитиваних цитокина у раном ($T1/T2$) и касном ($T3/T4$) T стадијуму болести у односу на субрегион ларинкса

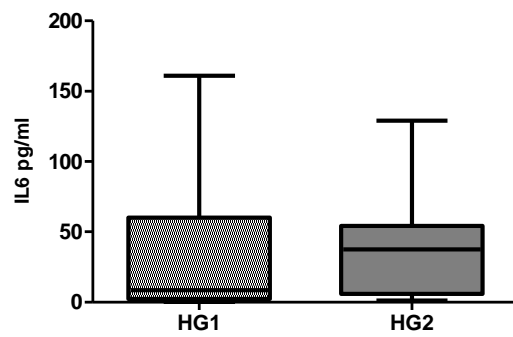
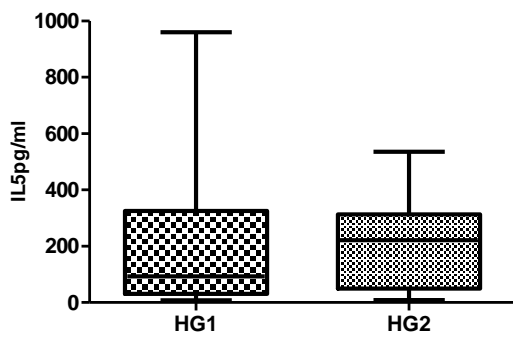
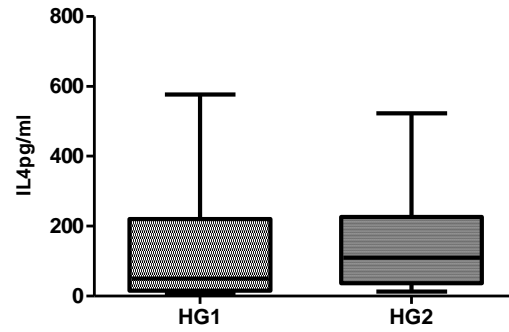
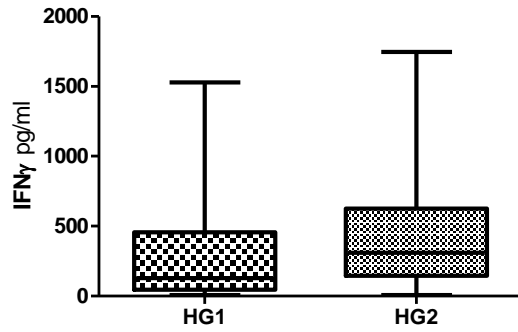
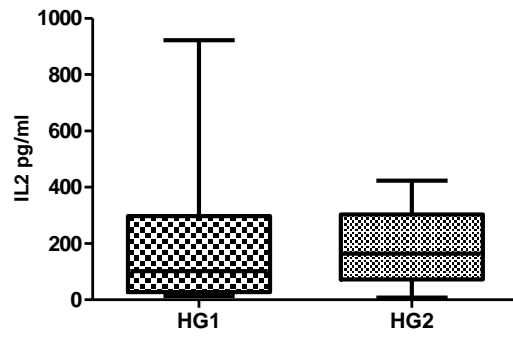
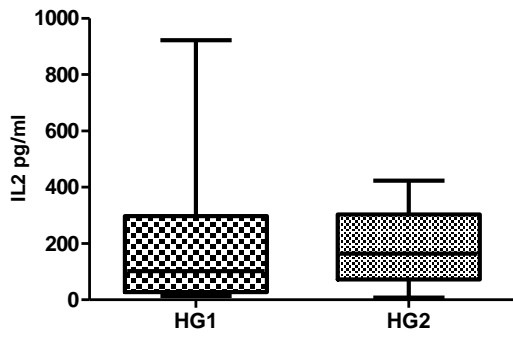
4.4.2. Концентрације цитокина у серуму оболелих у односу на хистолошки градус тумора

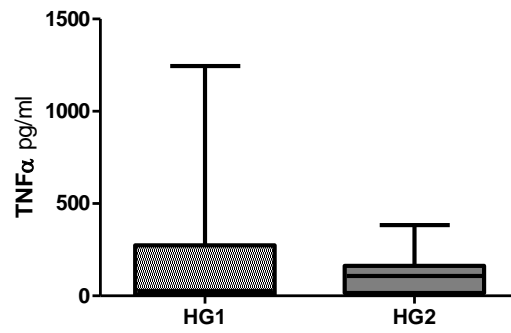
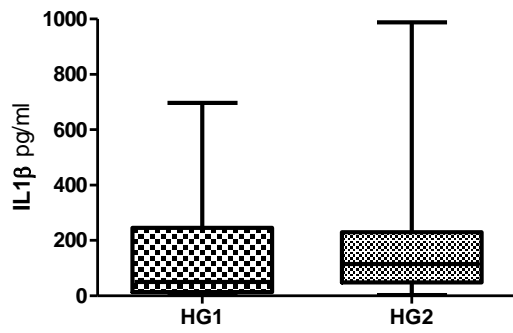
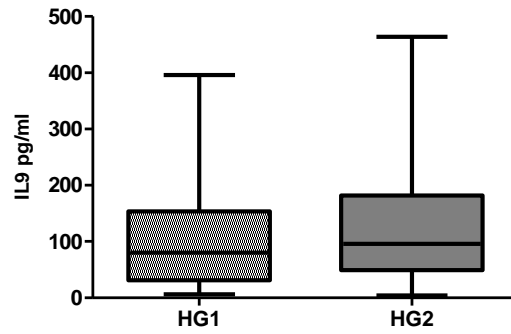
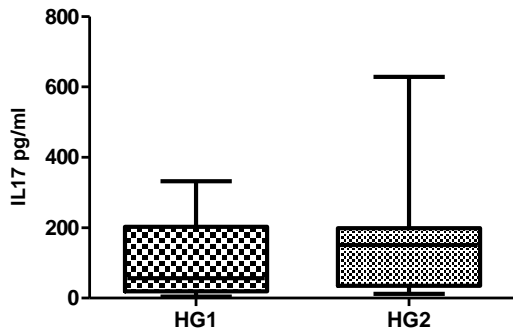
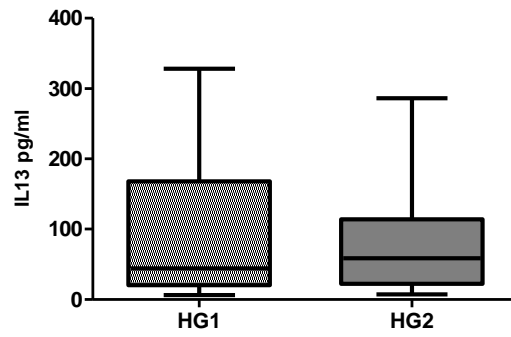
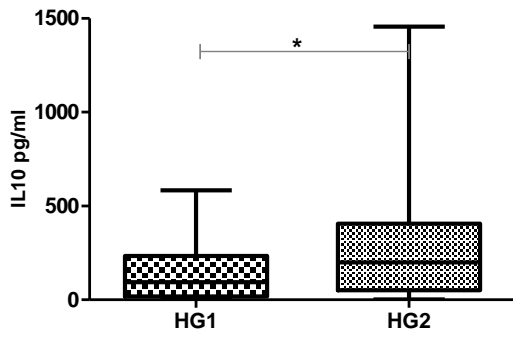
Све пацијенте са ПЦКЛ поделили смо у групу *HG* (*histological grade*) 1- добро диферентован тумор и *HG2*- умерено диферентован тумор. Међу испитаницима није било пацијената са хистолошким градусом *HG3* (слабо диферентовани тумор). Статистичка анализа показала је да су код пацијената са умерено диферентованим ПЦКЛ (*HG2*) статистички значајно више концентрације *IL-10* и *IL-22* ($p < 0,05$) у односу на болеснике са добро диферентованим туморима (*HG1*). Резултати су приказани у Табели 13.

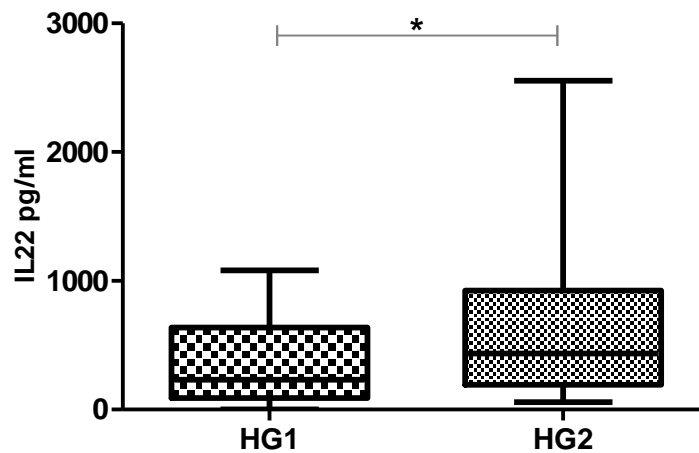
Табела 13. Просечне вредности цитокина (*Mean ± SD*) у односу на хистолошку диферентованост тумора

Цитокин	Концентрација цитокина, <i>Mean ± SD</i> (<i>pg/ml</i>)		Вредност <i>P</i>
	<i>HG1</i>	<i>HG2</i>	
<i>IL-2</i>	208,3 ± 237,1	183,9 ± 122,3	0,3751
<i>IL-12</i>	258,5 ± 364,0	266,4 ± 313,3	0,3144
<i>IFN-γ</i>	328,1 ± 412,6	435,9 ± 404,5	0,1135
<i>IL-4</i>	126,5 ± 151,0	151,7 ± 135,2	0,1458
<i>IL-5</i>	188,9 ± 217,9	217,0 ± 155,8	0,2160
<i>IL-6</i>	33,71 ± 44,39	35,57 ± 30,94	0,3184
<i>IL-10</i>	148,7 ± 164,0	306,2 ± 332,0	0,0249
<i>IL-13</i>	89,39 ± 92,15	86,27 ± 75,07	0,6462
<i>IL-17</i>	104,3 ± 100,3	154,8 ± 135,1	0,1252
<i>IL-9</i>	106,9 ± 102,4	130,6 ± 100,5	0,1880
<i>IL-1β</i>	135,0 ± 169,3	171,3 ± 193,0	0,2249
<i>TNF-α</i>	184,9 ± 322,5	122,2 ± 122,0	0,4042
<i>IL-22</i>	355,3 ± 339,0	612,6 ± 561,9	0,0367

Вредности испитиваних цитокина у односу на хистолошку диферентованост тумора приказане су на Слици 13. Звездицом (*) су приказане статистичке значајности $p < 0,05$.







Слика 13. Просечне вредности испитиваних цитокина у односу на хистолошки градус тумора. *HG1*- хистолошки градус 1, *HG2*- хистолошки градус 2.

4.5. КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ЦИТОКИНА У СЕРУМУ ИСПИТАНИКА У ОДНОСУ НА ПУШЕЊЕ ЦИГАРЕТА И УПОТРЕБУ АЛКОХОЛА

4.5.1. Дистрибуција испитаника у односу на пушење цигарета и употребу алкохола

Дистрибуција испитаника према томе да ли су пушачи и да ли злоупотребљавају алкохол приказана је у Табели 14.

Табела 14. Дистрибуција испитаника у односу на пушење цигарета и злоупотребу алкохола

Група	Пушење		Алкохол	
	ДА	НЕ	ДА	НЕ
ПЦКЛ	40	19	18	41
Контроле	14	30	6	38
Укупно	54	49	24	79

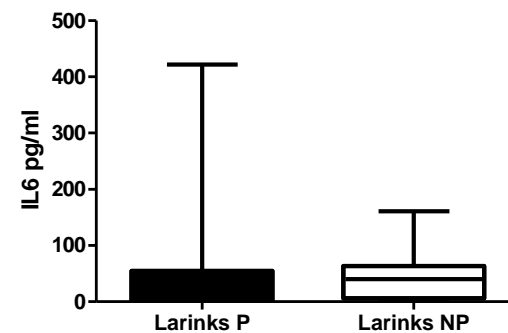
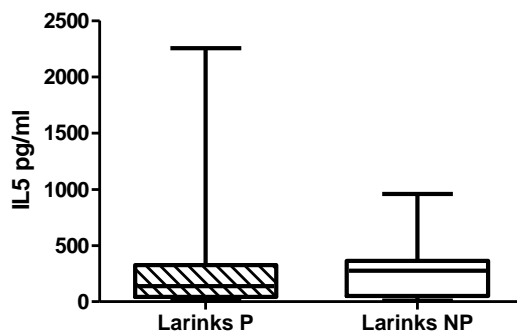
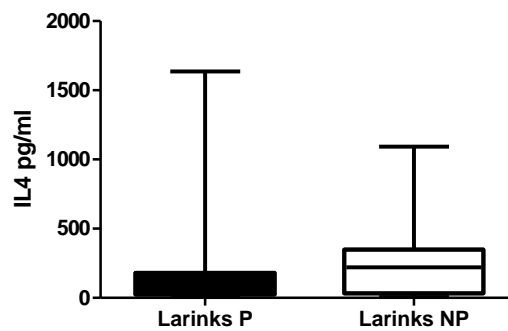
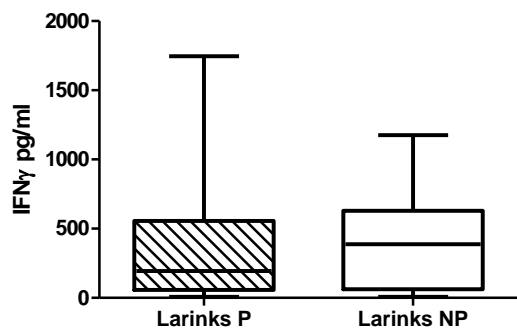
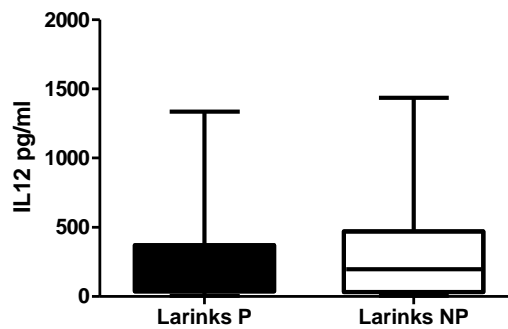
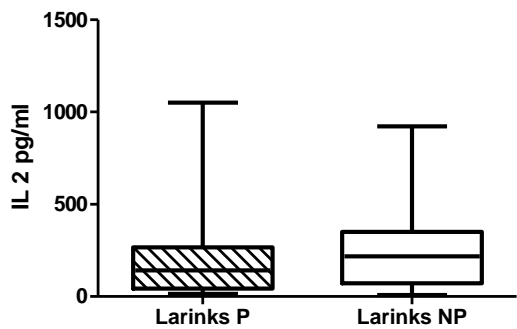
4.5.2. Концентрације цитокина у серуму испитаника у односу на пушење цигарета.

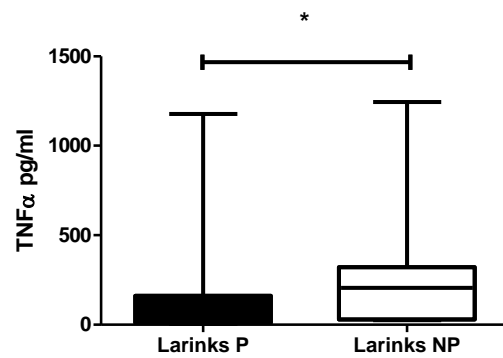
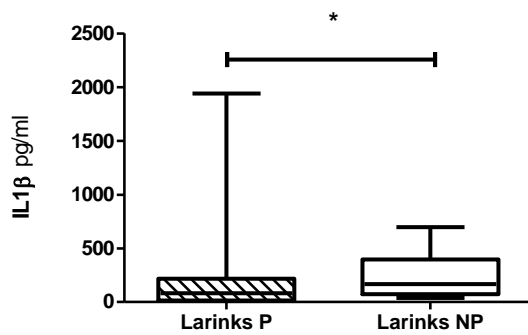
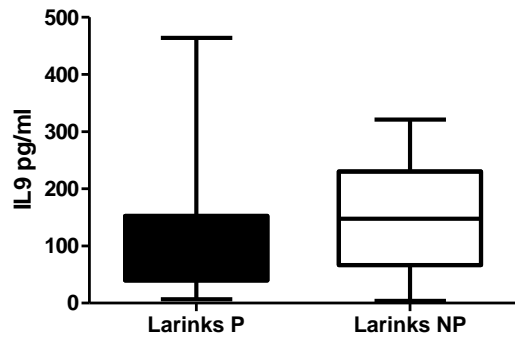
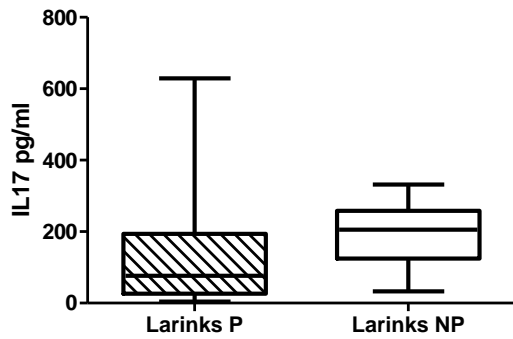
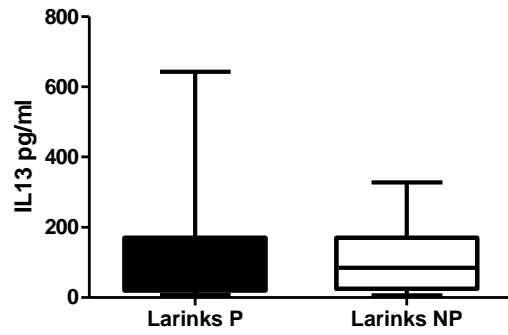
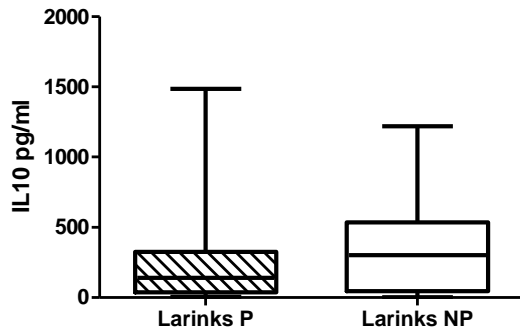
4.5.2.1. Концентрације цитокина оболелих у односу на пушење цигарета.

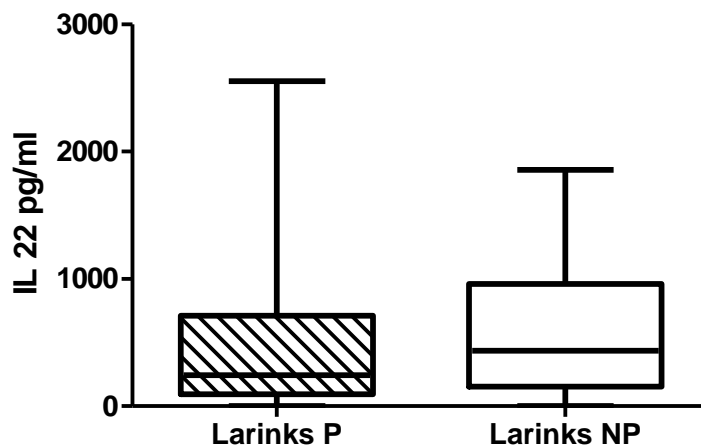
Статистичка анализа концентрације цитокина оболелих од ПЦКЛ у односу на пушење цигарета показала је да су код пушача статистички значајно ниже ($p < 0,05$) концентрације цитокина $IL-1\beta$ и $TNF-\alpha$, док су за вредности $IL-17$ постоји гранична статистичка значајност ($p = 0,067$). Вредности концентрације цитокина оболелих у односу на пушење приказани су у Табели 15 и на Слици 14.

Табела 15. Просечне вредности концентрације испитиваних цитокина оболелих од ПЦКЛ у односу на пушење цигарета.

Цитокин	Концентрација цитокина оболелих, <i>Mean ± SD (pg/ml)</i> у односу на ПУШЕЊЕ		Вредност <i>P</i>
	ДА	НЕ	
<i>IL-2</i>	191,3 ± 205,0	266,6 ± 241,5	0,2262
<i>IL-12</i>	248,5 ± 342,5	301,7 ± 334,4	0,2770
<i>IFN- γ</i>	378,7 ± 438,2	422,5 ± 360,6	0,4596
<i>IL-4</i>	188,3 ± 342,8	239,8 ± 262,8	0,1100
<i>IL-5</i>	256,2 ± 406,8	259,5 ± 230,5	0,3899
<i>IL-6</i>	39,40 ± 69,54	45,56 ± 48,16	0,4336
<i>IL-10</i>	282,3 ± 395,4	318,1 ± 306,6	0,3184
<i>IL-13</i>	107,9 ± 145,4	105,3 ± 91,03	0,5868
<i>IL-17</i>	131,7 ± 143,8	189,2 ± 99,40	0,0670
<i>IL-9</i>	109,8 ± 102,2	146,1 ± 100,7	0,1555
<i>IL-1β</i>	191,3 ± 351,9	247,7 ± 199,3	0,0450
<i>TNF-α</i>	143,2 ± 231,3	282,2 ± 343,7	0,0304
<i>IL-22</i>	454,7 ± 524,2	560,9 ± 478,5	0,2363







Слика 14. Поређење вредности концентрације цитокина пушача и непушача оболелих од ПЦКЛ. *P*- пушачи, *NP*- непушачи.

