



Značaj patohistološkog nalaza i ekspresije Bcl-2 za prognozu i lečenje oralnog planocelularnog karcinoma

Significance of pathohistological findings and the expression of Bcl-2 in diagnosis and treatment of oral planocellular carcinoma

Slobodan Lončarević*, Sanja Vignjević†, Nebojša Jović*, Ljubiša Aćimović‡, Milka Gardašević*, Vera Todorović†, Jovan Dimitrijević†

*Klinika za maksilofacijalnu hirurgiju, Vojnomedicinska akademija, Beograd, Srbija;

†Institut za medicinska istraživanja, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija, ‡Klinika za hirurgiju, Klinički centar Kragujevac, Kragujevac, Srbija

Apstrakt

Uvod/Cilj. Mnogobrojna istraživanja usmerena su na detekciju i karakterizaciju različitih tumorskih markera kod oralnog planocelularnog karcinoma sa ciljem da se smanji morbiditet i mortalitet, kao i uspostavi korelacija između stepena ekspresije određenog markera i prognoze bolesti. Cilj ovog rada bio je da se utvrde patohistološke karakteristike tumorskog i peritumorskog tkiva bolesnika sa oralnim planocelularnim karcinomom, posebno stepen ekspresije markera Bcl-2, da se ukaže na značaj korelacije klinikomorfoloških parametara, kao i na mogućnost primene ovih rezultata u kliničkoj praksi. **Metode.** Studija je obuhvatila 62 bolesnika u II i III stadijumu oralnog planocelularnog karcinoma, operisana u Klinici za maksilofacijalnu hirurgiju Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Kod svih bolesnika određivani su stadijum bolesti, patohistološki stepen diferentovanosti tumora, a imunohistohemijskom metodom prućena je ekspresija markera Bcl-2 u peritumorskom tkivu. **Rezultati.** U analiziranoj grupi bila su 24 (39%) bolesnika sa tumorom veličine T1, 6 (9%) bolesnika sa tumorom veličine T2, a 32 (52%) bolesnika sa primarnim tumorom veličine T3. Infiltracija tumora u peritumorskom tkivu verifikovana je patohistološkom analizom okolnog vezivnog, masnog, mišićnog tkiva i kosti, koji su bili zahvaćeni resekcijom. Utvrđena je statistički visokoznačajna pozitivna korelacija između stepena ekspresije proteina Bcl-2 u peritumorskom tkivu, sa jedne strane, i histološkog gradusa tumora ($\rho = 0,468$; $p < 0,001$), nukleusnog gradusa tumora ($\rho = 0,430$; $p < 0,001$) i nukleocitoplazmatskog odnosa u tumorskim ćelijama ($\rho = 0,410$; $p = 0,001$). **Zaključak.** Ekspresija Bcl-2 u kombinaciji sa patohistološkim parametrima može biti značajan prognostički faktor, pa mu treba posvetiti više pažnje u okviru multidisciplinarnog istraživanja prognoze oralnog planocelularnog karcinoma.

Ključne reči:

usta, neoplazme; karcinom, planocelularni; tumorski markeri, biološki; prognoza; lečenje, ishod; histološke tehnike; imunohistohemija.

Abstract

Background/Aim. Numerous studies were aimed to detect and characterize various tumor markers in patients with oral planocellular carcinoma in order to reduce mortality and morbidity rates of these patients, as well as to establish the correlation between the expression of specific tumor marker and prognostic outcome. The aim of this study was to determine pathohistological characteristics of tumor and peritumor tissue in patients with oral planocellular carcinoma, with special regard to the expression of Bcl-2, as well as to point out the significance of clinicomorphological correlations for clinical use. **Methods.** Sixty-two patients with oral planocellular carcinoma, stage II and III, were examined. The patients were surgically treated for this condition at the Clinic for Maxillofacial Surgery, Military Medical Academy, Belgrade. Surgical specimens were obtained from both tumor and peritumoral tissues. Patohistologic degree of tumor differentiation and the immunohistochemical expression of Bcl-2 were determined for each specimens. **Results.** Twenty-four (39%) patients had tumor dimension T1, while six (9%) and thirty-two (52%) patients had tumor dimension T2 and T3, respectively. Patohistologic analysis of peritumor connective, fat, muscle and bone tissue samples confirmed the presence of tumor infiltration. The expression of Bcl-2 in peritumor tissue samples correlated significantly with tumor's histologic grade ($\rho = 0.468$; $p < 0.001$), nuclear grade ($\rho = 0.430$; $p < 0.001$) and nucleocytoplasmic ratio ($\rho = 0.410$; $p = 0.001$). **Conclusion.** This results suggest that the expression of Bcl-2 in combination with patohistologic findings could have a prognostic value in patients with oral planocellular carcinoma.