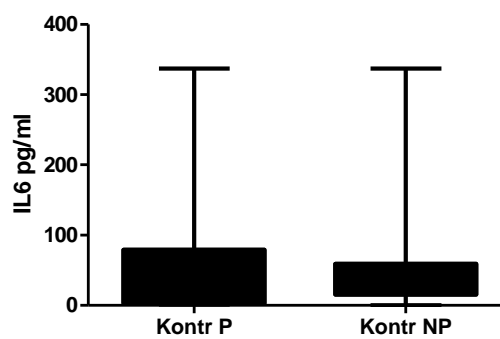
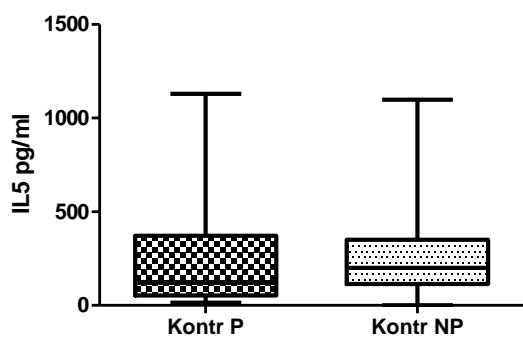
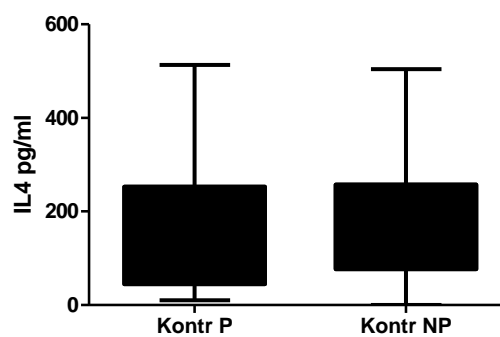
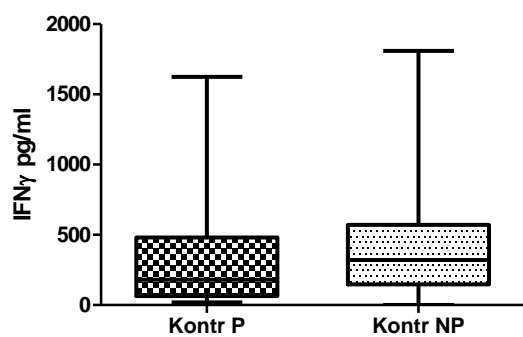
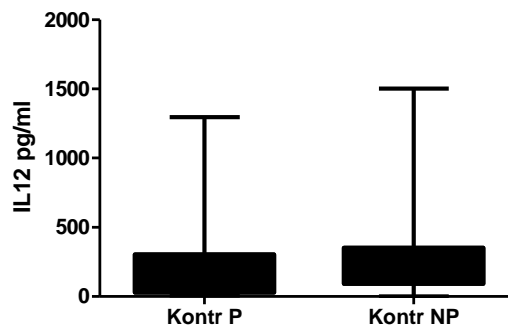
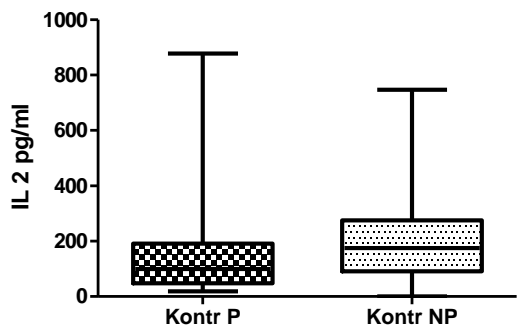
4.5.2.2. Концентрације цитокина здравих у односу на пушење цигарета.

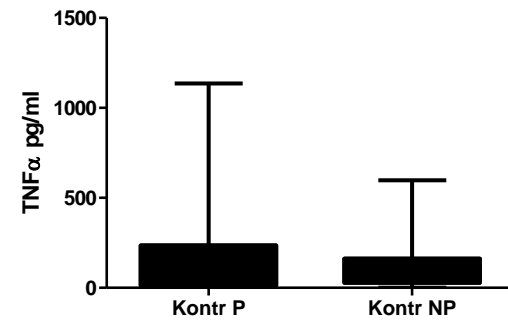
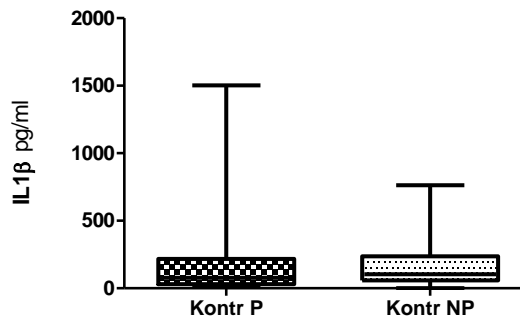
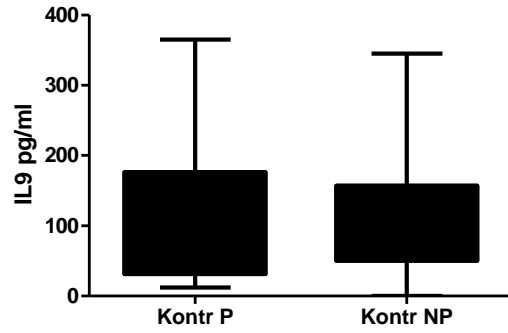
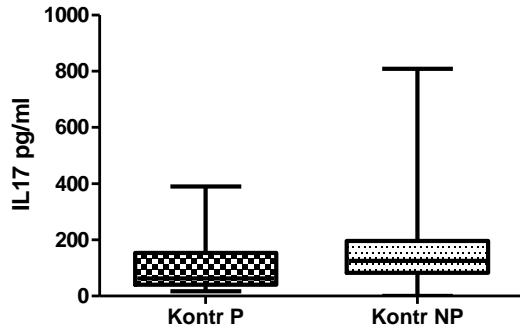
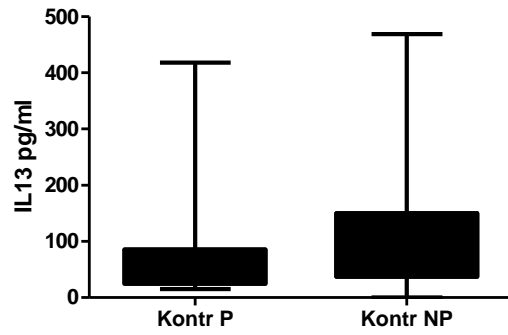
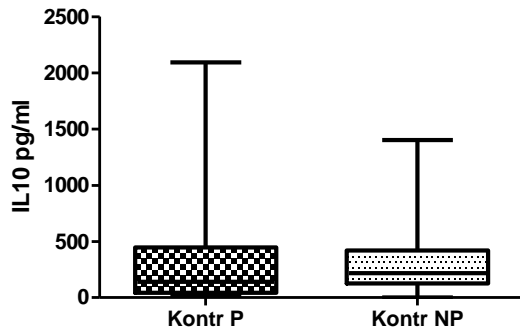
Код здравих испитаника који су учествовали у студији статистичком обрадом података нисмо нашли разлику концентрација испитиваних цитокина у односу на пушење цигарета (Табела 16).

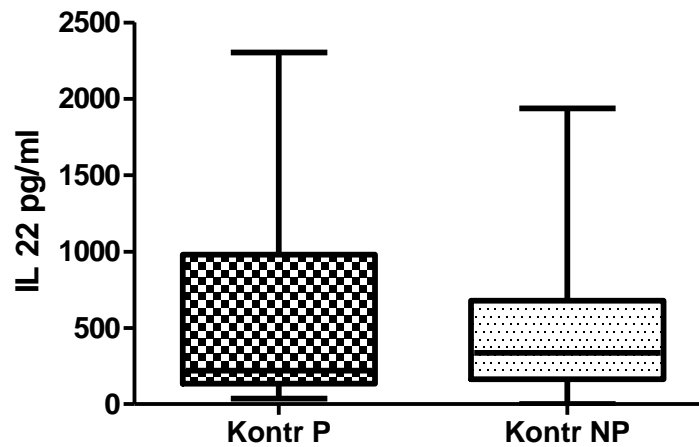
Табела 16. Концентрације цитокина испитиваних цитокина здравих у односу на пушење цигарета

Цитокин	Концентрација цитокина здравих, <i>Mean</i> ± <i>SD</i> (pg/ml) у односу на ПУШЕЊЕ		Вредност <i>P</i>
	ДА	НЕ	
<i>IL-2</i>	185,0 ± 239,1	209,1 ± 164,7	0,1586
<i>IL-12</i>	237,9 ± 339,8	256,8 ± 310,3	0,5080
<i>IFN-γ</i>	394,1 ± 491,9	383,1 ± 355,3	0,4327
<i>IL-4</i>	158,8 ± 148,3	161,1 ± 119,5	0,5812
<i>IL-5</i>	250,1 ± 311,4	259,0 ± 230,8	0,2543
<i>IL-6</i>	53,93 ± 91,18	55,42 ± 67,81	0,1895
<i>IL-10</i>	386,3 ± 589,6	352,9 ± 363,2	0,3515
<i>IL-13</i>	83,93 ± 105,4	107,8 ± 102,1	0,2974
<i>IL-17</i>	106,1 ± 97,54	165,6 ± 165,1	0,1138
<i>IL-9</i>	112,7 ± 96,83	124,7 ± 80,50	0,4620
<i>IL-1β</i>	239,3 ± 408,4	161,6 ± 158,4	0,5812
<i>TNF-α</i>	178,8 ± 312,7	120,0 ± 142,1	0,7314
<i>IL-22</i>	591,1 ± 690,8	458,1 ± 437,2	0,9511

Графички приказ концентрација цитокина здравих испитаника у односу на пушење цигарета налази се на Слици 15.







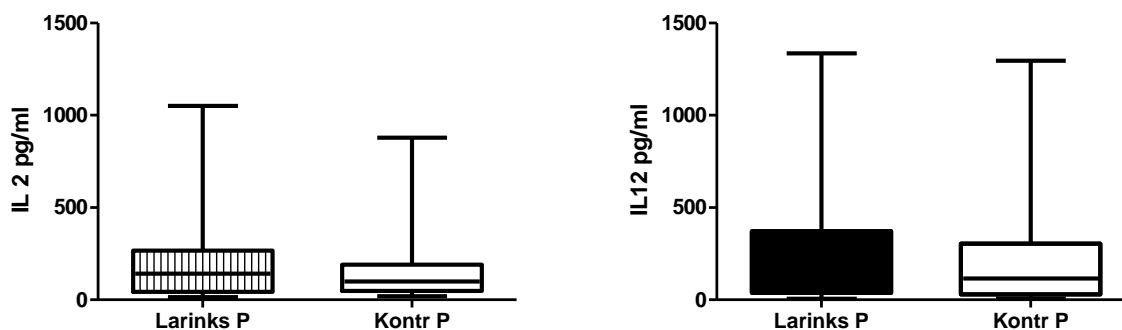
Слика 15. Вредности цитокина здравих испитаника у односу на пушење цигарета. *P*-пушачи, *NP*- непушачи

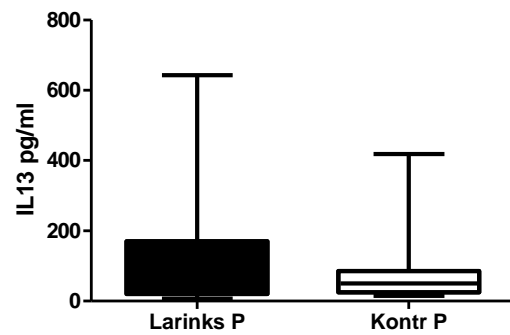
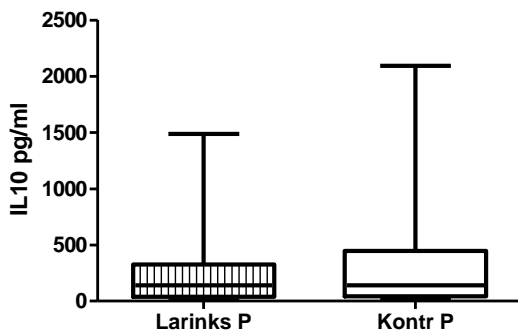
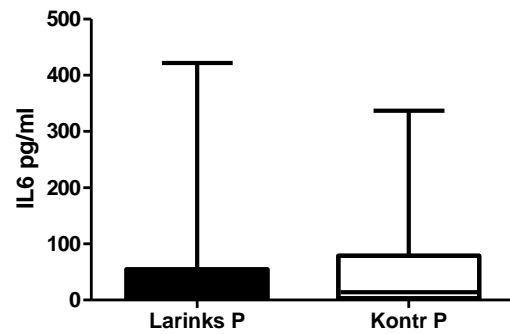
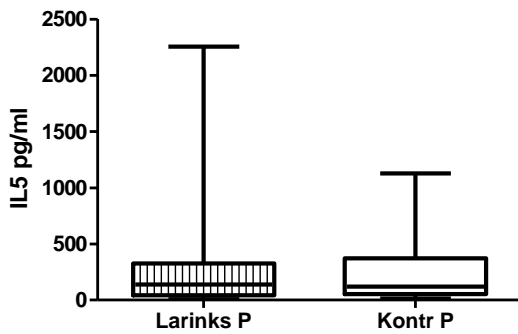
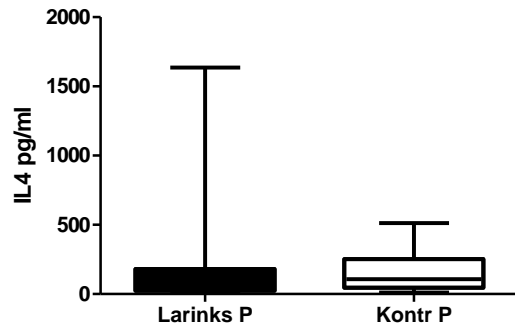
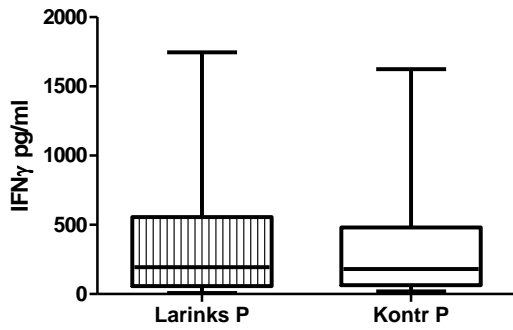
4.5.2.3. Концентрације цитокина пушача оболелих од ПЦКЛ и здравих

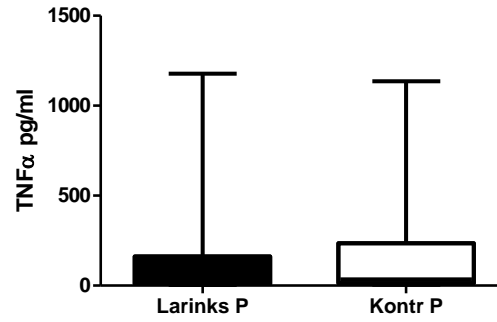
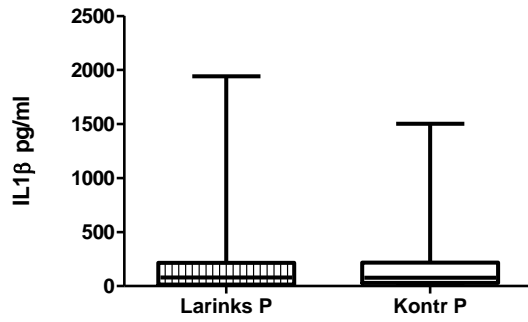
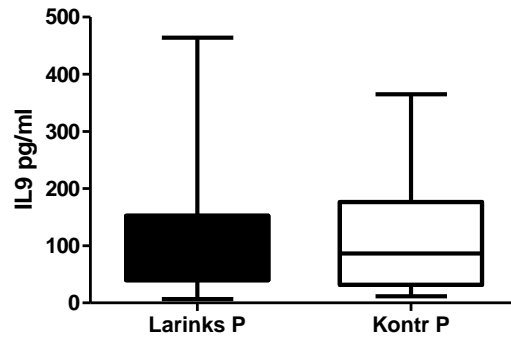
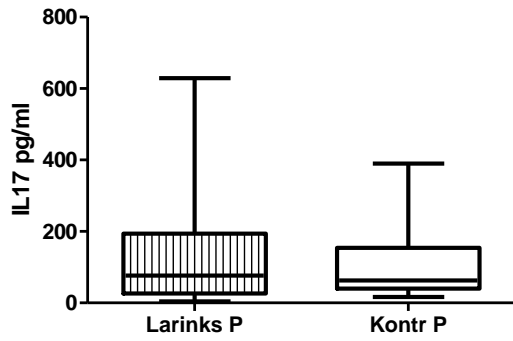
Испитивањем концентрација цитокина пушача оболелих од ПЦКЛ и здравих пушача (контроле) нисмо нашли статистички значајну разлику. Резултати су приказани у Табели 17 и графички на Слици 16.

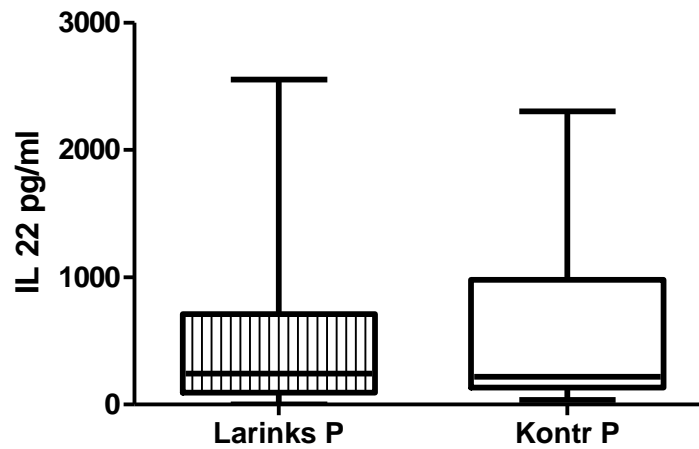
Табела 17. Концентрације цитокина пушача оболелих од ПЦКЛ и здравих пушача.

Цитокин	Концентрација цитокина пушача, <i>Mean ± SD (pg/ml)</i>		Вредност <i>P</i>
	ПЦКЛ	КОНТРОЛЕ	
<i>IL-2</i>	191,3 ± 205,0	185,0 ± 239,1	0,6498
<i>IL-12</i>	248,5 ± 342,5	237,9 ± 339,8	0,9606
<i>IFN-γ</i>	378,7 ± 438,2	394,1 ± 491,9	0,9057
<i>IL-4</i>	188,3 ± 342,8	158,8 ± 148,3	0,4958
<i>IL-5</i>	256,2 ± 406,8	250,1 ± 311,4	0,8127
<i>IL-6</i>	39,40 ± 69,54	53,93 ± 91,18	0,7894
<i>IL-10</i>	282,3 ± 395,4	386,3 ± 589,6	0,8281
<i>IL-13</i>	107,9 ± 145,4	83,93 ± 105,4	0,9214
<i>IL-17</i>	131,7 ± 143,8	106,1 ± 97,54	0,9528
<i>IL-9</i>	109,8 ± 102,2	112,7 ± 96,83	0,8128
<i>IL-1β</i>	191,3 ± 351,9	239,3 ± 408,4	0,6711
<i>TNF-α</i>	143,2 ± 231,3	178,8 ± 312,7	0,7002
<i>IL-22</i>	454,7 ± 524,2	591,1 ± 690,8	0,6147









Слика 16. Концентрације цитокина пушача са ПЦКЛ и здравих пушача. *Larinks P*- пушачи са ПЦКЛ, *Kontr P*- здрави пушачи.

4.5.3. Концентрације цитокина у серуму испитаника у односу на злоупотребу алкохола

4.5.3.1. Концентрације цитокина оболелих у односу на злоупотребу алкохола.

Статистичка анализа није показала разлику испитиваних цитокина оболелих од ПЦКЛ у односу на злоупотребу алкохола (Табела 18).

Табела 18. Концентрације цитокина оболелих од ПЦКЛ у односу на злоупотребу алкохола.

Цитокин	Концентрација цитокина оболелих, <i>Mean ± SD (pg/ml)</i> у односу на злоупотребу АЛКОХОЛА		Вредност <i>P</i>
	ДА	НЕ	
<i>IL-2</i>	202,5 ± 179,8	216,4 ± 232,9	0,9017
<i>IL-12</i>	205,5 ± 188,8	292,0 ± 384,8	0,8952
<i>IFN-γ</i>	399,2 ± 358,8	382,6 ± 436,0	0,6041
<i>IL-4</i>	213,4 ± 338,0	201,2 ± 312,9	0,6806
<i>IL-5</i>	311,0 ± 506,7	233,7 ± 272,5	0,6746
<i>IL-6</i>	34,94 ± 41,36	52,37 ± 87,80	0,7353
<i>IL-10</i>	274,3 ± 353,4	302,4 ± 376,6	1,0000
<i>IL-13</i>	120,8 ± 148,7	101,0 ± 121,7	0,5479
<i>IL-17</i>	155,1 ± 144,0	131,1 ± 128,5	0,5869
<i>IL-9</i>	127,3 ± 98,45	116,1 ± 104,7	0,4294
<i>IL-1β</i>	200,7 ± 280,3	202,1 ± 432,9	0,6806
<i>TNF-α</i>	158,3 ± 279,3	165,9 ± 240,3	0,8241
<i>IL-22</i>	443,6 ± 467,4	508,9 ± 529,5	0,6214

4.5.3.2. Концентрације цитокина здравих у односу на злоупотребу алкохола.

Статистичка анализа такође није показала значајну разлику у групи здравих испитаника у односу на злоупотребу алкохола (Табела 19).

Табела 19. Концентрације цитокина здравих испитаника (*Mean ± SD*) у односу на злоупотребу алкохола.

Цитокин	Концентрација цитокина здравих, <i>Mean ± SD (pg/ml)</i> у односу на злоупотребу АЛКОХОЛА		Вредност <i>P</i>
	ДА	НЕ	
<i>IL-2</i>	148,8 ± 142,9	209,7 ± 194,7	0,4525
<i>IL-12</i>	165,5 ± 149,4	264,0 ± 333,7	0,5817
<i>IFN-γ</i>	279,7 ± 236,8	402,7 ± 416,0	0,5590
<i>IL-4</i>	161,7 ± 153,8	159,5 ± 125,6	0,7511
<i>IL-5</i>	274,2 ± 325,7	252,4 ± 247,8	0,6283
<i>IL-6</i>	32,83 ± 34,30	58,46 ± 78,89	0,5042
<i>IL-10</i>	282,5 ± 285,4	375,3 ± 460,0	0,6642
<i>IL-13</i>	64,33 ± 65,07	105,9 ± 106,7	0,2853
<i>IL-17</i>	99,00 ± 93,56	155,0 ± 155,2	0,3945
<i>IL-9</i>	102,0 ± 99,37	123,3 ± 84,10	0,3585
<i>IL-1β</i>	128,2 ± 134,6	194,6 ± 274,6	0,5043
<i>TNF-α</i>	148,7 ± 175,7	136,8 ± 214,9	0,7510
<i>IL-22</i>	443,8 ± 489,2	506,5 ± 535,7	0,7511

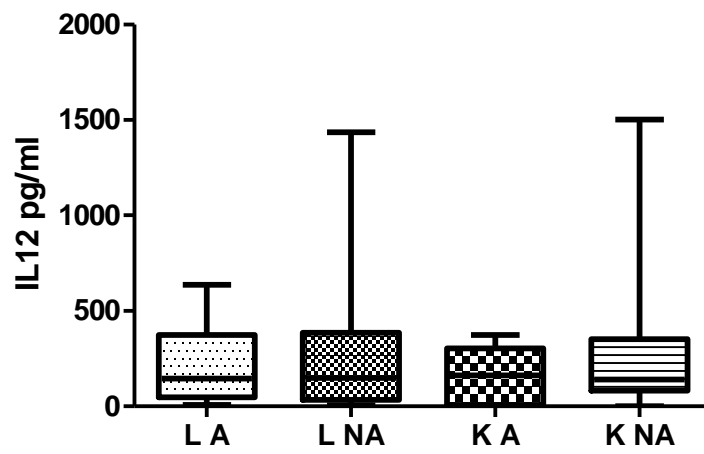
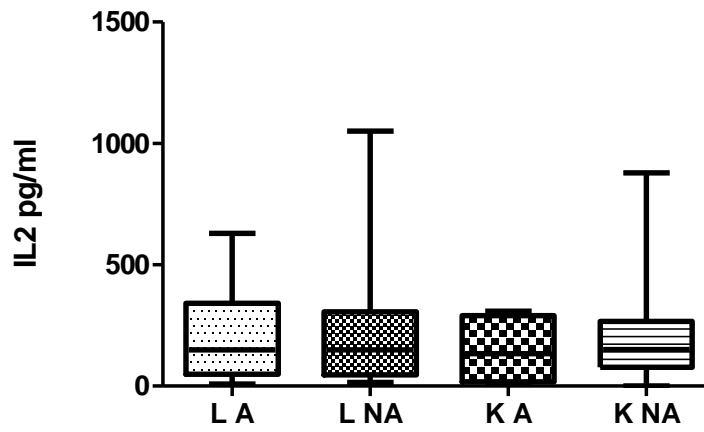
4.5.3.3. Концентрације цитокина оболелих и здравих који злоупотребљавају алкохол

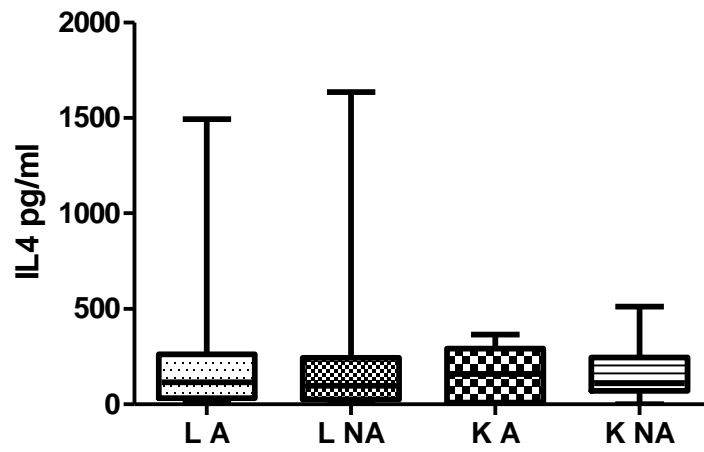
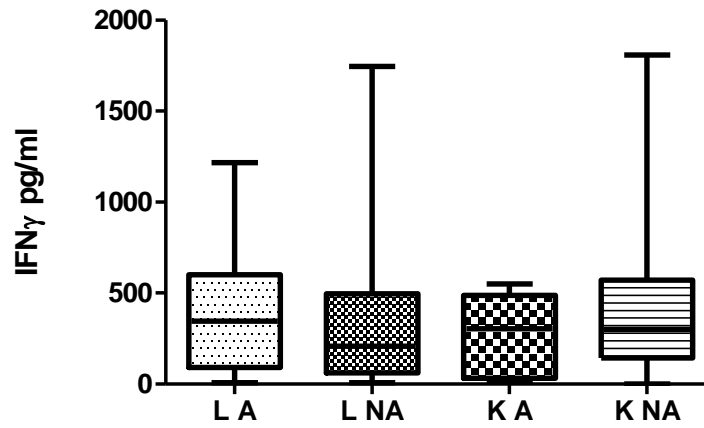
Када смо поредили концентрације испитаника који злоупотребљавају алкохол нисмо нашли статистички значајну разлику у односу на присуство/одсуство болести (ПЦКЛ). Резултати су приказани у Табели 20.

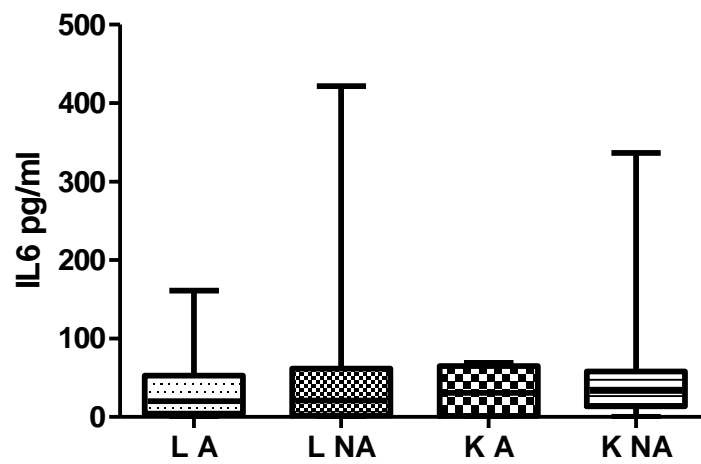
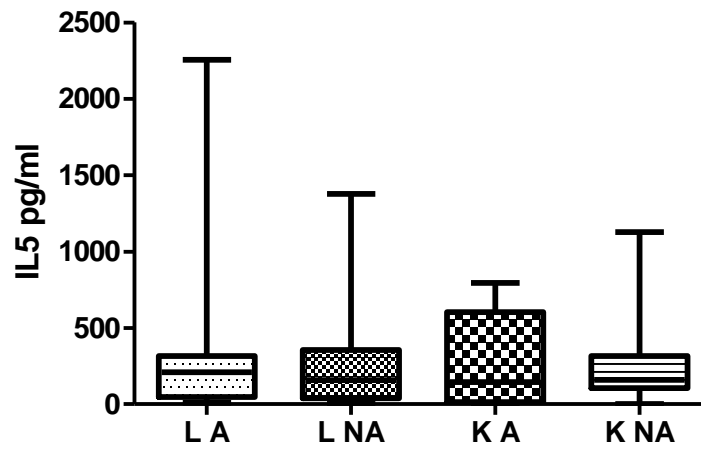
Табела 20. Концентрације цитокина испитаника који злоупотребљавају алкохол (*Mean* ± *SD*) у групама оболелих од ПЦКЛ и здравих испитаника.

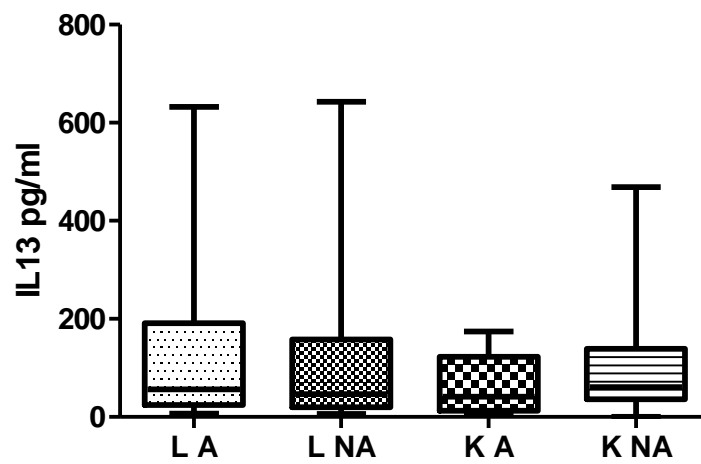
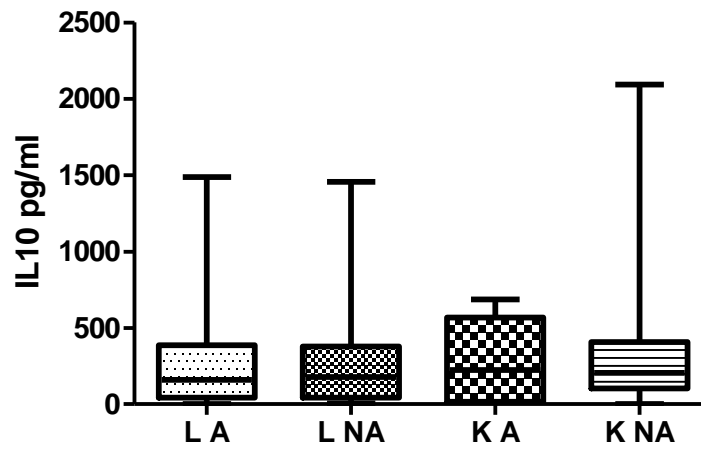
Цитокин	Концентрација цитокина алкохоличара, <i>Mean</i> ± <i>SD</i> (pg/ml)		Вредност <i>P</i>
	ПЦКЛ	КОНТРОЛЕ	
<i>IL-2</i>	202,5 ± 179,8	148,8 ± 142,9	0,4839
<i>IL-12</i>	205,5 ± 188,8	165,5 ± 149,4	0,5936
<i>IFN-γ</i>	399,2 ± 358,8	279,7 ± 236,8	0,4839
<i>IL-4</i>	213,4 ± 338,0	161,7 ± 153,8	0,8155
<i>IL-5</i>	311,0 ± 506,7	274,2 ± 325,7	0,7897
<i>IL-6</i>	34,94 ± 41,36	32,83 ± 34,30	0,9734
<i>IL-10</i>	274,3 ± 353,4	282,5 ± 285,4	0,9734
<i>IL-13</i>	120,8 ± 148,7	64,33 ± 65,07	0,4236
<i>IL-17</i>	155,1 ± 144,0	99,00 ± 93,56	0,3500
<i>IL-9</i>	127,3 ± 98,45	102,0 ± 99,37	0,5263
<i>IL-1β</i>	200,7 ± 280,3	128,2 ± 134,6	0,5481
<i>TNF-α</i>	158,3 ± 279,3	148,7 ± 175,7	0,9468
<i>IL-22</i>	443,6 ± 467,4	443,8 ± 489,2	0,9734

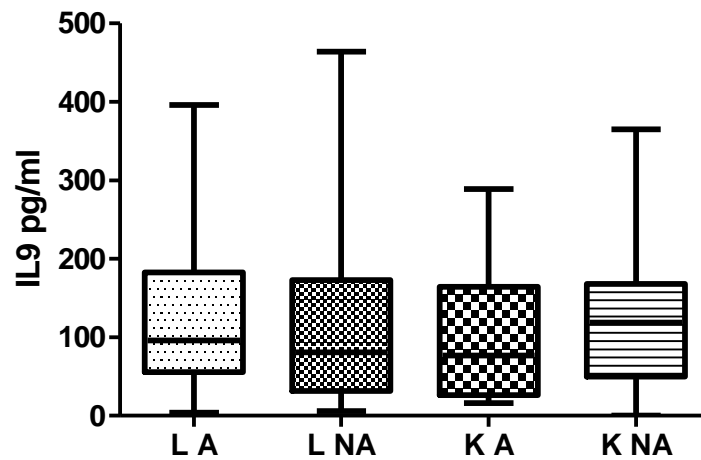
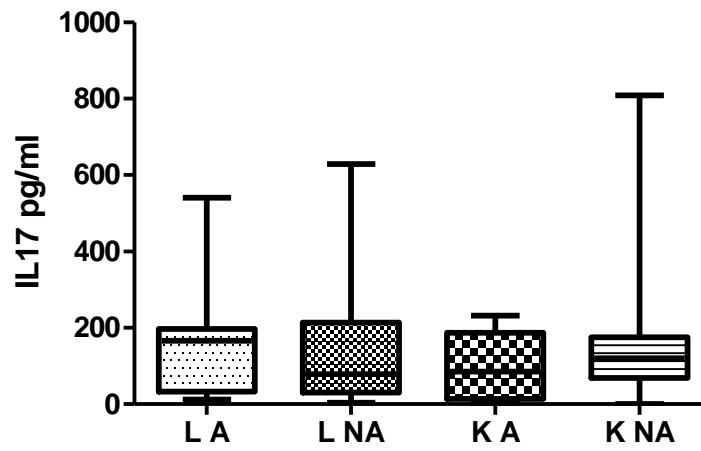
Сумарни приказ концентрација цитокина оболелих и здравих испитаника у односу на злоупотребу алкохола приказан је на Слици 17.

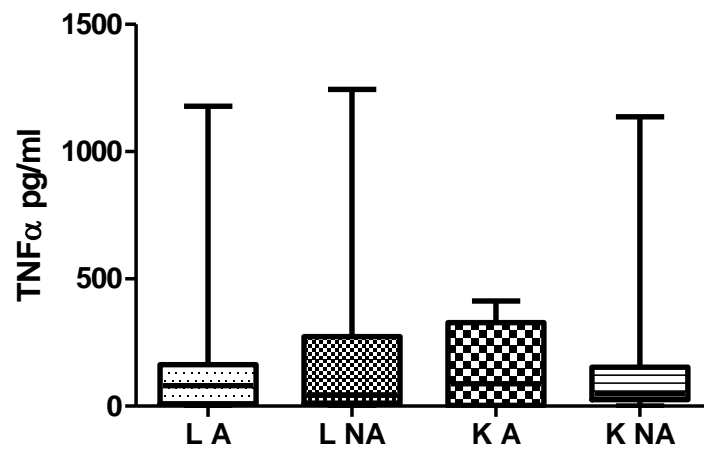
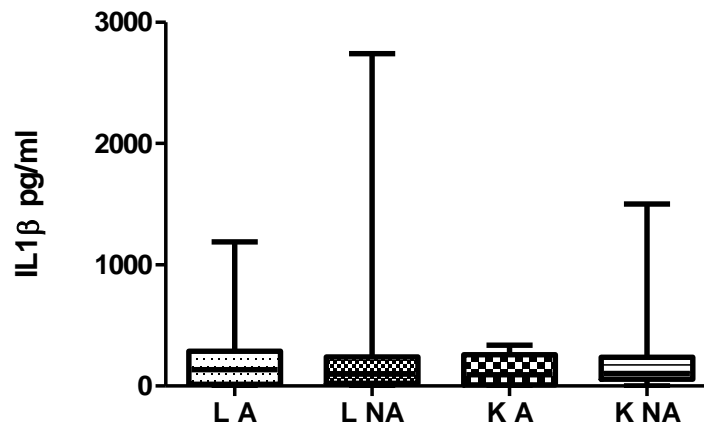


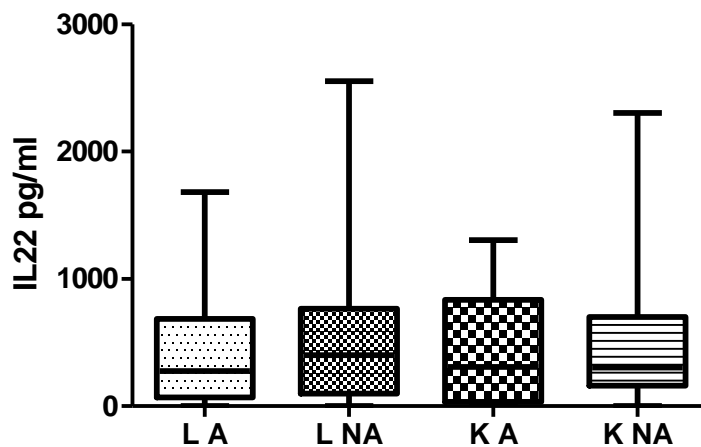












Слика 17. Просечне концентрације цитокина у односу на злоупотребу алкохола.

L- оболели од ПЦКЛ, *K*- контролни испитаници, *A*-алкохоличари, *NA*- неалкохоличари

5. ДИСКУСИЈА

Малигне болести представљају један од водећих узрока обољевања у умирања у савременом свету. Упркос имунском надзору, очито је да малигно трансформисане ћелије имају способност избегавања туморског имунитета домаћина.

Осим проналаска ефикасних терапијских модалитета за малигне болести, рана дијагноза и адекватно одређивање стадијума болести могли би бити веома значајан фактор у побољшању резултата лечења пацијената са карциномом ларинкса. До сада није идентификован ни један дијагностички или прогностички биомаркер са добром сензитивношћу и специфичношћу код пацијената са ПЦКЛ. Ово је вероватно последица комплексне биологије малигног тумора и његове интеракције са имунским одговором домаћина. Циљ ове студије била је идентификација цитокина у серуму који би били одраз системског имунског одговора код пацијената са ПЦКЛ, а у циљу раније дијагностике и тачнијег одређивања стадијума болести што у крајњем има за циљ адекватније лечење.

Карцином ларинкса представља потенцијално фатално обољење чије лечење може довести до великих промена у квалитету живота мењајући дисање, глас и гутање код болесника. Морталитет код карцинома ларинкса се, према подацима из литературе, смањује у Европи, што се повезује са мењањем навика пре свега у коришћењу дувана, а једним делом и алкохола (39). Ово такође истиче значај и улогу дувана у настанку карцинома ларинкса.

Бројни клинички радови упућују на то да поремећај туморског имунитета има кључну улогу у настанку и прогресији малигног тумора. Туморски имунитет представља збир сложених интеракција ћелија у туморској микросредини. Анти-туморски имунски одговор подразумева дејство урођеног (*Natural killer-NK* ћелије, макрофаги) и стеченог (Т и Б лимфоцити) имунског одговора (16). Поларизација цитокинског профила у туморској микросредини од стране великог броја различитих ћелија имунског система одређује анти-туморски или про-туморски ефекат имунских ефекторних ћелија (40). Притом, треба имати у виду да је функција Т ћелија у туморској микросредини значајно под утицајем измењеног метаболизма тумора. С обзиром на анаеробне услове који владају у туморској микросредини, имуносупресивни ефекат могу имати сами метаболити анаеробне

гликолизе што представља важан елемент у прогресији тумора и анти-туморској имуности (41).

Доминантни анти-туморски механизам *in vivo* је ћелијски имунски одговор. У ефекторне ћелије имунског одговора спадају ћелије природне убице (*Natural Killer, NK* ћелије), цитотоксични *T*-лимфоцити (*Cytotoxic T lymphocyte, CTL*), и макрофаги. Субпопулација *T* лимфоцита који експримују *CD4* молекула (*CD4+*) називају се помоћнички *T* лимфоцити (*engl. helper, Th*). Дуги низ година зна се за 2 субпопулације *Th* лимфоцита- *Th1* и *Th2*. Осим *Th1* и *Th2* субпопулације, последњих година откривене су и друге врсте *Th* ћелија и њихова улога у анти-туморској имуности. Сматра се да фоликуларни *Th* лимфоцити имају протективну улогу у имунском одговору на малигне туморе, док регулаторни (*Treg*) *Th* лимфоцити имају про-туморско дејство (42,43). *Th17* представљају врсту *Th* лимфоцита који су откривени у новије време, а продукују *IL-17* и *IL-22* (44).