Key words:

mouth neoplasms; carcinoma, squamous cell; tumor markers, biological; prognosis; treatment outcome; histological techniques; immunohistochemistry

Uvod

I pored zapaženog napretka u dijagnostici i terapiji oralnog planocelularnog karcinoma (OPK), tokom poslednje dve decenije, nije zabeleženo bolje petogodišnje preživljavanje bolesnika sa OPK. Dijagnostički i terapijski pristup zasnovan na kliničkim, morfološkim i patohistološkim elementima zaostaje za promenama prisutnim na molekularnom nivou, tako da primenjena terapija nije dovoljno efikasna. Stoga, uvek aktuelno pitanje koje se nameće istraživačima i kliničarima je iznalaženje kliničke primene novih dijagnostičkih i terapijskih pristupa u lečenju bolesnika sa OPK¹⁻³.

U cilju uspešnije prognoze i terapije za bolesnike sa OPK, pored patohistološke analize ispitivana je i ekspresija mnogobrojnih markera u tumorskom tkivu ovih bolesnika. Među mnogobrojnim markerima najčešće su upotrebljavani: p53, HER-2, EGFR, VEGFR, kao i Bcl-2 koji je zbog neusađenih podataka iz literature ocenjivan kao „enigmatičan“ prognostički marker⁴⁻⁶.

Zahvaćenost hirurške margine tumora tumorskim ćelijama češće se javlja kod OPK sa visokim gradusom i sa visokim stepenom maligniteta i može predstavljati direktan ili indirektan pokazatelj progresije bolesti u praćenju petogodišnjeg preživljavanja⁷.

Cilj ovog rada bio je da se utvrde patohistološke karakteristike tumorskog i peritumorskog tkiva bolesnika sa OPK, proceni stepen ekspresije markera Bcl-2, da se ukaže na značaj korelacije kliničkomorfoloških parametara kao i na mogućnost primene ovih rezultata u kliničkoj praksi.

Zbog značajne uloge proteina Bcl-2 kao protoonkogen, kao i njegove centralne uloge u regulaciji apoptoze⁸, naročito pažnju posvetili smo ekspresiji ovog markera u tkivu hirurške margine kod bolesnika sa OPK. Posebno je naglašen značaj korelacije stepena ekspresije Bcl-2 u peritumorskom tkivu sa različitim patohistološkim parametrima za procenu uspešnosti terapijskog pristupa.

Metode

Retrospektivno/prospektivnom studijom obuhvaćena su 62 bolesnika u II stadijumu po TNM klasifikaciji (T-tumor, N-limfni čvor, M-metastaza) (28 bolesnika) i III stadijumu (34 bolesnika) OPK, operisana u Klinici za maksilofacijalnu hirurgiju Vojnomedicinske akademije (VMA) u Beogradu, u periodu od oktobra 1995. do juna 2009. godine. Nakon operacije tumora ove regije urađena je patohistološka verifikacija tumorskog tkiva u Institutu za patologiju VMA. Posle standardne morfološke dijagnostike na tkivnim preseccima fiksiranim u formalinu i ukalupljenim u parafin vršene su imunohistohemijske (IHH) analize u Laboratoriji za imunohistohemiju i eklektronsku mikroskopiju Instituta za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu.

Klinički parametri relevantni za praćenje toka bolesti obuhvatali su određivanje stadijuma TNM bolesti, analizu karakteristika tumora (histološki i nukleusni gradus tumora), vrstu operacije i postoperativni tok, komplikacije posle operacije (krvarenje, infekcija i dehiscencija rane i dr).

Na redovne kontrolne preglede, u cilju utvrđivanja praćenja pojave lokalnog recidiva, kao i regionalnih i/ili udaljenih metastaza, bolesnici su dolazili po završetku lečenja (hirurgija i zračenje) jednom mesečno prve godine, svaka dva meseca u toku druge godine, svaka tri meseca u toku treće godine, a u kasnijem toku na šest meseci do godinu dana. Na svakom kontrolnom pregledu, osim kliničkog pregleda i laboratorijskih analiza krvi, svim bolesnicima urađene su i radiografske analize srca i pluća, ultrazvuk operisane regije i abdomena, a bolesnicima kod kojih je postojala sumnja na pojavu lokalnog recidiva ili regionalnih metastaza urađeni su i kompjuterizovana tomografija (CT) i nuklearna magnetna rezonanca (NMR). Kod svih bolesnika započeta je postoperativna zračna terapija u planiranom roku i svi bolesnici primili su punu terapijsku dozu zračne terapije.

Za patohistološku analizu uzorci tumorskog tkiva fiksirani su u 5% puferisanom, neutralnom formalinu i obrađeni u V.I.P. Sakura aparatu za automatsku fiksaciju, dehidraciju i prožimanje tkiva, a potom ukalupljeni u parafin. Iz parafinskih blokova tkivo je sečeno na debljinu 5–7 µm, tkivni preseccer montirani na posebne visokoadherentne pločice (*Super-Frost*) i sušeni na temperaturi od 56 °C u toku jednog sata.