Настанак малигног тумора примарно доводи до одговора урођеног имунитета (*NK* ћелије, макрофаги и друге) (45). Новији радови потврђују да је код карцинома главе и врата супримирана функција *NK* и дендритичних ћелија (46). Цитотоксични *T* лимфоцити и *CD4+* *T* ћелије, које продукују *IFN-γ*, унутар самог тумора даље доводе до ћелијске смрти, додатне активације *NK* ћелија и макрофага и инфламације. *Th1* и *Th17* могу имати важну улогу у анти-туморском одговору посредујући у ћелијски посредованом убијању туморских ћелија (47). Овај одговор може бити супримиран *Treg* ћелијама које се такође налазе у растућем тумору (48). *Tregs* представљају снажан инхибитор анти-туморског одговора и велику препреку анти-туморској имунској терапији (49). И резултати других студија сугеришу да су регулаторни *Th* лимфоцити могући разлог за неадекватан *T* ћелијски одговор, с обзиром на своју имunosупресивну активност против тумор-специфичних *T* ћелија (50,51).

На изразито сложен однос имунског одговора, настанак и прогресију малигног тумора указују и студије које показују да особе које су алергичне имају мањи ризик да оболе од малигнух тумора. Студије код оболелих од малигнух тумора мозга, панкреаса и леукемија у дечијем добу показале су обрнуто пропорционални однос учесталости алергије и ових малигнух тумора (52-54). Што се тиче карцинома ларинкса, епидемиолошка студија

Вестеринена (*Vesterinen*) и коаутора показала је да астматичари имају нижу инциденцу обољевања од овог малигнитета (55). Основни недостатак ових студија је што су оне углавном базиране на анамнестичким подацима о постојању алергије и астме код испитаника. Такође, студија која је објављена 2012. године показала је да постоји обрнути однос учесталости алергије и астме са једне стране и појаве орофарингеалног и ларингеалног карцинома са друге, без обзира на пушачки статус, пол и *HPV* инфекцију (56). Иако тачан разлог ове појаве још увек није јасан сматра се да је појачан имунски надзор путем *Th2* одговора, који је доминантни механизам алергијске инфламације, и повећана продукција *IgE* представљају могуће механизме. *In vitro* истраживање шведских аутора показало је да алергије и малигни тумори изазивају у потпуности супротан имунски одговор (57). Према овој студији, доминантан анти-туморски имунски одговор је урођеног типа, док је у настанку алергија доминантан стечени имунитет са појачаним *T* ћелијским одговором. Закључак ове студије био је да појачан стечени имунски одговор код пацијената са алергијом повећава и анти-туморски одговор. Међутим, скорашња студија немачких аутора није показала везу између постојања алергије и карцинома ларинкса (58).

Један од претпостављених механизма у настанку малигног тумора је поремећај у односу *Th1* и *Th2* имунског одговора. Хипотеза претходних студија била је да повећани *Th2*, а смањени *Th1* имунски одговор води настанку малигног тумора (24,59). Према Де Кости (*DeCosta*) премалигне лезије код карцинома главе и врата доводе до снажног *Th1* имунског одговора (60). Међутим, настанак малигне лезије у регији главе и врата праћен је системском имунском супресијом која се карактерише повећаним бројем регулаторних *Th* лимфоцита и *CD34+* прогениторских ћелија које доводе до супресије активности *CD8+* и *CD4+* *Th* ћелија. Сматра се да је један од главних механизма којим ћелије карцинома главе и врата мењају имунски одговор домаћина промена цитокинског профила унутар самог тумора. Секретујући цитокине као што су *IL-6* и *IL-10* ћелије карцинома главе и врата доводе до појачаног *Th2* имунског одговора што има за последицу смањење анти-туморског одговора (61). Студија Суна (*Sun*) и сарадника показала је да је код пацијената са планоцелуларним карциномом ларинкса повећана активност регулаторних *Th* лимфоцита, а смањен *Th1* имунски одговор (62). Кинески аутори су показали да је *Th1* имунски одговор доминантан код карцинома ларинкса и то пре свега у раним

стадијумима болести што говори о његовој протективној улози код карцинома ларинкса (63). Потенцијална имунска терапија довела би до стварања ефективног имунског одговора на туморе тако што би оптимизовала *Th1* одговор и превазишла имунску толеранцију тумора.

Када говоримо о различитим субпопулацијама *T* лимфоцита, експерименталне и клиничке студије показале су да *T* лимфоците карактерише одређена пластичност и флексибилност, односно њихов функционални фенотип, тако да се експресија рецептора и продукција цитокина мењају у зависности од микросредине у којој се налазе. Овај феномен веома је значајан у настанку и развоју одређених патолошких стања као што су аутоимуне и малигне болести. Пластичност *T* лимфоцита представља важан механизам који омогућава имунском систему да реагује на различите патогене. Различите субпопулације *T* ћелија регулише компликована сигнална мрежа цитокина и транскрипционих фактора, а поремећај ове мреже доводи до патолошких стања као што је пренаглашен инфламаторни одговор код аутоимуних болести или имунска толеранција код малигнух тумора (64). Захваљујући особини да учествују у различитим имунским одговорима и способности флексибилне диференцијације у различите ефекторне ћелије, укључујући фоликуларне *Th* лимфоците и *CD4+* цитотоксичне *T* лимфоците, разумевање и промена функције *CD4+* *T* ћелија могли би имати велики значај за потенцијалну умунску терапију (42).

Раније студије показују да *Th1* одговор представља важан фактор у имунском одговору на туморе својом улогом у ћелијском имунитету, док *Th2* одговор посредује у механизмима имунске толеранције на туморе, мада је и даље улога *Th2* лимфоцита у туморском имунитету контрадикторна (42,47)

Th0 ћелије се диференцирају у *Th1* ћелије у контакту са *Th1* поларизованим дендритичним ћелијама. У *in vitro* моделима показано је да интратуморске антиген презентујуће ћелије (*APCs*, *Antigen Presenting Cells*), као што су макрофаги и дендритичне ћелије, показују *Th1* поларизацију (65). *Th1* ћелије продукују *Th1* цитокински профил, између осталог и *IL-2* и *IFN- γ* , тиме подстичући даљу *Th1* поларизацију антиген презентујућих ћелија и тако појачавају стварање ефикасног антиген специфичног цитотоксичног имунитета (66). Такође, *IFN- γ* ограничава диференцијацију *Th0* у *Th2* ћелије и тако спречава настанак

имунске толеранције. Насупрот томе, цитокини настали *Th2* одговором ограничавају *Th1* одговор (65). *Th2* одговор подстиче механизме имунске толеранције на туморске антигене, и тако инхибира стварање стечене анти-туморске имуности.

Th1 имунски одговор карактерише секреција *IFN- γ* , *IL-2* и *TNF- β* , док *Th2* ћелије стварају *IL-4*, *IL-5*, *IL-6*, *IL-9*, *IL-10* и *IL-13* (67). *Th1* одговор задужен је првенствено за борбу против интрацелуларних патогена повећањем *CD8+* *T* ћелијског одговора или директном активацијом макрофага у циљу фагоцитозе интрацелуларних патогена. Такође, *Th1* одговор учествује у низу аутоимуних процеса (42). *Th2* одговор учествује у хуморалном имунитету и одговоран је за алергијске реакције (42).

Претходне студије показују да и *Th1* и *Th2* одговор учествују у анти-туморском одговору, али је учинак *Th1* одговора већи. Ово је вероватно последица продукције *IFN- γ* и других цитокина од стране *Th1* ћелија који појачавају дејство *CD8+* ћелија. *Th1* ћелије потпомажу миграцију *NK* ћелија и типа 1 макрофага на место тумора тиме доприносећи борби против тумора. Галон (*Galon*) је са својим сарадницима показао да је код колоректалног карцинома присуство интратуморских маркера *Th1* поларизације повезано са мањом инциденцом рецидива овог тумора (68). Улога *Th2* је комплекснија и вероватно зависи од међусобне интеракције са другим ћелијама туморске микросредине. Претпоставља се да *Th2* одговор учествује у анти-туморском имунитету путем мобилисања ћелија урођеног имунитета (42). Међутим, резултати клиничких студија говоре у прилог чињеници да *Th2* имунски одговор може имати и про-туморски и анти-туморски ефекат. Активација *Th2* имунског одговора доводи до повољног терапијског ефекта на плућне метастазе код меланома, са једне стране, али и до прогресије карцинома панкреаса, бубрега *RCC (Renal Cell Carcinoma)* и меланома са друге стране (69-71).

Th17 поларизација дешава се у присуству *IL-6*, *IL-21* и *TGF- β* (64). *Th17* ћелије продукују *IL-17A*, *IL-17F*, *IL-21*, *IL-22* (64). У доступној литератури постоје опречни подаци о улози *IL-17* у настанку малигних тумора. Док једне студије показују његово про-туморско, друге сугеришу његово анти-туморско дејство (42).

IL-22 продукују осим *Th17* и *CD8+* ћелије и ћелије урођеног имунитета (64). Резултати великог броја студија показују његово про-туморско дејство, али постоје и сасвим опречни подаци о улози *IL-22* у настанку и прогресији тумора (22).

Последњих година велики број студија бави се генетским променама, укључујући и полиморфизам гена за интерлеукине и његов утицај на карциноме главе и врата, инфламацију и метастазирање (72-75). У том смислу терапијски модалитети у лечењу малигних болести ларинкса морају се усредсредити како на имунске медијаторе тако и на генетске факторе (76).

У литератури се наилази на већи број радова који се односе на серумске концентрације цитокина код пацијената са планоцелуларним карциномима главе и врата (ПЦКГВ) без обзира на захваћену регију. Резултати ових студија разликују се међу собом. Они, у зависности од студије, показују повишене серумске концентрације *IL-2*, *IL-4*, *IL-5*, *IL-10*, *IL-6*, *IL-1 β* , *TNF- α* , *IL-17*, а смањене концентрације *IFN- γ* и *IL-13* у серуму пацијената са ПЦКГВ у поређењу са здравим испитаницима (38,57,77-80). Прегледни приказ резултата наведених студија дат је у Табели 19. Претходни радови показују да ћелије ПЦКГВ секретују имуносупресивне цитокине, између осталих и *IL-10* што за ефекат има смањење секреције *IFN- γ* од стране Т лимфоцита (59,81). Летерс (*Lathers*) са сарадницима је показао повишене вредности *IL-4*, *IL-6* и *IL-10* код пацијената са ПЦКГВ тиме потврђујући повишене вредности *Th2* одговора код пацијената са ПЦКГВ, мада студија није показала смањење *Th1* имунског одговора (79).

Табела 19. Резултати студија серумских концентрација цитокина код ПЦКГВ

ЦИТОКИН	КОНЦЕНТРАЦИЈА КОД ПЦКГВ	СТУДИЈА
<i>IL-2</i>	↑	<i>Lathers 2003</i>
<i>IFN-γ</i>	↓	<i>Lathers 2003, Kaskas 2014</i>
<i>IL-4</i>	↑	<i>Hathaway 2005, Lathers 2003</i>
<i>IL-5</i>	↑	<i>Hathaway 2005</i>
<i>IL-10</i>	↑	<i>Hathaway 2005, Lathers 2003, Jebreel 2007</i>
<i>IL-13</i>	↓	<i>Kaskas 2013</i>
<i>IL-6</i>	↑	<i>Hathaway 2005, Lathers 2003, Millrud 2014, Hoffmann 2007</i>
<i>IL-1β</i>	↑	<i>Hathaway 2005, Millrud 2014</i>
<i>TNF-α</i>	↑	<i>Hathaway 2005</i>
<i>IL-17</i>	↑	<i>Millrud 2014</i>

Међутим, појам *карцинома главе и врата* подразумева све карциноме који потичу од епитела синоназалног тракта, усне дупље, фаринкса и ларинкса, а који показују сквамозну диференцијацију. Они су дуго посматрани као униформна група тумора која се међу собом разликују само по анатомској локализацији. Ипак, новије студије показују да се ови карциноми међу собом веома разликују по својим факторима ризика, патогенези и клиничком понашању, те се карциноми главе и врата не могу посматрати као јединствени ентитет што захтева и одговарајући индивидуални приступ појединим туморима главе и врата (82-84).

У поређењу са студијама које се односе на ПЦКГВ, број радова у литератури који се односе на ПЦКЛ је значајно мањи. У две одвојене студије Гунајдин (*Gunaydin*) и

Мелинцеану (*Melinceanu*) са својим сарадницима показали су да се код пацијената са ПЦКЛ налазе повишене серумске вредности *IL-10*, маркера *Th2* имунског одговора (85,86). У групи пацијената са ПЦКЛ, Ејгор и сар. (*Eyigor*) су показали повишене вредности *IL-6* и *IL-10* у односу на здраве испитанике. Међутим ова студија је показала да су серумске концентрације наведених цитокина повишене, и код пацијената са диспластичним променама у ларинксу (87). Студија Никакле (*Nikakhlagh*) и сарадника показује повишене вредности *IL-6* у серуму пацијената са ПЦКЛ (88). Испитујући ларингофарингеалне карциноме Блеоту (*Bleotu*) је показао да су код ове групе пацијената у серуму повишене концентрације *IL-4*, *IL-6* и *IL-10*, маркера *Th2* имунског одговора, при чему су серумске концентрације *Th1* имунског одговора (*IL-2*, *IL-12*) биле снижене (25).

Резултати наше студије разликују се од претходно поменутих резултата. Наиме, поређењем група оболелих од ПЦКЛ и здравих испитаника, нисмо нашли статистички значајну разлику серумских концентрација испитиваних цитокина. Наш закључак је да се мерењем концентрација цитокина у серуму оболелих од ПЦКЛ не може поставити дијагноза, нити сумња на постојање ПЦКЛ. У том смислу серумске вредности цитокина не могу се посматрати као туморски маркери, као што је случај са постојањем туморских маркера удругим малигним болестима, као што су карцином желуца и колоректални карцином.

Међутим када смо оболеле од ПЦКЛ поделили на почетни (*T1/T2*) и касни (*T3/T4*) *T* стадијум болести добили смо другачије резултате.

Наша студија показује смањену серумску концентрацију цитокина *IL-12* ($p < 0,05$) и повећану серумску концентрацију *IL-10* ($p < 0,05$) код пацијената са узнапредовалим *T* (*T3/T4*) стадијумом. Ови резултати говоре у прилог хипотези наше студије да је прогресија планоцелуларног карцинома ларинкса праћена смањеним *Th1*, а повећаним *Th2* имунским одговором. Резултати студије коју су реализовали Жоу и сарадници су такође показали да концентрације *IL-10* у серуму код ПЦКЛ зависе од стадијума болести (89). Слично нашим резултатима, Гунајдин (*Gunaydin*) је са сарадницима показао значајно више концентрације *IL-10* у серуму пацијената са ПЦКЛ *T3/T4* стадијума, мада вредности *IL-12* нису биле статистички значајно различите између пацијената са раним и одмаклим стадијумом

болести (85). Исто тако, Ксу (*Xu*) је показао да је *Th1* имунски одговор преодминантан код раних у односу на касне стадијуме карцинома ларинкса (63). У групи оболелих од ларингофарингеалног карцинома Блеоту (*Bleotu*) је показао да је прогресија *T* стадијума болести повезана са сниженим вредностима цитокина *Th1* имунског одговора (*IL-2*, *IFN-γ*), а повишеним серумским концентрацијама цитокина *Th2* одговора (*IL-6*, *IL-10*) (25).

Наше резултате који се односе на прогресију ПЦКЛ упоредили смо са одговарајућим литературним подацима за ПЦКГВ.

Док Латерс (*Lathers*) закључује да промене *Th* одговора ПЦКГВ пре свега указују на присуство малигног тумора, али не и на његову величину и метастатско ширење, Спарано (*Sparano*) је у својој студији, испитујући серуме пацијената са ПЦКГВ, показао резултате сличне резултатима наше студије код ПЦКЛ, односно да су унапредовали *T* стадијуми болести повезани са сниженим вредностима *IL-12* и повишеним вредностима *IL-10* у серуму (79,90). Резултати студије Џебрела (*Jebreel*) и сарадника такође показују повишене серумске концентрације *IL-10* код *T3* и *T4* стадијума болести ПЦКГВ (78).

Иако према резултатима наше студије и литературним подацима повишене концентрације *IL-10* говоре у прилог прогресије примарног малигног тумора, улога овог цитокина у канцерогенези је сложена и још увек недовољно разјашњена. Различите студије показују како његово про-туморско, тако и анти-туморско дејство. Док код извесних малигнух тумора, као што су Б-ћелијски лимфом и меланом, *IL-10* делује као аутокрини фактор раста, код карцинома који су повезани са инфламацијом, као што је карцином дебелог црева, неутрализација овог цитокина нема никакав или чак има неповољан ефекат на прогресију овог малигног тумора (91). Такође, није до краја јасно које све ћелије стварају *IL-10*. Иако је првобитно сматран медијатором *Th2* имунског одговора, неке студије показују да *IL-10* у значајној мери стварају регулаторни *Th* лимфоцити (*Tregs*) и да он у основи показује имуносупресивно и антиинфламаторно дејство, инхибирајући продукцију проинфламаторних цитокина укључујући *TNF-α*, *IL-6* и *IL-12*, тиме инхибирајући настанак и прогресију тумора (92). Са друге стране, студија британских аутора показала је да серумске вредности *IL-10* падају 4-6 недеља након лечења сквамозелуларног карцинома главе и врата, пружајући доказ да *IL-10* углавном стварају саме туморске ћелије (93).

Према Бекеровој (*Becker*) хипотези, *IL-10*, који продукују туморске ћелије у туморској микросредини, инхибира урођени и стечени имунски одговор домаћина (24). Високе концентрације *IL-10* у серуму корелишу са лошом прогнозом код Буркитовог лимфома (29). Могуће објашњење овако сложене улоге *IL-10* у настанку малигних тумора је да ефекат *IL-10* зависи од интеракције са другим цитокинима или другим факторима у туморској микросредини (28). У новије време настанак ПЦКЛ као и његов утицај на потенцијал за метастазирање повезују се са полиморфизмом гена за *IL-10* (89).

IL-10 је у нашој студији такође био статистички значајно повишен код болесника са нижим степеном хистолошке диферентованости. Рутински се током патохистолошке дијагностике тумора одређује степен диферентованости тумора, односно његов хистолошки градус (*Histologic Grade, HG*). Сквамозелуларни карциноми ларинкса деле се на добро, умерено и лоше диферентоване туморе. Ћелије добро диферентованих тумора (*HG1*) у великој мери имају изглед нормалног сквамозног епитела. Умерено диферентоване туморе (*HG2*) карактерише нуклеарни плеоморфизам и повећана митотска активност, укључујући и постојање патолошких митоза. Код тумора хистолошког градуса 3 (*HG3*) преобладају незреле ћелије уз велики број типичних и атипичних митоза. У серији наших испитаника оболелих од ПЦКЛ тумори су били добро или умерено диферентовани (*HG1* или *HG2*). Поредџи оболеле од ПЦКЛ подељене према хистолошкој диферентованости тумора, нашли смо да се код пацијената са *HG2* налазе повишене концентрације *IL-10* и *IL-22* ($p < 0,05$). Резултати претходних студија показују да диферентованост карцинома ларинкса представља један од прогностичких показатеља болести (94-99). Резултати наше студије могли би значити да умерено диферентовани тумори (*HG2*) изазивају јачи имунски одговор у односу на добро диферентоване туморе (*HG1*). Повећане концентрације *IL-10* и *IL-22* код ове групе испитаника могу представљати карактеристику бржег раста и већег потенцијала за метастазирање ових тумора. Одређивање концентрације *IL-10* би у складу са нашим резултатима имало значај у идентификацији пацијената који би имали користи од умунотерапије, уз стандардно лечење (93).

Што се *IL-22* тиче, овај цитокин према литературним подацима може имати и протуморско и анти-туморско дејство. *IL-22* игра улогу у низу аутоимуних болести где може

имати и протективну и промовишућу улогу у зависности од фазе болести, али његова улога у настанку малигнух тумора је и даље контроверзна (100-102). Могу га стварати различити типови ћелија као што су *Th17*, *CD8+* лимфоцити и ћелије урођеног имунитета (64). Његов пролиферативни ефекат је нарочито изражен код карцинома плућа и јетре, док је само умерен код оралног сквамозелуларног карцинома и карцинома панкреаса. Ово би могло бити последица различите експресије рецептора за *IL-22* у овим туморима (22). Такође, могуће је да примарно дејство овог цитокина зависи од интеракције са другим цитокинима у туморској микросредини. Сумарно, *IL-22* доводи до прогресије тумора тако што утиче на пролиферацију, преживљавање, инфламацију, ћелијску миграцију, дисплазију, ангиогенезу. Сасвим супротно, неке *in vitro* студије показале су да овај цитокин инхибира раст малигнух тумора као што су карцином бубрега (*RCC*) и карцином дојке (103,104).

Иако постоје литературни подаци везани за карциноме плућа, јетре, колона, тиреоидне жлезде, коже, детаљним прегледом нама доступне литературе нисмо нашли студију која испитује повезаност *IL-22* и карцинома ларинкса. Имајући у виду резултате нашег испитивања који нису показали да се серумске концентрације *IL-22* разликују код оболелих од ПЦКЛ у односу на здраве испитанике, али да је серумска концентрација овог цитокина повећана код ПЦКЛ нижег степена диференцијације тумора, закључак би могао бити да сам *IL-22* вероватно не утиче на настанак тумора, али у већ створеном малигнуом тумору његово присуство има снажан утицај на туморску прогресију. Резултати истраживања које су спровели Лим (*Lim*) и сарадници кореспондирају са нашим налазима. Наиме, према овој студији *IL-22* у фази зарастања ране има улогу да заштити организам од стварања тумора, али код ћелија које су већ претрпеле малигну трансформацију, он повећава њихов метастатски потенцијал. Према овом аутору, стадијум тумора у коме постоји експресија *IL-22* имаће утицаја на то да ли овај цитокин има про-туморски или анти-туморски ефекат (22).

Поред величине примарног тумора, за адекватно одређивање стадијума болести, а самим тим и адекватан одабир терапијског модалитета, од пресудног значаја је одређивање локорегионалне проширености болести. Око две трећине пацијената са ПЦКТВ у тренутку

постављања дијагнозе има проширени облик болести, а најчешће се ради о метастатски измењеним лимфним чворовима на врату (105). С обзиром да је захваћеност регионалних лимфних чворова на врату значајан, ако не и најзначајнији прогностички фактор код ПЦКЛ, идентификација потенцијалног биомаркера нодалне захваћености имала би велики значај. Према нашим резултатима, пацијенти са позитивним лимфним чворовима на врату имали су статистички значајно снижене серумске вредности *IL-12* ($p < 0,05$) у поређењу са пацијентима чији лимфни чворови нису захваћени малигном болешћу. Слични, али статистички без значаја, добијени су резултати за *IL-2* и *IFN- γ* . Ови резултати говоре у прилог наше хипотезе, односно смањеног *Th1* имунског одговора код пацијената са локорегионалном проширеношћу болести. Поредећи серумске вредности *Th2* имунског одговора пацијената са и без регионалних метастаза на врату, нашли смо да су серумске вредности цитокина *IL-17*, *IL-4*, *IL-5*, *IL-13* и *IL-10* биле повишене у групи пацијената са метастатски измењеним лимфним чворовима, али ова разлика није била статистички значајна. Смањени *Th1*, а повећани *Th2* имунски одговор у случају локорегионалне проширености болести на врату, показали су и аутори других студија (25,38,90,106).

С обзиром да је, према резултатима наше студије раст примарног тумора праћен смањењем серумских концентрација *IL-12* и повећањем серумских концентрација *IL-10*, док локорегионално ширење болести прати пад концентрације *IL-12* у серуму оболелих, наш закључак је да на раст и прогресију планоцелуларног карцинома ларинкса у најзначајнијој мери указује промена серумских концентрација цитокина *IL-12*. Са растом самог примарног тумора као и са захваћеношћу регионалних лимфних чворова концентрације овог цитокина у серуму опадају, чиме је потврђена наша хипотеза.

IL-12 игра значајну улогу у урођеном и стеченом имунском одговору, делујући и на цитотоксичне и на *NK* ћелије. *IL-12* има значајно анти-туморско дејство тако што стимулише пролиферацију и активацију цитотоксичних *T* ћелија и ћелија природних убица, као и продукцију цитокина као што су *IFN- γ* и *TNF*. Он је кључни фактор у стимулацији *Th1* имунског одговора и ћелијског имунитета, при чему доводи и до инхибиције ангиогенезе (107-112). Такође, овај цитокин стимулише тумор инфилтришуће лимфоците (*TILs*) да продукују веће количине *IFN- γ* (111). Могућност терапијске примене

IL-12 ограничена је великим токсичним ефектима које овај медијатор има, пре свега тако што повећава продукцију *IFN- γ* (113-115). Експериментални модели колоректалног карцинома, меланома и глиобластома показују значајно анти-туморско дејство *IL-12*, мада се тачан механизам његовог дејства разликује код различитих врста тумора. Према литературним подацима *in vivo* и *in vitro* студије указују на анти-туморско дејство овог цитокина код кацинома ларинкса, кутаних лимфома и малигнух лимфома (116,117).

У циљу процене серумских концентрација цитокина у односу на клиничке параметре оболеле од ПЦКЛ смо поделили у односу на захваћени субрегион ларинкса. Испитујући серумски имунски одговор тумора различитих субрегиона ларинкса поређења су вршена међу туморима истог стадијума болести. Карциноми супраглотног и глотисног дела ларинкса значајно се међу собом разлику у смислу прогнозе и резултата лечења. Супраглотносни и глотисни део ларинкса имају различито ембриолошко порекло, тако да се ларинкс може посматрати подељеном анатомском структуром (4). Ово је важно и за ширење малигнух тумора ларинкса. Супраглотносни карциноми чешће имају локорегионално проширену болест у тренутку постављања дијагнозе у односу на глотисне карциноме (118,119).

Наши резултати показују да су код раних *T* (*T1/T2*) стадијума болести серумске концентрације *IL-12*, *IL-9*, *IL-10* и *IL-13* ($p < 0,05$) значајно повишене код супраглотносних у односу на глотисне туморе. Овакви резултати би могли представљати знак јачег *Th2* одговора код супраглотносних тумора, што може делом објаснити разлику у природном току тумора једне и друге локализације. Такође, серумске концентрације проинфламаторних цитокина *IL-6* и *IL-1 β* биле су повећане код ове групе пацијената, при чему је разлика за *IL-6* показала високу статистичку значајност ($p < 0,01$). Када смо поредили супраглотносне и глотисне туморе одмаклог *T* стадијума (*T3/T4*), разлику између концентрација испитиваних цитокина нисмо нашли. Једно од могућих објашњења за овакве резултате може бити да тумори каснијег стадијума ларинкса својом величином прелазе границе одређеног сурегиона и не могу се посматрати одвојено као супраглотносни, односно глотисни тумори.

Наша студија, осим разлике у концентрацијама цитокина између супраглотисних и глотисних тумора у почетном стадијуму, не указује на пораст серумских вредности проинфламаторних цитокина са постојањем или прогресијом ПЦКЛ, иако у доступној медицинској литератури постоје подаци да је *IL-6* повезан са већом агресивношћу и прогресијом тумора, како уопштено код карцинома главе и врата, тако и код карцинома ларинкса (88,120,121). Такође, једна *in vitro* студија показала је да је *IL-6* значајно повезан са метастатским потенцијалом код ПЦКГВ (122). Студија одмаклих стадијума ларингофарингеалних карцинома показује повишене вредности *IL-6* и *IL-10*, уз снижене вредности *IL-2* и *IFN- γ* (25).

IL-6 је плеотропни инфламаторни цитокин који се сматра кључним фактором раста и за малигне и за инфламаторне ћелије. Он учествује у прогресији ћелијског циклуса и супресији апоптозе, у чему се огледа његов значај за туморогенезу (29). Његов значај је доказан је у патогенези Капоши саркома, мултиплом мијелома, Хоџкиновог лимфома (123,124).

Утицај инфламације на настанак малигнух тумора је уочен пре више од 100 година (125). Инфламација представља имунски одговор на оштећење ткива узроковано физичким агенсима (траума, хирургија, зрачење) или патогенима (бактерије и вируси). Бројне клиничке и *in vitro* студије су показале повезаност између хроничне инфекције, инфламације и малигнух тумора. Хронична инфламација има веома близак, врло често и каузални, однос са малигним туморима. Инфламација може имати про-туморски, али и анти-туморски ефекат.

Вирхов (Virchow) је још с краја деветнаестог века приметио да хистолошке промене код малигнух тумора имају изглед промена које се налазе у хронично инфицираној рани (126).

Са друге стране, такође је уочено да у неким случајевима запаљењска реакција има јак анти-туморски ефекат. Вилијам Коли (*William Coley*) је 1893. године објавио резултате серије својих пацијената са малигним туморима код који се развила постоперативна инфекција, а код којих је дошло до спонтане регресије тумора (127). И данас се анти-туморски ефекат изазивањем јаке инфламаторне реакције користи у лечењу карцинома

мокраћне бешике уз помоћ бактерије *Mycobacterium bovis*, *Bacillus Calmette-Guerin (BCG)* као и код базоцелуларног карцинома коже леком Имиквимод (*Imiquimod*) који доводи до *Th1* поларизоване инфламаторне реакције. Контроверза да ли инфламација доводи до настанка малигног тумора или је инфламаторни одговор заправо анти-туморски одговор актуелна је и данас. У британском часопису *Journal of Laryngology & Otology* је 2015. године објављен приказ случаја пацијента са патохистолошки верификованим карциномом ларинкса код кога је након пролонгиране септикемије услед перитонитиса након пласирања перкутане гастростоме дошло до спонтане регресије тумора (128).

Бројне студије указују на јасну епидемиолошку повезаност инфламације и малигнух тумора. Првобитно је уочена повезаност инфекције бактеријама, вирусима, паразитима и спољашњим факторима у настанку малигнух тумора.

Радови са краја двадесетог века показали су да код бактеријске инфекције након ресекције примарног тумора у клиничким и експерименталним условима долази до убрзаног раста примарног тумора и појаве метастаза. Утицај инфекције и инфламације у настанку малигнух тумора уочен је у случају повезаности хепатитиса и карцинома јетре, инфекције *HPV (Human Papilloma virus)* и карцинома грлића материце, *EBV (Epstein Barr Virus)* и Буркитовог лимфома и назофарингеалног карцинома, инфламаторних болести црева (Кронове болести и улцерозног колитиса) и колоректалног карцинома, као и код хроничне *Helicobacter pylori* инфекције и карцинома желуца и *MALT (Mucosa Associated Lymphoid Tissue)* лимфома (131,132). Закључак ових студија је да када имунски систем домаћина не успе да елиминише специфични запаљењски стимулус, инфламаторна реакција постоја хронична. Неадекватна ерадикација патогена, пролонгиран сигнални пут инфламације и ослабљен антиинфламаторни одговор воде настанку малигног тумора (133).

Велики број малигнух тумора, по неким подацима чак око 20%, резултат је хроничне, неизлечене инфекције узроковане бактеријама, вирусима или спољним иритансима као што су дуван и азбест (134). Међутим, инфламаторна микросредина налази се и код оних малигнух тумора где се не ради о претходној евидентној перзистентној инфекцији, као што је рецимо случај присуства јаке инфламаторне реакције у малигно измењеном ткиву дојке (135,136). Повећане концентрације проинфламаторних цитокина *TNF- α* и *IL-1 β* налазе се и

код овог карцинома и повезане су са већом инвазивношћу тумора и већом могућношћу настанка рецидива или секундарног примарног тумора (137). Овакви подаци указују на комплексност односа тумора и инфламације.

Иако је првобитна хипотеза била да пролонгирана инфламација доводи до развоја малигног тумора, касније су се појавили докази да и сам тумор доводи до појачане инфламаторне реакције. Инфламаторне ћелије и медијатори инфламације чине велики део туморске микросредине. У неким случајевима инфламација претходи настанку карцинома, док у другим онкогене промене доводе до стварања инфламаторне микросредине (29). Генетска основа у настанку неких тумора доказана је и у претклиничким студијама, где туморске ћелије могу да одрже инфламаторну реакцију без постојећих спољашњих узрока као што су бактерије или други. Пример генетски условљене инфламаторне реакције је *RAS*, један од најчешће мутираних онкогена. Активација *RAS-RAF* сигналног пута доводи до продукције бројних проинфламаторних медијатора и представља потенцијалну мету анти-туморске терапије (138).

Дакле, механизам поремећене регулације инфламације у малижном ткиву огледа се у спољашњим факторима који доводе до продукције велике количине проинфламаторних медијатора и/или генетским променама самих туморских ћелија које стварају проинфламаторне медијаторе (139). Клинички пример удруженог дејства спољног фактора запаљења и генетских промена које узрокују проинфламаторни одговор огледа се у настанку дукталног карцинома панкреаса где и панкреатитис узрокован спољашњим факторима (алкохол) и *KRAS* мутација играју значајну улогу у патогенези овог карцинома (140).

Докази о постојању спољашњих и унутрашњих фактора у настанку малигног тумора сведоче о сложеној улози механизма инфламације током карциногенезе. Улога инфламације у развоју тумора вероватно зависи од природе тумора и међусобне интеракције туморских, имунских и инфламаторних ћелија. У туморској микросредини постоји интеракција између анитуморског одговора и туморске проинфламаторне активности која слаби анти-туморски одговор. Поремећај регулације инфламације значајно повећава ризик за настанак неких малигнома. Идентификовање механизма којим је

регулација инфламације поремећена код карцинома, те долази до стварања фактора који потпомажу настанак и прогресију малигног тумора, може да пружи нове дијагностичке и терапијске могућности.

Повезаност малигне трансформације и инфламације огледа се у томе да велики број медијатора значајних за настанак малигнух тумора учествују и у процесу регенерације и зарастања рана. Проинфламаторни медијатори, као што су цитокини, хемокини и њихови рецептори, металопротеиназе и други, играју значајну улогу у променама здраве ћелије у малигну, стимулисању мале групе ћелија да неометано расте, инфилтрацији туморских ћелија у здраво ткиво и метастазирању у друге органе (28,126,141). Способност туморских ћелија да се инфилтрирају у околно ткиво увећава се у присуству проинфламаторних цитокина као што су *TNF- α* , *IL-1* и *IL-6* (142). Већина проинфламаторних цитокина, које стварају имунски систем домаћина или туморске ћелије, подстичу развој тумора, умножавање и преживљавање малигнух ћелија, ангиогенезу, метастазирање, смањење имунског одговора домаћина и мењају одговор домаћина на хормоне и хемиотерапеутике (28,29).

Основно питање које се намеће је да ли је инфламација довољна да дође до настанка малигног тумора или је неопходно дејство другог канцерогеног фактора или фактора домаћина. Јасно је да је утицај инфламације на настанак обољења јако комплексан. Хронична инфламација представља патоморфолошку основу многих других обољења осим малигнух. Један од примера је хронична опструктивна болест плућа која се са једне стране карактерише пролонгираном инфламацијом, иако у исто време постоји смањен имунски одговор на микроорганизме (143,144). Осим тога, инфламаторни одговор се код појединих малигнух тумора разликује и у хистолошком смислу. У том смислу биће важно установити који је ћелијски и молекуларни одговор заједнички за све инфламаторне реакције код малигнух тумора, а које су специфичности инфламаторног одговора код различитих канцера.

Резултати бројних клиничких и експерименталних студија намећу закључак да је настанак малигног тумора мултифакторијелни, етапни процес у коме утицај имају фактори околине као и генетски фактори (145).

Бројне епидемиолошке студије показале су да је инциденца настанка кардиоваскуларних, плућних и малигну оболјења, пре свега карцинома плућа, ларинкса и мокраћне бешике, већа код пушача, али механизам дејства дувана није још увек до краја разјашњен. Један од претпостављених механизма малигне трансформације под дејством цигарета је инфламација, јер нека истраживања показују да пушење цигарета доводи до повећане продукције проинфламаторних цитокина (146). Супротно овоме, постоје подаци и да дуван има антиинфламаторно дејство. Интересанатан је податак да од улцерозног колитиса, типичног инфламаторног оболјења дебелог црева, болују углавном непушачи, а уколико код оболелих постоји податак о пушењу болест је настала након престанка пушења (145).

У циљу утврђивања повезаности инфламације као резултата пушења код оболелих од ПЦКЛ, у нашој студији поредили смо серумске концентрације проинфламаторних цитокина (*IL-1 β* , *IL-6* и *TNF- α*) пушача са ПЦКЛ и здравих пушача, али нисмо нашли статистички значајну разлику. Исто тако, серумске концентрације медијатора *Th1* и *Th2* имунског одговора, *IL-17* и *IL-22* нису се статистички разликовале код оболелих и здравих пушача. Статистички значајне разлике није било нити када смо поредили концентрације свих испитиваних цитокина здравих пушача и непушача. Према нашим резултатима, серумски инфламаторни одговор код пушача који болују од карцинома ларинкса није повећан у односу на инфламацију код здравих пушача. Такође, серумске вредности проинфламаторних цитокина не указују да је инфламација код здравих пушача израженија у односу на здраве непушаче, нити код здравих пушача постоји промена у *Th* имунском одговору у односу на непушаче. Супротно нашим резултатима, Зидел (*Zeidel*) је са сарадницима показао да пушење доводи до појачаног инфламаторног одговора код асимптоматских пушача, нашавши повишене серумске вредности проинфламаторних цитокина *IL-1 β* , *IL-6* и *TNF- α* (146).

Међутим, када смо поредили концентрације цитокина у серуму оболелих у односу на пушење, добили смо неочекиване резултате. Код оболелих пушача нашли смо статистички значајно ниже концентрације *TNF- α* и *IL-1 β* ($p < 0,05$) у односу на непушаче. Према нашим резултатима, пушење доводи до смањеног инфламаторног одговора код оболелих ПЦКЛ. Смањени проинфламаторни одговор код пушача са ПЦКЛ могао би значити да су пушачи

са карциномом ларинкса подложнији бактеријским, вирусним, гљивичним и паразитаним инфекцијама с обзиром на улогу коју ови цитокини имају у имунском одговору (147,148).

TNF- α је прототип проинфламаторног цитокина. Овај цитокин има важну улогу у одбрани организма од бактеријских, вирусних и паразитарних инфекција (147). Иако је првобитно откривено да има токсично дејство на туморске ћелије у високим дозама, по чему је и добио име, *TNF- α* продукују малигне ћелије и инфламаторне ћелије, а он у туморској микросредини повећава живот ћелије, инвазију и ангиогенезу (142). Показано је такође да *TNF- α* доводи до трансформације епителијалних у мезенхимне ћелије код интестиналних малигнома (149). У експерименталним студијама показано је да антитела на *TNF- α* смањују туморски раст код карцинома јетре, колоректалног карцинома и карцинома панкреаса, иако је тачан механизам дејства непознат (150,151). У претклиничкој и клиничкој пракси, *Infliximab* и *Etanercept*, специфични инхибитори *TNF- α* , доводе до редукције у развоју карцинома бубрега, дојке, панкреаса и колоректалног карцинома (152). Генетски полиморфизам који доводи до повећане продукције *TNF- α* повезан је са мултиплим мијеломом, карциномом мокраћне бешике, хепатоцелуларним карциномом, карциномом желуца и дојке, као и са лошом прогнозом код хематолошких малигнух болести (153).

IL-1 β је цитокин који учествује у одбрани организма од бактерија, вируса и гљивица (148). Као проинфламаторни цитокин, *IL-1 β* се повезује са инфламаторним, али и малигнуим болестима желуца, дебелог црева и ректума (148,154-156). Новије студије базиране су на проучавању епигенетских промена везаних за продукцију *IL-1 β* за које се сматра да имају значајну улогу у патогенези малигнух тумора (157-159).

Иако неочекивани, наши резултати везани за однос пушења и проинфламаторних цитокина поклапају се са резултатима студије из 2014. године, где је показано смањене серумске концентрације проинфламаторних цитокина код пушача у односу на непушаче (160). У доступној медицинској литератури налазе се опречни резултати студија везано за утицај никотина на продукцију проинфламаторних цитокина. Слично нашим резултатима, *in vitro* студије показују смањење продукције *IL-1 β* , *IL-2*, *IFN- γ* и *TNF- α* услед дејства дуванског дима (161-163). При томе, вредан пажње је податак да Ојанг (*Ouyang*) и

коаутори у својој студији показују да сам никотин из дуванског дима не утиче на продукцију проинфламаторних цитокина, али да хидрохинон, састојак дуванског дима, јасно доводи до смањене продукције проинфламаторних цитокина *IL-1 β* и *TNF- α* (161). Са друге стране, одређени број студија указује да услед излагања дувану долази до повећања вредности проинфламаторних цитокина у серуму (164-165).

Утицај пушења на хумане ћелије је евидентно изразито сложен. Сам никотин из дувана је токсичан и заслужан је за стварање зависности од дувана, али није канцероген. У диму цигарете налази се више од 60 канцерогена од којих нитрозоамини, полициклични ароматични угљоводоници и ароматични амини имају највећу улогу у малигној трансформацији. Најбоље проучен је механизам канцерогенезе код карцинома плућа, али се слична аналогија може применити и код других малигнух обољења. У процесу канцерогенезе, никотинска зависност доводи до пролонгираног излагања канцерогенима из дувана. При томе долази до њихове интеракције са ДНК и потенцијалних мутационих промена ДНК. Ћелије у којима су се десиле мутације могу бити елиминисане апоптозом. Међутим, уколико се мутационе промене десе на онкогенима, као што су *RAS* и *MYC*, или тумор супресорским генима, као што је *p53*, резултат може бити поремећај регулације ћелијског раста и развој тумора. Канцерогени се такође могу директно везати за ћелијске рецепторе и на тај начин довести до смањења апоптозе, појачане ангиогенезе и повећане ћелијске трансформације (166). Мутације *K-RAS* онкогена и *p53* тумор супресорског гена откривене су код карцинома плућа и карцинома ларинкса и чешће су код пушача (167-168). У новије време истраживања показују да у процесу канцерогенезе дуван доводи и до оксидативног стреса који може допринети настанку и прогресији малигног тумора услед генетске нестабилности и насталих мутација (169-170).

Осим повишених концентрација *TNF- α* и *IL-1 β* , наши резултати показују гранично повишене концентрације *IL-17* ($p= 0,067$) код непушача који болују од ПЦКЛ у односу на оболеле пушаче.

IL-17 фамилија цитокина има 6 чланова и то су *IL-17A*, *IL-17B*, *IL-17C*, *IL-17D*, *IL-17E*, *IL-17F*. *IL-17A* стварају *Th17*, али и друге ћелије као што су макрофаги, дендритичне ћелије, *NK* ћелије, *CD8+* *T* ћелије, *Tregs*, неутрофили, мастоцити и друге. *IL-17* према

неким студијама испољава проинфламаторно дејство, али његова улога у развоју малигних тумора и даље је контроверзна (171). Сматра се да овај цитокин утиче на накупљање инфламаторних ћелија у периферним ткивима и доводи до продукције других проинфламаторних цитокина као што су *TNF- α* , *IL-6* и *IL-1 β* , на тај начин повећавајући инфламаторни одговор (64,172).

Што се тиче испитивања *IL-17* код ПЦКЛ, имунохистохемијске анализе показале су значајну корелацију између присуства *IL-17* и ангиогенезе код карцинома ларинкса (173). Гранично повишене вредности *IL-17* код оболелих непушача у нашој студији могле би значити да дувански дим ограничава процес ангиогенезе. Међутим, литературни подаци о утицају *IL-17* на ангиогенезу код малигних тумора су такође опречни. Нека истраживања показала су да *Th17* и *IL-17A* промовишу ангиогенезу, а друга да цитокини које такође стварају *Th17* ћелије (*IL-17F*, *IL-21*, *IL-22*) имају антиангиогено дејство (174-175).

Према литературним подацима, *IL-17* може имати и про-туморску и тумор супресорску улогу у карциногенези (21,176,177). Код карцинома желуца, медулобластома, карцинома јајника, колоректалног карцинома, неситноћелијског карцинома плућа и карцинома дојке нађена је повећана експресија *IL-17*, док истраживања показују и његово тумор-супресорско дејство код карцинома желуца, сквамозног карцинома једњака, карцинома јајника, хроничне лимфоцитне леукемије, аденокарцинома грлића материце. Про-туморско дејство и већа агресивност тумора објашњава се инхибицијом ћелијске апоптозе, негативним утицајем на туморску имуност, стимулације неоангиогенезе, метастазирање и већу инвазивност тумора. Анти-туморско дејство *IL-17* остварује кроз дејство на *T* лимфоците и стечени имунски одговор, повећање активности *NK* ћелија и *CTL*. Његова улога вероватно зависи од врсте ћелије која га секретује, стадијума туморске прогресије и интеракције са другим цитокинима у туморској микросредини (21,176).

Истраживања која су испитивала прогностичку улогу *IL-17* код малигних тумора показују такође опречне резултате. Док је у једним студијама присуство овог цитокина повезано са добром, у другима је повезано са лошом прогнозом (178,179). Прегледни радови Жанга (*Zhang*) и Женга (*Zeng*) сугеришу да *IL-17* у клиничком раду није добар прогностички маркер с обзиром да студије показује веома разнолике резултате. Наведене студије

показују да код хепатоцелуларног карцинома и неситноћелијског карцинома плућа повећана експресија овог цитокина значи лошије преживљавање, док сасвим супротан прогностички значај има за сквамозелуларни карцином једњака (180-181).

Наше истраживање није показало да концентрација *IL-17* у серуму зависи од присуства малигног тумора, нити се његова серумска концентрација мењала са растом и прогресијом тумора. Слично нашим резултатима, недавно објављена студија код оболелих од ПЦКЛ показала је да нема статистички значајне разлике у концентрацији *IL-17* код оболелих у поређењу са контролном групом здравих испитаника (31). Менг са својим сарадницима такође није показао повећану концентрацију *IL-17* у серуму оболелих од карцинома ларинкса, мада је показао повећану експресију гена за *IL-17* у тумор асоцираним макрофагима (*Tumor Associated Macrophages, TAMs*), при чему је ова експресија добро корелисала са густином крвних судова у тумору (173). Са друге стране, Ли (*Li*) је са сарадницима показао повећане серумске концентрације *IL-17* код ПЦКЛ у односу на испитанике са полипом на гласници (182). Такође, студија немачких аутора показује повећану преваленцу *Th17* ћелија у периферној крви оболелих од карцинома главе и врата, при чему су *Th17* ћелије представљале значајан проценат тумор инфилтришућих лимфоцита (*Tumor-Infiltrating Lymphocytes, TILs*) у самом тумору као и регионалним лимфним чворовима на врату, закључујући да *Th17* позитивне ћелије имају велики утицај на пролиферацију и ангиогенезу код карцинома главе и врата (183).

Th17 поларизација дешава се у присуству *IL-6*, *IL-21* и *TGF- β* (64). Овај цитокин показује одређену пластичност у диференцијацији што може бити од значаја за евентуалну анти-туморску терапију (42,183).

Према резултатима наше студије, утицај дувана на настанак карцинома ларинкса не може се посматрати само кроз ефекат инфламације. Иако постоје јасни епидемиолошки подаци о повезаности дувана са настанком карцинома ларинкса, код свих особа које су пушачи не долази до развоја ове малигне болести. Веома је значајан податак да је инциденца карцинома главе и врата међу највећима у Европи у Баскијској регији где је употреба дувана и алкохола једна од најређих у поређењу са другим регијама (184). Овакви подаци указују да је утицај дувана на настанак малигнух тумора јако комплексан, и да је у

истраживању механизма настанка малигног тумора осим фактора средине, неопходно испитивање и генетских фактора.

С обзиром да се настанак карцинома главе и врата сматра вишестепеним процесом у коме осим експонираности факторима средине учествују и одређени генетски и епигенетски фактори, претпоставка је да одређена генетска предиспозиција одређује интеракцију организма са канцерогенима, те тако постоје особе са мањим или већим ризиком за развој малигне болести приликом експонираности штетним спољним факторима. Ова предиспозиција приписује се генетском полиморфизму везаним за ензиме који утичу на метаболизам дувана и алкохола (185,186). Епигенетске промене, односно полиморфизам одређених гена утврђени су и у патогенези карцинома ларинкса (187-190). У том смислу постоје покушаји да се одређивањем метаболита дувана идентификује количина експонираности и начин метаболизма дувана чиме би се идентификовала субпопулација пушача који су под већим ризиком за настанак малигну обольења (191).

Иако недвосмислени епидемиолошки подаци указују да је пушење важан етиолошки фактор у настанку карцинома ларинкса, у проучавању патогенезе малигну тумора ларинкса мора се узети у обзир и експонираност тешким металима који доводе до генетских и епигенетских промена (192). Са настанком карцинома ларинкса повезана је професионална експонираност испарењима сумпорне киселине, али многе студије показују потенцијални канцерогени ефекат и других супстанци као што су иперит, фарбе за косу, никл, дрвна прашина, производи од гуме, паре течних горива као што су бензин и дизел, формалдехид, азбест, органски растварачи, минерална уља. Студије на карциномима ларинкса показале су повезаност овог обольења са изложеношћу прашици тешких легура, хлорним растварачима и угљеној прашици при чему код експонираности последњем наведеном постоји најизраженија дозна зависност (193-195).

Тумачење утицаја дувана на настанак карцинома ларинкса мора се посматрати у светлу сложених ефеката које дуван има на ћелије, али и комплексног утицаја инфламације у патогенези бројних обольења и стања осим малигну.

У новије време повећане концентрације проинфламаторних цитокина повезују се и са другим, немалигним обољењима. Повећане концентрације *IL-1 β* , *IL-6* и *IL-8* нађене су код особа са појачаним емоционалним стресом (196). Такође, депресивна стања повећавају концентрације проинфламаторних цитокина као што су *IL-1*, *IL-6*, *TNF- α* (197). Једно од могућих објашњења повећаних вредности проинфламаторних цитокина у нашој студији код непушача оболелих од ПЦКЛ могле би се објаснити повећаним нивоом стреса или депресивних мисли код ове групе испитаника, што нисмо узели у обзир у тренутку узимања података. Сазнање да човек болује од малигне болести свакако изазива различите емоционалне проблеме.

Иако је дуван један од најчешће помињаних етиолошких фактора за настанак карцинома ларинкса, сматра се да алкохол вишеструко појачава његово дејство пре свега тако што појачава продор канцерогена кроз слузницу вазодилатацијом коју изазива (198). Алкохол се сматра независним фактором ризика за настанак карцинома ларинкса, али је његов ефекат вишеструко повећан у садејству са пушењем (199).

Процењујући утицај конзумирања алкохола на настанак ПЦКЛ, поредећи групу оболелих од ПЦКЛ који претерано конзумирају алкохол са здравима који претерано конзумирају алкохол нисмо нашли да постоји разлика у концентрацијама испитиваних цитокина у серуму. Наша испитивања серумских вредности цитокина такође нису показала постојање разлике код здравих нити код оболелих у односу на конзумирање алкохола.

Злоупотреба алкохола представља ситуацију када алкохол повећава значајно ризик за физичке, менталне или социјалне проблеме. У нашој студији ми смо злоупотребу алкохола дефинисали према Националном институту за злоупотребу алкохола и алкохолизам Сједињених Америчких Држава према коме се злоупотребом алкохола сматра конзумирање више од 4 јединица алкохолног пића дневно или више од 14 јединица недељно за мушкарце, односно 3 јединице дневно за жене или више од 7 недељно (33). При томе треба имати у виду да толеранција на алкохол значајно варира код различитих особа, тако да и мање количине од наведених могу изазвати значајне проблеме у зависности од година, пола, придружених болести, лекова које човек узима итд. Француски аутори су испитивали количину алкохола која утиче на ризик за настајање

карцинома ларинкса и показали да конзумирање једног алкохолног пића дневно нема утицаја на настанак карцинома ларинкса, да је код умереног конзумирања алкохола (1-4 јединице дневно) ризик 1,5 пута већи, а код већег конзумирања (преко 4 јединице алкохола дневно) ризик 2,5 пута већи (200).

Испитивања утицаја алкохола на имунски систем показују да алкохол утиче и на урођени и на стечени имунски одговор. Једна студија показује да дејство алкохола на урођени имунски одговор зависи од начина уношења алкохола при чему акутно уношење доводи до инхибиције, а хронично до повећаног урођеног имунског одговора. Хронично излагање алкохолу доводи до промена и ћелијског и хуморалног имунског одговора, иако резултати наше студије не потврђују ове тврдње (201).

Треба имати на уму да испитивања утицаја дувана и алкохола имају својих специфичности и потенцијалних ограничења. Пре свега, ови подаци представљају информацију добијену од испитаника, а из културолошких и различитих других мотива могу бити нетачне. Људи из различитих порива крију своје лоше навике као што је пушење цигарета или злоупотреба алкохола. Треба имати на уму да пацијенти узимају у обзир очекивања лекара приликом прегледа, а страх и осећање кривице да је њихово малигно обољење директно проузроковано сопственим лошим избором и навикама може имати значаја за тачност података које дају. Студија Каривале (*Khariwala*) и коаутора из 2015. године показала је да не постоји корелација објективно мерених канцерогених маркера код пушача који болују од сквамоцелуларног карцинома горњег аеродигестивног траката и података које испитаници дају о пушењу цигарета (202).

Такође, испитивања везана за алкохол и дуван захтевају прецизну дефиницију. Неке особе нпр. не сматрају пиво алкохолним пићем, те је у испитивању неопходно поставити јасно формулисана питања типа „Да ли конзумирате пића као што је пиво, вино, жестоко алкохолно пиће?“ итд.

Број попушених цигарета, број удахнутих димова по цигарети, дубина удаха, количина унетих алкохолних пића и временски период њиховог конзумирања могу имати битан ефекат на резултате истраживања (203).

Број попушених цигарета и временски период пушења обично се узимају за меру изложености токсинима и канцерогенима дувана, степена зависности и нивоа ризика коме је човек изложен. У нашој студији пушачима смо дефинисали испитанике који у последњих 5 година пуше бар 20 цигарета на дан. Међутим, количина никотина и осталих токсичних и канцерогених супстанци разликује се међу различитим врстама цигарета, образац понашања што се пушења цигарета тиче може бити код исте индивидуе различит у различитом временском периоду, начин на који неко пуши цигарете може имати утицаја на унос никотина, токсина и карциногена. Чињеница је да постоје и тзв. „повремени пушачи“, а дефиниција ове категорије испитаника такође се разликује у литератури (204).

Такође је вредан пажње податак да су практично сви испитаници оболели од ПЦКЛ у нашој студији из групе непушача заправо били бивши пушачи. Сматра се да ризик за настанак малигну оболела главе и врата опада са престанком пушења, али да и даље постоји. Шлехт (*Schlecht*) и коаутори показали су да у случају карцинома ларинкса и након више од 20 година од престанка пушења релативни ризик за настанак карцинома ларинкса износи 3,63, док је за карцином фаринкса 1,52, а усне дупље 1,61 (205).

Из свега наведеног јасно је да механизам настанка малигног тумора ларинкса представља сложену интеракцију фактора домаћина, пушења, алкохола и инфламације. Потенцијална анти-туморска терапија могла би бити усмерена на модификовање инфламаторне средине у циљу фаворизовања анти-туморског имунитета тако да урођени имунитет има ефекта.

У новије време истраживања терапије малигну болести усмерена су ка имунској терапији коју Национални Институт за Канцер (*National Cancer Institute*) дефинише као биолошку терапију која стимулише или супримира имунски одговор у циљу одбране организма од малигне болести, инфекције или других болести.

Цитокини су у претклиничким студијама показали моћно анти-туморско дејство пружајући основу за потенцијалну терапију малигну болести. Међутим, упркос обећавајућим резултатима, у моделима на експерименталним животињама, само мали број цитокина (*IL-2*, *IFN- α* , рекомбинантни *TNF*) је одобрен за клиничку примену као анти-туморска терапија и то за метастатски карцином бубрега, меланом, *hairy cell* леукемију,

хронични мијелоидни лимфом, сарком и мултипли мијелом (206). Код карцинома главе и врата проучавани су терапијски ефекти *IL-2*, *IFN- γ* и *IL-12*, али њихово анти-туморско дејство је у студијама показало ограничен успех (207). Разлог неуспеха анти-туморске имунске терапије вероватно лежи у нашем ограниченом познавању ћелијских и молекулских механизма сложене интеракције туморских и ћелија имунског система.

Имунска терапија усмерена на карциноме главе и врата, а у циљу стимулisaња имунског одговора ради побољшања преживљавања и смањења морбидитета, може се поделити на 4 модалитета: терапија вакцинама, моноклонска антитела, онколитични вируси и имуномодулатори (208). С обзиром да је према резултатима наше студије *IL-12* најбољи показатељ прогресије ПЦКЛ, овај цитокин би могао представљати мету антутуморске терапије код ове врсте тумора.

Терапија *IL-12* спада у имуномодулаторну терапију. Имуномодулатори представљају разнолику групу малих молекула који имају за циљ повећање анти-туморског одговора домаћина. У целини гледано, они делују стимулаторно на цео имунски систем, пре него што представљају специфични анти-туморски одговор.

Студије на експерименталним животињама су показале да интратуморско дејство *IL-12* доводи до регресије болести (209). Међутим, клиничка примена *IL-12* битно је лимитирана системским токсичним ефектима до којих доводи. Истраживање Ван Херпена (*Van Herpen*) у коме су били укључени пацијенти са карциномом главе и врата, интратуморска примена *IL-12* довела је до редистрибуције лимфоцита из периферне крви у увећане лимфне чворове на врату, значајног повећања броја *NK* ћелија и смањења броја *Th* ћелија у лимфним чворовима и самом примарном тумору, повећања транскрипције *IFN- γ* у лимфним чворовима и преминацију *Th2* у односу на *Th1* имунски одговор. Међутим, студија је показала изражено токсично дејство на јетру као и појаву значајне метаболичке ацидозе (108).

Из разлога што системска имуномодулаторна терапија има озбиљне нежељене ефекте, а жељени ефекат је дејство цитокина на ћелије примарног тумора или метастатских промена, новија истраживања се баве специфичним начинима интратуморске апликације

IL-12 путем генетског инжињеринга или коришћењем моноклонских антитела и њихових делова (206,210-213).

Такође, једна клиничка студија на пацијентима са метастатским меланомом показала је добре ефекте овог цитокина уз минималне системске ефекте (214). Према Бану (*Bann*), тренутно је у клиничкој фази испитивање примене *IL-12* код пацијената са карцинома главе и врата (208).

Важно је узети у обзир да серумске вредности цитокина можда не представљају адекватну слику интеракције тумора и имунског система домаћина. Мерење концентрације цитокина у крви има својих специфичности, пре свега јер одражава системски одговор на низ стања организма. Радови показују да се имунски маркери код карцинома плућа налазе у различитим концентрацијама у бронхоалвеоларном лавату и туморској микроциркулацији у односу на периферну крв (215,216). Туморска микросредина, која се састоји од туморских ћелија, ћелија имунског система, туморске строме, крвних судова, инфламаторних и других ћелија, представља место непосредне интеракције тумора са домаћином, док системски имунски одговор одражава бројна стања у организму.

У ограничења наше студије, као и других студија које се баве испитивањем серумских вредности цитокина, треба убројати и могуће техничке појединости. Наиме, с обзиром на веома различите резултате у појединим студијама треба увек имати на уму и различите методолошке приступе. Данашњи комерцијални китови омогућавају мерење великог броја цитокина у релативно малом узорку, али је важан податак која је од метода употребљена у студији. Такође, детаљи узорковања могу бити од значаја на резултате. Показано је да на концентрације цитокина може имати утицаја низ фактора од којих је један доба дана када је узорак узет. Показало се да *IFN- γ* , *TNF- α* и *IL-12* показују циркадијални ритам у продукцији, па су им највеће концентрације у крви у јутарњим часовима. Врста хране, хидрираност и јачина физичке активности пре узорковања такође имају значајан утицај. Концентрације *IL-6* и *TNF- α* зависе од нивоа масти у крви, док велика физичка активност утиче на повећање нивоа *IL-6* и *IL-10* у крви. Врсте антикоагуланса који се налази у епрувети за узорковање могу утицати на измерену концентрацију појединих цитокина. Велики значај има податак да ли се користи серум или плазма. Коришћење серума

подразумева уклањање фибриногена, тромбоцита и других циркулишућих протеина. Ћелије током процеса коагулације могу додатно ослобађати медијаторе инфламације и тако утицати на њихову концентрацију. Значајно је и време које протекне од узимања узорка до одвајања серума од ћелијских елемената. Познато је да цитокини имају кратак полу-живот, ниво *IL-6* у узорку целе крви опада, док *TNF-α* расте на собној температури (217).

Резултати ове студије указују на сложеност интеракције малигног тумора, инфламације, фактора средине и фактора домаћина, али и ограничења тренутних знања и могућности детекције цитокина у серуму оболелих од ПЦКЛ. Циљ будућих студија требао би бити идентификација објективних серумских параметара који би представљали поуздане маркере присуства и прогресије ПЦКЛ.

6. ЗАКЉУЧЦИ

1. Серумске вредности *Th1* цитокина (*IL-2*, *IL-12* и *IFN- γ*), *Th2* цитокина (*IL-4*, *IL-5*, *IL-9*, *IL-10* и *IL-13*), *IL-17*, *IL-22* и проинфламаторних цитокина (*IL-6*, *IL-1 β* и *TNF- α*) не разликују се код оболелих од ПЦКЛ у односу на здраве испитанике.
2. Раст примарног ПЦКЛ, односно прогресија ка узнатредовалим (*T3/T4*) *T* стадијумима болести, праћен је снижењем серумских концентрација *Th1* цитокина *IL-12*.
3. Раст примарног ПЦКЛ, односно прогресија ка узнатредовалим (*T3/T4*) *T* стадијумима болести, праћен је растом серумских вредности *Th2* цитокина *IL-10*.
4. Регионална проширеност ПЦКЛ (*N+*) праћена је снижењем серумских концентрација *Th1* цитокина *IL-12*.
5. У почетним (*T1/T2*) *T* стадијумима болести серумске вредности *IL-12*, *IL-6*, *IL-10*, *IL-13*, *IL-9* и *IL-1 β* повишене су код супраглотисних у односу на глотисне туморе.
6. Концентрације цитокина *IL-10* и *IL-22* повишене су у серуму оболелих од ПЦКЛ са нижим степеном диферентованости тумора (*HG2*) у односу на добро диферентоване туморе (*HG1*).
7. Серумске концентрације проинфламаторних цитокина *IL-1 β* и *TNF- α* су ниже код пацијената са ПЦКЛ у групи пушача у односу на непушаче.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Stranding S. Neck and upper aerodigestive tract-Larynx. In: Stranding S, Berkovitz BKB, Hackney CM, editors. Grey's anatomy, 39th edition. Elsevier Churchill Livingstone; 2005.p. 636-643.
2. Lačković V, Nikolić IR, Todorović V. Respiratorni sistem. In: Nikolić IR, editor. Osnovna i oralna histologija i embriologija. 2nd edition. Datastatus; 2014. p. 173-174.
3. Jennings CR. Surgical anatomy of the neck. In: Flint PW, Haughey BH, Lund VJ, et al, editors. Cummings Otolaryngology - Head and Neck Surgery, 5th edition. Philadelphia: Saunders; 2010. p. 1746-1749.
4. Sessions RB, Harrison LB, Forastiere AA. Tumors of the Larynx and Hypopharynx. In: Devita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. Cancer: Principles and Practice of Oncology, 6th edition. Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p 631-637.
5. Lott DG, Hinni ML. Transoral surgery for supraglottic larynx cancer. In: Hinni ML, Lott DG, editors. Contemporary transoral surgery for primary head and neck carcinoma. Plural Publishing, San Diego; 2015. p. 109-110.
6. Incidencija i mortalitet od raka u centralnoj Srbiji 2013. Registar za rak u centralnoj Srbiji, izveštak broj 15. Miljuš D, Živković S, Božić Z, editors. Institut za zaštitu zdravlja Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“. 2015.
7. Cancer Incidence in Five Continents Vol. VIII. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB, editors. IARC Scientific Publications (No.155); Lyon, France; 2002.
8. Stricker TP, Kumar V. Tumori.. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN, editors. Robinsove osnove patologije. Datastatus; 2010. p. 173-223.
9. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. WHO histological classification of tumours of the hypopharynx, larynx and trachea. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, editors. Pathology and genetics of head and neck tumours. Lyon, France: IARC Press; 2005. p. 108.

10. Maitra A, Kumar V. Pluća. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN, editors. Robinsove osnove patologije. Datastatus; 2010. p. 538-539.
11. Seethala RR, Weinreb I, McHugh JB, Harrison LB, Richardson MS, Shah J, Feris RL, Wenig BM, Thompson LDR, Protocol for the Examination of Specimens from Patients With Carcinoma of the Larynx, Based on AJCC/UICC TNM. College of American pathologists, 7th edition. Protocol web posting date: October 2013.p. 7.
12. Conventional squamous cell carcinoma. In: Mills SE, Stelow EB, Hunt JL, editors. Tumors of the upper aerodigestive tract and ear. Silver Spring, MD: ARP Press; 2012. p. 41-80.
13. Dok R, Nuyts S. HPV positive head and neck cancers: molecular pathogenesis and evolving treatment strategies. *Cancers (Basel)* 2016; 29; 8(4).
14. Koufman JA, Burke AJ. The etiology and pathogenesis of laryngeal carcinoma. *Otolaryngol Clin North Am* 1997; 30(1): 1-19.
15. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100(1): 57-70.
16. Abbas AK, Lichtam AH, Pillai S. Immunity to tumors. In: Abbas AK, Lichtam AH, Pillai S, editors. *Cellular and molecular immunology*, 7th edition. Elsevier Saunders Philadelphia; 2012. p. 389-399.
17. Kim R, Emi M, Tanabe K, Arihiro K. Tumor-driven evolution of immunosuppressive networks during malignant progression. *Cancer Res* 2006; 66 (11): 5527-5536.
18. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN. Poremećaji imenskog sistema. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN, editors. Robinsove osnove patologije. Datastatus; 2010. p. 107-119.
19. Abbas AK, Lichtam AH, Pillai S. Activation of T lymphocytes. In: Abbas AK, Lichtam AH, Pillai S, editors. *Cellular and molecular immunology*, 7th edition. Elsevier Saunders Philadelphia; 2012. p. 214-219.

20. Wan YY. Multi-tasking of helper T cells. *Immunology* 2010; 130: 166-171.
21. Yang B, Kang H, Fung A, Zhao H, Wang T, Ma D. The role of interleukin 17 in proliferation, angiogenesis, and metastasis. *Mediators Inflamm* 2014; 623759.
22. Lim C, Savan R. The role of the IL-22/IL-22R1 axis in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2014;25(3): 257-271.
23. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Properties and overview of immune responses. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, editors. *Cellular and molecular immunology*, 7th edition. Elsevier Saunders Philadelphia; 2012. p. 8-10.
24. Becker Y. Molecular immunological approaches to biotherapy of human cancers- a review, hypothesis and implications. *Anticancer Res* 2006; 26: 1113-1114.
25. Bleotu C, Chifiriuc MC, Grigore R, Grancea C, Popescu CR, Anton G et al. Investigation of Th1/Th2 cytokine profiles in patients with laryngo-pharyngeal, HPV-positive cancers. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2013; 270: 711-718.
26. Eyigor M, Eyigor H, Osma U, Yilmaz MD, Erin N, Selcuk OT et al. Analysis of serum cytokine levels in larynx squamous cell carcinoma and dysplasia patients. *Iran J Immunol* 2014; 11: 259-268.
27. Müller-Hübenthal B, Azemar M, Lorenzen D, Huber M, Freudenberg MA, Galanos C et al. Tumour biology: tumour-associated inflammation versus antitumor immunity. *Anticancer Res* 2009; 29: 4795-4806.
28. Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest* 2007; 117: 1175-1183.
29. Candido J, Hagemann T. Cancer-related inflammation. *J Clin Immunol* 2013; Suppl 1: S79-84.

30. Meng CD, Zhu DD, Jiang XD, Li L, Sha JC, Dong Z et al. Overexpression of interleukin-17 in tumor-associated macrophages is correlated with the differentiation and angiogenesis of laryngeal squamous cell carcinoma. *Chin Med J (Engl)* 2012; 125(9):1603-1607.
31. Kopta R, Mochocki M, Morawski P, Brzezińska-Blaszczyk E, Lewy-Trenda I, Student Scientific Circle et al. Expression of Th17 cell population regulatory cytokines in laryngeal carcinoma – Preliminary study. *ContempOncol (Pozn)* 2015; 19: 195-200.
32. Li FJ, Cai ZJ, Yang F, Zhang SD, Chen M. Th17 expression and IL-17 levels in laryngeal squamous cell carcinoma patients. *Acta Otolaryngol* 2016; 136(5): 484-490.
33. National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. Helping Patients Who Drink Too Much: A Clinician's Guide. US Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. Updated 2005 edition.
34. SeethalaRR, WeinrebI, CarlsonDL, McHughJB, HarrisonLB, RichardsonMSetal. Protocol for the examination of specimens from patients with carcinomas of the larynx based on AJCC/UICC TNM, 7th edition, Protocol web posting date: October 2013.
35. Tumori glave i vrata. In: Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind CH, editors. TNM klasifikacija malignih tumora, UICC. 7th edition. Wiley-Blackwell; 2009. p. 39-45.
36. Appendix III: Laboratory techniques commonly used in immunology. AbbasAK, Lichtman AH, Pober JS, editors. Cellular and molecular immunology. Philadelphia: W.B. Saunders company; 2004.p. 515-530.
37. FlowCytomix™ Multiple Analyte Detection User Guide. eBioscience. San Diego, CA.
38. Hathaway B, Landsittel DP, Gooding W, Whiteside TL, Grandis JR, Siegfried JM et al. Multiplexed analysis of serum cytokines as biomarkers in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Laryngoscope* 2005;115:522-7.
39. Chatenoud L, Garavello W, Pagan E, Bertuccio P, Gallus S, La Vecchia C et al. Laryngeal cancer mortality trends in European countries. *Int J Cancer* 2016; 138(4): 833-842.

40. Allen CT, Judd NP, Bui JD, Uppaluri R. The clinical implications of antitumor immunity in head and neck cancer. *Laryngoscope* 2012; 122: 144-157.
41. Molon B, Cali B, Viola A. T Cells and Cancer: How Metabolism Shapes Immunity. *Front Immunol.* 2016; 7:20.
42. Kim HJ, Cantor H. CD4 T-cell subset and tumor immunity: the helpful and the not-so-helpful. *Cancer Immunol Res* 2014; 2: 91-98.
43. Schott AK, Pries R, Wollenberg B. Permanent up-regulation of regulatory T-lymphocytes in patients with head and neck cancer. *Int J Mol Med* 2010; 26(1): 67-75.
44. Kurebayashi Y, Nagai S, Ikejiri A, Koyasu S. Recent advances in understanding the molecular mechanisms of the development and function of Th17 cells. *Genes Cells* 2013; 18(4): 247-265.
45. Berraondo P, Minute L, Ajona D, Corrales L, Melero I, Pio R. Innate immune mediators in cancer: between defense and resistance. *Immunol Rev* 2016; 274(1): 290-306.
46. Baskic D, Vujanovic L, Arsenijevic N, Whiteside TL, Myers EN, Vujanovic NL. Suppression of natural killer-cell and dendritic-cell apoptotic tumoricidal activity in patients with head and neck cancer. *Head Neck* 2013; 35(3): 388-398.
47. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol* 2011; 29: 235-271.
48. Steer HJ, Lake RA, Nowak AK, Robinson BW. Harnessing the immune response to treat cancer. *Oncogene.* 2010;29(48):6301-6313.
49. Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2006; 6(4): 295-307.

50. LaCelle MG, Jensen SM, Fox BA. Partial CD4 depletion reduces regulatory T cells induced by multiple vaccinations and restores therapeutic efficacy. *Clin Cancer Res* 2009; 15(22): 6881-6690.
51. Alhamarneh O, Amarnath SM, Stafford ND, Greenman J. Regulatory T cells: what role do they play in antitumor immunity in patients with head and neck cancer? *Head Neck* 2008; 30(2): 251-261.
52. Linos E, Raine T, Alonso A, Michaud D. Atopy and risk of brain tumors: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99(20): 1544-1550.
53. Gandini S, Lowenfels AB, Jaffee EM, Armstrong TD, Maisonneuve P. Allergies and the risk of pancreatic cancer: a meta-analysis with review of epidemiology and biological mechanisms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14(8): 1908-1916.
54. Linabery AM, Jurek AM, Duval S, Ross JA. The association between atopy and childhood/adolescent leukemia: a meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2010; 171(7): 749-764.
55. Vesterinen E, Pukkala E, Timonen T, Aromaa A. Cancer incidence among 78,000 asthmatic patients. *Int J Epidemiol* 1993; 22(6) :976-982.
56. Michaud DS, Langevin SM, Eliot M, Nelson HH, McClean MD, Christensen BC et al. Allergies and risk of head and neck cancer. *Cancer Causes Control* 2012; 23(8): 1317-1322.
57. Millrud CR, Hylander T, Kumlien Georen S, Kågedal Å, Winqvist O, Cardell LO. Inverse immunological responses induced by allergic rhinitis and head and neck squamous cell carcinoma. *PloS One* 2014; 9: e86796.
58. Filippidis FT, Schwartz SM, Becker N, Dyckhoff G, Kirschfink M, Dietz A et al. Association of history of allergies and influenza-like infections with laryngeal cancer in a case-control study. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2015; 272(8): 2063-2069.

59. Young MR. Protective mechanisms of head and neck squamous cell carcinoma from immune assault. *Head Neck* 2006; 28: 462-470.
60. De Costa AM, Schuyler CA, Walker DD, Young MR. Characterization of the evolution of immune phenotype during the development and progression of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Immunol Immunother* 2012; 61(6): 927-939.
61. Johnson SD, De Costa AM, Young MR. Effect of the premalignant and tumor microenvironment on immune cell cytokine production in head and neck cancer. *Cancers (Basel)* 2014; 6(2): 756-770.
62. Sun W, Li WJ, Fu QL, Wu CY, Lin JZ, Zhu XL et al. Functionally distinct subsets of CD4⁺ regulatory T cells in patients with laryngeal squamous cell carcinoma are indicative of immune deregulation and disease progression. *Oncol Rep* 2015; 33(1): 354-362.
63. Xu X, Wang R, Su Q, Huang H, Zhou P, Luan J et al. Expression of Th1- Th2- and Th17-associated cytokines in laryngeal carcinoma. *Oncol Lett* 2016; 12(3): 1941-1948.
64. Ivanova EA, Orekhov AN. T Helper Lymphocyte Subsets and Plasticity in Autoimmunity and Cancer: An Overview. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 327470.
65. Müller-Hübenthal B, Azemar M, Lorenzen D, Huber M, Freudenberg MA, Galanos C et al. Tumour biology: tumour-associated inflammation versus antitumor immunity. *Anticancer Res* 2009; 29:4795-806
66. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998 Mar 19; 392(6673): 245-252.
67. Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000; 85(1): 9-18.
68. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome.

Science 2006; 313(5795): 1960-1964.

69. Mattes J, Hulett M, Xie W, Hogan S, Rothenberg ME, Foster P et al. Immunotherapy of cytotoxic T cell-resistant tumors by T helper 2 cells: an eotaxin and STAT6-dependent process. *J Exp Med* 2003; 197(3): 387-393.

70. Ochi A, Nguyen AH, Bedrosian AS, Mushlin HM, Zarbakhsh S, Barilla R et al. MyD88 inhibition amplifies dendritic cell capacity to promote pancreatic carcinogenesis via Th2 cells. *J Exp Med* 2012; 209(9): 1671-1687.

71. Tatsumi T, Kierstead LS, Ranieri E, Gesualdo L, Schena FP, Finke JH et al. Disease-associated bias in T helper type 1 (Th1)/Th2 CD4(+) T cell responses against MAGE-6 in HLA-DRB10401(+) patients with renal cell carcinoma or melanoma. *J Exp Med* 2002; 196(5): 619-628.

72. Chiang YY, Tsai MH, Lin TY, Chiang IP. Expression profile of metastasis-related genes in invasive oral cancers. *Histol Histopathol* 2008; 23(10): 1213-1222.

73. Shimizu Y, Kondo S, Shirai A, Furukawa M, Yoshizaki T. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 and interleukin-8 gene promoter predicts poor prognosis in tongue cancer. *Auris Nasus Larynx* 2008; 35(3): 381-389.

74. Hopkins J, Cescon DW, Tse D, Bradbury P, Xu W, Ma C et al. Genetic polymorphisms and head and neck cancer outcomes: a review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17(3): 490-499.

75. López RV, Zago MA, Eluf-Neto J, Curado MP, Daudt AW, da Silva-Junior WA et al. Education, tobacco smoking, alcohol consumption, and IL-2 and IL-6 gene polymorphisms in the survival of head and neck cancer. *Braz J Med Biol Res* 2011; 44(10): 1006-1012.

76. Trivedi S, Rosen CA, Ferris RL. Current understanding of the tumor microenvironment of laryngeal dysplasia and progression to invasive cancer. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2016; 24(2): 121-127.

77. Hoffmann TK, Sonkoly E, Homey B, Scheckenbach K, Gwosdz C, Bas M et al. Aberrant cytokine expression in serum of patients with adenoid cystic carcinoma and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 2007; 29: 472-478.
78. Jebreel A, Mistry D, Loke D, Dunn G, Hough V, Oliver K et al. Investigation of interleukin 10, 12 and 18 levels in patients with head and neck cancer. *J Laryngol Otol* 2007; 121: 246-252.
79. Lathers DM, Achille NJ, Young MR. Incomplete Th2 skewing of cytokines in plasma of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Hum Immunol* 2003; 64: 1160-1166.
80. Kaskas NM, Moore-Medlin T, McClure GB, Ekshyyan O, Vanchiere A, Nathan CA. Serum biomarkers in head and neck squamous cell cancer. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 2014; 140: 5-11.
81. Kacani L, Wurm M, Schennach H, Braun I, Andrlé J, Sprinzl GM. Immunosuppressive effects of soluble factors secreted by head and neck squamous cell carcinoma on dendritic cells and T lymphocytes. *Oral Oncol* 2003; 39(7): 672-679.
82. Pai SI, Westra WH. Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis and treatment. *Annu Rev Pathol* 2009; 4: 49-70.
83. Westra WH. The changing face of head and neck cancer in the 21st century: The impact of HPV on the epidemiology and pathology of oral cancer. *Head Neck Pathol* 2009; 3: 78-81.
84. Partlová S, Bouček J, Kloudová K, Lukešová E, Zábrodský M, Grega M et al. Distinct patterns of intratumoral immune cell infiltrates in patients with HPV-associated compared to non-virally induced head and neck squamous cell carcinoma. *Oncoimmunology* 201530; 4(1): e965570.
85. Günaydın RÖ, Kesikli SA, Kansu E, Hoşal AŞ. Identification of the peripheral blood levels of interleukin-12, interleukin-10, and transforming growth factor- β in patients with laryngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2012; 34(3): 393-397.

86. Melinceanu L, Lerescu L, Tucureanu C, Caras I, Pitica R, Sarafoleanu C et al. Serum perioperative profile of cytokine in patients with squamous cell carcinoma of the larynx. *J Otolaryngol Head Neck Surg* 2011; 40: 143-150.
87. Eyigor M, Eyigor H, Osma U, Yilmaz MD, Erin N, Selcuk OT et al. Analysis of serum cytokine levels in larynx squamous cell carcinoma and dysplasia patients. *Iran J Immunol* 2014; 11: 259-268.
88. Nikakhlagh S, Ranjbari N, Khorami E, Saki N. Association between serum levels of interleukin-6 and stage of laryngeal cancer. *Iran J Otorhinolaryngol* 2015; 27: 199-205.
89. Zhou J, Zhang D, Chen B, Li Q, Zhou L, Liu F et al. Association of interleukin -10 promoter polymorphisms and corresponding plasma levels with susceptibility to laryngeal squamous cell carcinoma. *Oncol Lett* 2014;7:1721-1727.
90. Sparano A, Lathers DM, Achille N, Petruzzelli GJ, Young MR. Modulation of Th1 and Th2 cytokine profiles and their association with advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;131:573–576.
91. Geginat J, Larghi P, Paroni M, Nizzoli G, Penatti A, Pagani M et al. The light and the dark sides of Interleukin-10 in immune-mediated diseases and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2016; 30: 87-93.
92. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat.Rev.Immunol* 2008; 8: 523–532.
93. Alhamarneh O, Amarnath SM, Stafford ND, Greenman J. Regulatory T cells: what role do they play in antitumor immunity in patients with head and neck cancer? *Head Neck* 2008; 30: 251– 261.
94. Chen W, Ye F, Cui M, Sikora AG, Wang X, Wang P et al. Protein marker profiling in different T classification in laryngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2015; 37(3): 357-365.

95. Chung CK, Stryker JA, Abt AB, Cunningham DE, Strauss M, Connor GH. Histologic grading in the clinical evaluation of laryngeal carcinoma. *Arch Otolaryngol* 1980; 106(10): 623-624.
96. Cosetti M, Yu GP, Schantz SP. Five-year survival rates and time trends of laryngeal cancer in the US population. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2008; 134(4): 370-379.
97. Dobroś W, Gil K, Chłap Z, Olszewski E. The use of nuclear morphometry for the prediction of survival in patients with advanced cancer of the larynx. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1999; 256(5): 257-261.
98. Garavello W, Ciardo A, Spreafico R, Gaini RM. Risk factors for distant metastases in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2006; 132(7): 762-766.
99. Ozdek A, Sarac S, Akyol MU, Unal OF, Sungur A. Histopathological predictors of occult lymph node metastases in supraglottic squamous cell carcinomas. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2000; 257(7): 389-392.
100. Jiang R, Tan Z, Deng L, Chen Y, Xia Y, Gao Y et al. Interleukin-22 promotes human hepatocellular carcinoma by activation of STAT3. *Hepatology* 2011; 54(3) : 900-909.
101. Kobold S, Völk S, Clauditz T, Küpper NJ, Minner S, Tufman A et al. Interleukin-22 is frequently expressed in small- and large-cell lung cancer and promotes growth in chemotherapy-resistant cancer cells. *J Thorac Oncol* 2013; 8(8): 1032-1042.
102. Zhuang Y, Peng LS, Zhao YL, Shi Y, Mao XH, Guo G et al. Increased intratumoral IL-22-producing CD4(+) T cells and Th22 cells correlate with gastric cancer progression and predict poor patient survival. *Cancer Immunol Immunother* 2012; 61(11): 1965-1975.
103. Zhang F, Shang D, Zhang Y, Tian Y. Interleukin-22 suppresses the growth of A498 renal cell carcinoma cells via regulation of STAT1 pathway. *PLoS ONE* 2011;6:e20382.

104. Weber GF, Gaertner FC, Erl W, Janssen KP, Blechert B, Holzmann B et al. IL-22-mediated tumor growth reduction correlates with inhibition of ERK1/2 and AKT phosphorylation and induction of cell cycle arrest in the G2-M phase. *J Immunol* 2006;177(11):8266–8272.
105. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet* 2008; 371(9625): 1695-1709.
106. Green VL, Michno A, Green J, Stafford ND. Effect of treatment on systemic cytokines in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Results Immunol* 2012; 2:1-6.
107. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 133–46.
108. van Herpen CM, Looman M, Zonneveld M, Scharenborg N, de Wilde PC, van de Locht L et al. Intratumoral administration of recombinant human interleukin 12 in head and neck squamous cell carcinoma patients elicits a T-helper 1 profile in the locoregional lymph nodes. *Clin Cancer Res* 2004; 10(8): 2626-2635.
109. Moran JP, Gerber SA, Martin CA, Frelinger JG, Lord EM. Transfection of the genes for interleukin-12 into the K1735 melanoma and the EMT6 mammary sarcoma murine cell lines reveals distinct mechanisms of antitumor activity. *Int. J. Cancer* 2003; 106(5):690–698.
110. Zundler S, Neurath MF. Interleukin-12: Functional activities and implications for disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2015; 26(5): 559-568.
111. Sorensen EW, Gerber SA, Frelinger JG, Lord EM. IL-12 suppresses vascular endothelial growth factor receptor 3 expression on tumor vessels by two distinct IFN- γ -dependent mechanisms. *J Immunol* 2010; 184(4):1858-1866.
112. Kortylewski M, Xin H, Kujawski M, Lee H, Liu Y, Harris T et al. Regulation of the IL-23 and IL-12 balance by Stat3 signaling in the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 2009; 15(2): 114-123.

113. Atkins MB, Robertson MJ, Gordon M, Lotze MT, DeCoste M, DuBois JS, Ritz J, Sandler AB, Edington HD, Garzone PD, et al. Phase I evaluation of intravenous recombinant human interleukin 12 in patients with advanced malignancies. *Clin. Cancer Res.* 1997; 3(3):409–417.

114. Gollob JA, Mier JW, Veenstra K, McDermott DF, Clancy D, Clancy M et al. Phase I trial of twice-weekly intravenous interleukin 12 in patients with metastatic renal cell cancer or malignant melanoma: ability to maintain IFN-gamma induction is associated with clinical response. *Clin. Cancer Res* 2000; 6(5):1678–1692.

115. Gollob JA, Mier JW, Atkins MB. Clinical use of systemic IL-12 therapy. *Cancer Chemother. Biol. Response Modif.* 2001; 19:353–369.

116. Liang W, Wang XF. In vitro induction of specific anti-tumoral immunity against laryngeal carcinoma by using human interleukin-12 gene-transfected dendritic cells. *Chin Med J (Engl)* 2011; 124(9): 1357-1361.

117. Tian L, Chen X, Sun Y, Liu M, Zhu D, Ren J. Growth suppression of human laryngeal squamous cell carcinoma by adenoviral-mediated interleukin-12. *J Int Med Res* 2010; 38(3): 994-1004.

118. Haque MN, Siddique MA, Islam MM, Bhuiyan RU, Hossain MA, Hoq MR et al. Regional metastasis in supraglottic and glottic carcinoma of larynx. *Mymensingh Med J* 2014; 23(1): 121-124.

119. Mor N, Blitzer A(2). Functional anatomy and oncologic barriers of the larynx. *Otolaryngol Clin North Am* 2015; 48(4): 533-545.

120. Mojtahedi Z, Khademi B, Hashemi SB, Abtahi SM, Ghasemi MA, Fattahi MJ et al. Serum interleukin-6 concentration, but not interleukin-18, is associated with head and neck squamous cell carcinoma progression. *Pathol Oncol Res* 2011; 17(1):7-10.

121. Hao W, Zhu Y, Zhou H. Prognostic value of interleukin-6 and interleukin-8 in laryngeal squamous cell cancer. *Med Oncol* 2013; 30(1): 333.

122. Shkeir O, Athanassiou-Papaefthymiou M, Lapadatescu M, Papagerakis P, Czerwinski MJ, Bradford CR et al. In vitro cytokine release profile: predictive value for metastatic potential in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2013; 35(11): 1542-1550.
123. Bommert K, Bargou RC, Stühmer T. Signalling and survival pathways in multiple myeloma. *Eur J Cancer* 2006; 42(11): 1574-1580.
124. Osborne J, Moore PS, Chang Y. KSHV-encoded viral IL-6 activates multiple human IL-6 signaling pathways. *Hum Immunol* 1999; 60(10): 921-927.
125. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001; 357(9255): 539-45.
126. Schäfer M, Werner S. Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9(8): 628-638.
127. Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin Orthop Relat Res* 1991; 262:3-11.
128. Sipaul F, Ling B, Mason C, Keast A. Spontaneous regression of laryngeal squamous cell carcinoma. *J Laryngol Otol* 2015; 129(12): 1248-1250.
129. Pidgeon GP, Harmey JH, Kay E, Da Costa M, Redmond HP, Bouchier-Hayes DJ. The role of endotoxin/lipopolysaccharide in surgically induced tumour growth in amurine model of metastatic disease. *Br J Cancer* 1999;81(8):1311-1317.
130. Taketomi A, Takenaka K, Matsumata T, Shimada M, Higashi H, Shirabe K et al. Circulating intercellular adhesion molecule-1 in patients with hepatocellular carcinoma before and after hepatic resection. *Hepatogastroenterology* 1997; 44(14): 477-483.
131. Monzon FA, Ogino S, Hammond ME, Halling KC, Bloom KJ, Nikiforova MN. The role of KRAS mutation testing in the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2009; 133(10): 1600-1606.

132. Moss SF, Malfertheiner P. Helicobacter and gastric malignancies. *Helicobacter* 2007; 12 Suppl 1: 23-30.

133. Han J, Ulevitch RJ. Limiting inflammatory responses during activation of innate immunity. *Nat Immunol* 2005; 6(12): 1198-205.

134. Pesic M, Greten FR. Inflammation and cancer: tissue regeneration gone awry. *Curr Opin Cell Biol* 2016; 43: 55-61.

135. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008; 454(7203): 436-44.

136. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010; 140(6): 883-899.

137. Leibovich-Rivkin T, Liubomirski Y, Bernstein B, Meshel T, Ben-Baruch A. Inflammatory factors of the tumor microenvironment induce plasticity in nontransformed breast epithelial cells: EMT, invasion, and collapse of normally organized breast textures. *Neoplasia* 2013; 15(12): 1330-1346.

138. Santarpia L, Lippman SM, El-Naggar AK. Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2012; 16(1): 103-119.

139. Müller-Hübenthal B, Azemar M, Lorenzen D, Huber M, Freudenberg MA, Galanos C et al. Tumour Biology: tumour-associated inflammation versus antitumor immunity. *Anticancer Res* 2009; 29(11): 4795-4805.

140. Kolodecik T, Shugrue C, Ashat M, Thrower EC. Risk factors for pancreatic cancer: underlying mechanisms and potential targets. *Front Physiol* 2014; 4:415.

141. Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001; 410(6824): 50-56.

142. Kulbe H, Thompson R, Wilson JL, Robinson S, Hagemann T, Fatah R et al. The inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha generates an autocrine tumor-promoting network in epithelial ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2007; 67(2): 585-592.
143. Taylor JD. COPD and the response of the lung to tobacco smoke exposure. *Pulm Pharmacol Ther* 2010; 23(5): 376-383.
144. Le Rouzic O, Koné B, Kluza J, Marchetti P, Hennegrave F, Olivier C et al. Cigarette smoke alters the ability of human dendritic cells to promote anti-*Streptococcus pneumoniae* Th17 response. *Respir Res* 2016; 17(1): 94.
145. Clavel J. Progress in the epidemiological understanding of gene-environment interactions in major diseases: cancer. *C R Biol* 2007; 330(4): 306-317.
146. Arnson Y, Shoenfeld Y, Amital H. Effects of tobacco smoke on immunity, inflammation and autoimmunity. *J Autoimmun* 2010; 34(3): J258-265.
145. Cui WY, Li MD. Nicotinic modulation of innate immune pathways via $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *J Neuroimmune Pharmacol* 2010;5(4): 479-488.
146. Zeidel A, Beilin B, Yardeni I, Mayburd E, Smirnov G, Bessler H. Immune response in asymptomatic smokers. *Acta Anaesthesiol Scand* 2002; 46(8): 959-964.
147. Waters JP, Pober JS, Bradley JR. Tumour necrosis factor in infectious disease. *J Pathol* 2013; 230(2): 132-47.
148. Ozkurede VU, Franchi L. Immunology in clinic review series; focus on autoinflammatory diseases: role of inflammasomes in autoinflammatory syndromes. *Clin Exp Immunol* 2012; 167(3): 382-390.
149. Bates RC, Mercurio AM. Tumor necrosis factor-alpha stimulates the epithelial-to-mesenchymal transition of human colonic organoids. *Mol Biol Cell* 2003; 14(5): 1790-1800.

150. Popivanova BK, Kitamura K, Wu Y, Kondo T, Kagaya T, Kaneko S et al. Blocking TNF- α in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. *J Clin Invest* 2008; 118(2): 560-570.
151. Egberts JH, Cloosters V, Noack A, Schniewind B, Thon L, Klose S et al. Anti-tumor necrosis factor therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis. *Cancer Res* 2008;68(5):1443–1450.
152. Liu F, Ai F, Tian L, Liu S, Zhao L, Wang X. Infliximab enhances the therapeutic effects of 5-fluorouracil resulting in tumor regression in colon cancer. *Onco Targets Ther* 2016; 9: 5999-6008.
153. Mocellin S, Rossi CR, Pilati P, Nitti D. Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16(1):35–53.
154. Yin S, Lan C, Pei H, Zhu Z. Expression of interleukin 1 β in gastric cancer tissue and its effects on gastric cancer. *Onco Targets Ther* 2015;9: 31-35.
155. Chang PH, Pan YP, Fan CW, Tseng WK, Huang JS, Wu TH et al. Pretreatment serum interleukin-1 β , interleukin-6, and tumor necrosis factor- α levels predict the progression of colorectal cancer. *Cancer Med* 2016; 5(3): 426-433.
156. Zitvogel L, Kepp O, Galluzzi L, Kroemer G. Inflammasomes in carcinogenesis and anticancer immune responses. *Nat Immunol* 2012; 13(4): 343-351.
157. Yencilek F, Yildirim A, Yilmaz SG, Altinkilic EM, Dalan AB, Bastug Y et al. Investigation of Interleukin-1 β Polymorphisms in Prostate Cancer. *Anticancer Res* 2015; 35(11): 6057-6061.
158. Li Y, Zhao W, Zhao Z, Wu J, Chen L, Ma Y et al. IL1B gene polymorphisms, age and the risk of non-small cell lung cancer in a Chinese population. *Lung Cancer* 2015; 89(3): 232-237.
159. Xu J, Yin Z, Cao S, Gao W, Liu L, Yin Y et al. Systematic review and meta-analysis on the association between IL-1B polymorphisms and cancer risk. *PLoS One* 2013; 8(5): e63654.

160. Shiels MS, Katki HA, Freedman ND, Purdue MP, Wentzensen N, Trabert B, et al. Cigarette smoking and variations in systemic immune and inflammation markers. *J Natl Cancer Inst* 2014;106(11).

161. Ouyang Y, Virasch N, Hao P, Aubrey MT, Mukerjee N, Bierer BE et al. Suppression of human IL-1beta, IL-2, IFN-gamma, and TNF-alpha production by cigarette smoke extracts. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106(2): 280-287.

162. Kim TH, Kim SJ, Lee SM. Stimulation of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor protects against sepsis by inhibiting Toll-like receptor via phosphoinositide 3-kinase activation. *J Infect Dis* 2014; 209(10): 1668-1677.

163. Morozumi T, Kubota T, Sugita N, Itagaki M, Yoshie H. Alterations of gene expression in human neutrophils induced by smoking cessation. *J Clin Periodontol* 2004; 31(12): 1110-1116.

164. Bermudez EA, Rifai N, Buring JE, Manson JE, Ridker PM. Relation between markers of systemic vascular inflammation and smoking in women. *Am J Cardiol* 2002; 89(9): 1117-1119.

165. Glossop JR, Dawes PT, Matthey DL. Association between cigarette smoking and release of tumour necrosis factor alpha and its soluble receptors by peripheral blood mononuclear cells in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2006; 45(10): 1223-1229.

166. Hecht SS. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(10): 733-744.

167. Pfeifer GP, Denissenko MF, Olivier M, Tretyakova N, Hecht SS, Hainaut P. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene* 2002; 21(48): 7435-7451.

168. Hecht SS. Progress and challenges in selected areas of tobacco carcinogenesis. *Chem Res Toxicol* 2008; 21(1): 160-171.

169. Cao C, Lai T, Li M, Zhou H, Lv D, Deng Z et al. Smoking-promoted oxidative DNA damage response is highly correlated to lung carcinogenesis. *Oncotarget* 2016; 7(14): 18919-18926.
170. Manjunath MK, Annam V, Suresh DR. Significance of free radical injury in laryngeal and hypopharyngeal cancers. *J Laryngol Otol* 2010; 124(3): 315-317.
171. Young MR, Levingston CA, Johnson SD. Treatment to sustain a Th17-type phenotype to prevent skewing toward Treg and to limit premalignant lesion progression to cancer. *Int J Cancer* 2016; 138(10): 2487-2498.
172. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005; 6(11): 1133-1141. nova
173. Meng CD, Zhu DD, Jiang XD, Li L, Sha JC, Dong Z et al. Overexpression of interleukin-17 in tumor-associated macrophages is correlated with the differentiation and angiogenesis of laryngeal squamous cell carcinoma. *Chin Med J (Engl)* 2012; 125(9): 1603-1607.
174. Numasaki M, Watanabe M, Suzuki T, Takahashi H, Nakamura A, McAllister F et al. IL-17 enhances the net angiogenic activity and in vivo growth of human non-small cell lung cancer in SCID mice through promoting CXCR-2-dependent angiogenesis. *J Immunol* 2005; 175(9): 6177-6189.
175. Tong Z, Yang XO, Yan H, Liu W, Niu X, Shi Y et al. A protective role by interleukin-17F in colon tumorigenesis. *PLoS One* 2012;7(4): e34959.
176. Qian X, Chen H, Wu X, Hu L, Huang Q, Jin Y. Interleukin-17 acts as double-edged sword in anti-tumor immunity and tumorigenesis. *Cytokine* 2017; 89: 34-44.
177. Nuñez S, Saez JJ, Fernandez D, Flores-Santibañez F, Alvarez K, Tejon G et al. T helper type 17 cells contribute to anti-tumour immunity and promote the recruitment of T helper type 1 cells to the tumour. *Immunology* 2013; 139(1): 61-71.

178. Lança T, Silva-Santos B. The split nature of tumor-infiltrating leukocytes: Implications for cancer surveillance and immunotherapy. *Oncoimmunology* 2012; 1(5): 717-725.
179. Jochems C, Schlom J. Tumor-infiltrating immune cells and prognosis: the potential link between conventional cancer therapy and immunity. *Exp Biol Med (Maywood)* 2011; 236(5): 567-579.
180. Zhang X, Weng W, Xu W, Wang Y, Yu W, Tang X et al. Prognostic significance of interleukin 17 in cancer: a meta-analysis. *Int J ClinExp Med* 2014; 7(10): 3258-3269.
181. Zeng Y, Zhang Q, Wang H, Lu M, Kong H, Zhang Y et al. Prognostic significance of interleukin-17 in solid tumors: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8(7): 10515-10536.
182. Li FJ, Cai ZJ, Yang F, Zhang SD, Chen M. Th17 expression and IL-17 levels in laryngeal squamous cell carcinoma patients. *Acta Otolaryngol* 2016; 136(5): 484-490.
183. Kesselring R, Thiel A, Pries R, Trenkle T, Wollenberg B. Human Th17 cells can be induced through head and neck cancer and have a functional impact on HNSCC development. *Br J Cancer* 2010; 103(8): 1245-1254.
184. Bediaga NG, Marichalar-Mendia X, Rey-Barja N, Setien-Olarrá A, Gonzalez-Garcia JA, de Pancorbo MM et al. Polymorphisms in alcohol and tobacco metabolism genes in head and neck cancer in the Basque Country. *J Oral Pathol Med* 2015; 44(10): 769-775.
185. Tsaprouni LG, Yang TP, Bell J, Dick KJ, Kanoni S, Nisbet J et al. Cigarette smoking reduces DNA methylation levels at multiple genomic loci but the effect is partially reversible upon cessation. *Epigenetics* 2014; 9(10): 1382-1396.
186. Marichalar-Mendia X, Acha-Sagredo A, Rodriguez-Tojo MJ, Rey-Barja N, Hernando-Rodriguez M, Aguirregaviria JI et al. Alcohol-dehydrogenase (ADH1B) Arg48His polymorphism in Basque Country patients with oral and laryngeal cancer: preliminary study. *Anticancer Res* 2011; 31(2): 677-680.

187. Yu PJ, Chen WG, Feng QL, Chen W, Jiang MJ, Li ZQ. Association between CYP1B1 gene polymorphisms and risk factors and susceptibility to laryngeal cancer. *Med Sci Monit* 2015; 21: 239-245.
188. Li X, Xu J, Yang X, Wu Y, Cheng B, Chen D et al. Association of single nucleotide polymorphisms of nucleotide excision repair genes with laryngeal cancer risk and interaction with cigarette smoking and alcohol drinking. *Tumour Biol* 2014;35(5): 4659-4565.
189. Abbasi R, Ramroth H, Becher H, Dietz A, Schmezer P, Popanda O. Laryngeal cancer risk associated with smoking and alcohol consumption is modified by genetic polymorphisms in ERCC5, ERCC6 and RAD23B but not by polymorphisms in five other nucleotide excision repair genes. *Int J Cancer* 2009; 125(6): 1431-1439.
190. Wang J, Xu Y, Li J, Sun X, Wang LP, Ji WY. The tobacco-specific carcinogen NNK induces DNA methyltransferase 1 accumulation in laryngeal carcinoma. *Oral Oncol* 2012; 48(6): 541-546.
191. Khariwala SS, Hatsukami D, Hecht SS. Tobacco carcinogen metabolites and DNA adducts as biomarkers in head and neck cancer: potential screening tools and prognostic indicators. *Head Neck* 2012; 34(3): 441-447.
192. Khlifi R, Hamza-Chaffai A. Head and neck cancer due to heavy metal exposure via tobacco smoking and professional exposure: a review. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010; 248(2): 71-88.
193. Shangina O, Brennan P, Szeszenia-Dabrowska N, Mates D, Fabiánová E, Fletcher T et al. Occupational exposure and laryngeal and hypopharyngeal cancer risk in central and eastern Europe. *Am J Epidemiol* 2006; 164(4): 367-375.
194. Menvielle G, Fayossé A, Radoï L, Guida F, Sanchez M, Carton M et al.; ICARE study group. The joint effect of asbestos exposure, tobacco smoking and alcohol drinking on laryngeal cancer risk: evidence from the French population-based case-control study, ICARE. *Occup Environ Med* 2016; 73(1): 28-33.

195. Vassileiou A, Vlastarakos PV, Kandiloros D, Delicha E, Ferekidis E, Tzagaroulakis A et al. Laryngeal cancer: smoking is not the only risk factor. *B-ENT* 2012; 8(4): 273-278.
196. Shields GS, Kuchenbecker SY, Pressman SD, Sumida KD, Slavich GM. Better cognitive control of emotional information is associated with reduced pro-inflammatory cytokine reactivity to emotional stress. *Stress* 2016; 19(1): 63-68.
197. Young JJ, Bruno D, Pomara N. A review of the relationship between proinflammatory cytokines and major depressive disorder. *J Affect Disord* 2014; 169: 15-20.
198. Sturgis EM, Wei Q, Spitz MR. Descriptive epidemiology and risk factors for head and neck cancer. *Semin Oncol* 2004; 31(6): 726-733.
199. La Vecchia C, Zhang ZF, Altieri A. Alcohol and laryngeal cancer: an update. *Eur J Cancer Prev* 2008; 17(2): 116-124.
200. Islami F, Tramacere I, Rota M, Bagnardi V, Fedirko V, Scotti L et al. Alcohol drinking and laryngeal cancer: overall and dose-risk relation- a systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol* 2010; 46(11): 802-810.
201. Szabo G, Saha B. Alcohol's effect on host defense. *Alcohol Res* 2015; 37(2): 159-170.
202. Khariwala SS, Carmella SG, Stepanov I, Bandyopadhyay D, Nelson HH, Yueh B et al. Self-reported Tobacco use does not correlate with carcinogen exposure in smokers with head and neck cancer. *Laryngoscope* 2015; 125(8): 1844-1848.
203. Ramroth H, Dietz A, Becher H. Intensity and inhalation of smoking in the aetiology of laryngeal cancer. *Int J Environ Res Public Health* 2011; 8(4): 976-984.
204. Husten CG. How should we define light or intermittent smoking? Does it matter? *Nicotine Tob Res* 2009; 11(2): 111-121.

205. Schlecht NF, Franco EL, Pintos J, Negassa A, Kowalski LP, Oliveira BV et al. Interaction between tobacco and alcohol consumption and the risk of cancers of the upper aero-digestive tract in Brazil. *Am J Epidemiol* 1999; 150(11): 1129-1137.
206. Pasche N, Neri D. Immunocytokines: a novel class of potent armed antibodies. *Drug Discov Today* 2012; 17(11-12): 583-590.
207. Li Q, Prince ME, Moyer JS. Immunotherapy for head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2015; 51(4): 299-304.
208. Bann DV, Deschler DG, Goyal N. Novel immunotherapeutic approaches for head and neck squamous cell carcinoma. *Cancers (Basel)* 2016; 8(10).
209. Fallon J, Tighe R, Kradjian G, Guzman W, Bernhardt A, Neuteboom B et al. The immunocytokine NHS-IL12 as a potential cancer therapeutic. *Oncotarget* 2014; 5(7): 1869-1884.
210. Cutrera J, King G, Jones P, Kicenuik K, Gumpel E, Xia X et al. Safe and effective treatment of spontaneous neoplasms with interleukin 12 electro-chemo-gene therapy. *J Cell Mol Med* 2015; 19(3): 664-675.
211. Hernandez-Alcoceba R, Poutou J, Ballesteros-Briones MC, Smerdou C. Gene therapy approaches against cancer using in vivo and ex vivo gene transfer of interleukin-12. *Immunotherapy* 2016; 8(2): 179-198.
212. Liang W, Wang XF. In vitro induction of specific anti-tumoral immunity against laryngeal carcinoma by using human interleukin-12 gene-transfected dendritic cells. *Chin Med J (Engl)* 2011; 124(9): 1357-1361.
213. Zhang L, Morgan RA, Beane JD, Zheng Z, Dudley ME, Kassim SH et al. Tumor-infiltrating lymphocytes genetically engineered with an inducible gene encoding interleukin-12 for the immunotherapy of metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2015; 21(10): 2278-2288.

214. Daud AI, DeConti RC, Andrews S, Urbas P, Riker AI, Sondak VK et al. Phase I trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2008; 26(36): 5896-5903.

215. Cao C, Sun SF, Lv D, Chen ZB, Ding QL, Deng ZC. Utility of VEGF and sVEGFR-1 in bronchoalveolar lavage fluid for differential diagnosis of primary lung cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14(4): 2443-2446.

216. Karlicic V, Vukovic J, Stanojevic I, Sotirovic J, Peric A, Jovic M et al. Association of locally produced IL10 and TGFb1 with tumor size, histological type and presence of metastases in patients with lung carcinoma. *J BUON* 2016; 21(5): 1210-1218.

217. Zhou X, Fragala MS, McElhaney JE, Kuchel GA. Conceptual and methodological issues relevant to cytokine and inflammatory marker measurements in clinical research. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010; 13(5): 541-547.