Određivan je histološki i nukleusni gradus tumora, mitotski indeks, nukleocitoplazmatski odnos, opseg nekroze tumorskog tkiva, stepen infiltracije peritumorskog vezivnog, masnog, mišićnog tkiva i kosti, kao i infiltracija u peritumorske limfne sudove, vene i arterije. Stepem infiltracije peritumorskog vezivnog, masnog, mišićnog tkiva i kosti određivan je na osnovu opsega infiltracije i označavan na sledeći način: 0 – nema infiltracije; 1 – infiltracija prisutna 0,5 cm od ivice tumora; 2 – prisustvo infiltracije u 0,5–1 cm od ivice tumora; 3 – infiltracija prisutna u peritumorskom tkivu > 1cm od ivice tumora. Za markiranje tumorskih ćelija u peritumorskom tkivu korišćena su monoklonska i poliklonska antihumana antitela. Vizuelizacija ovih markera vršila se primenom visokosenzitivne i specifične IHH metode, obeležene streptavidin-biotin kompleksne metode (LSAB+-HRP kit).

U imunopatološkoj analizi materijala primenom određenih tumorskih markera (PCNA, HER-2, Bcl-2 i CD31) semikvantitativnom metodom određeni su prisustvo i broj tumorskih ćelija u peritumorskom tkivu. Na osnovu intenziteta bojenja i broja imunoreaktivnih ćelija nalaz je označen na sledeći način: 0 – nema imunoreaktivnih ćelija; 1 – slabo bojenje, retke pozitivne ćelije; 2 – umereno bojenje, mali broj pozitivnih ćelija; 3 – intenzivno bojenje, veći broj pozitivnih ćelija. U ovom radu posebna pažnja je usmerena na stepen ekspresije markera Bcl-2 u tumorskom i peritumorskom tkivu ispitivanih bolesnika.

Za praćenje postoperativnog toka bolesti korišćeni su standardni klinički pregledi za ocenu pojave recidiva tumora u 2–10-godišnjem periodu, prvenstveno kontrola prisustva potkožnih promena na delu operativnog polja kao i prisustvo lokoregionalne limfadenopatije.

Za statističku obradu podataka korišćen je komercijalni statistički paket (softver) za PC računare (SPSS for Windows; Ver.10.0). U cilju statističkog testiranja normalnosti raspodele ispitivanih obeležja korišćen je Kolmogorov-Smirnovljevi test, a u cilju testiranja međugrupnih razlika

primenjeni su Kruskal-Wallis-ov test i ANOVA, u zavisnosti od tipa varijable. Korelacija određenih obeležja ispitivana je Spirmanovim koeficijentom korelacije rangova (*Spearman's rho* – ρ). Vremenski intervali bez ponovnog javljanja bolesti (dužina remisije) izračunavani su Kaplan–Meire-ovim testom i upoređivani su između grupa pomoću Log–Rank testa.

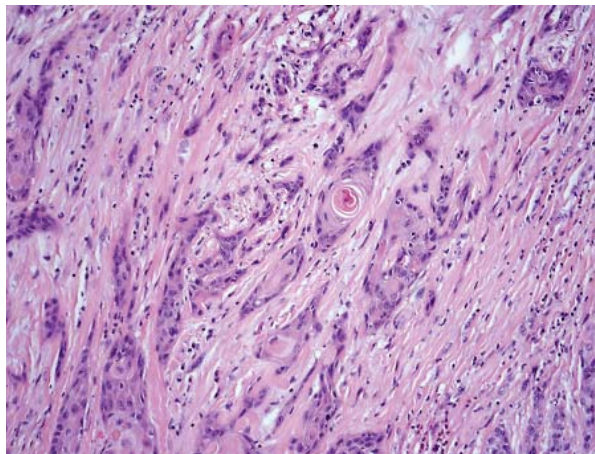
Rezultati

U retrospektivno-prospektivnoj studiji analizirana su 62 bolesnika, oba pola, koji su operisani od OPK u II stadijumu i III stadijumu bolesti (IIIa i IIIb), podeljeni u tri grupe i prikazani na onkološkom konzilijumu za maligne bolesti glave i vrata. Utvrđen je OPK II stadijuma kod 28 bolesnika i III stadijuma kod 34 bolesnika, pri čemu IIIa kod 13 bolesnika i IIIb kod 21 bolesnika. Razlika u prosečnoj starosti ispitanika, između tri ispitivane grupe prema stadijumu bolesti, nije bila statistički značajna (ANOVA, $F = 0,576; p > 0,05$).

Kliničkim pregledom analizirani su parametri značajni za praćenje toka bolesti. Standardnim TNM sistemom klasifikacije klinički je određena veličina primarnog tumora (T). U analiziranoj grupi bolesnika utvrđeno je da 24 bolesnika (u II stadijumu bolesti) imaju veličinu tumora T1, 6 bolesnika (4 u stadijumu II i 2 u stadijumu IIIa) veličinu tumora T2 i da 32 bolesnika (11 u stadijumu IIIa i 21 u stadijumu IIIb) imaju veličinu primarnog tumora T3. Bolesnici sa veličinom primarnog tumora T4 nisu bili uključeni u ovu studiju (tabela 1). Prosečna izmerena veličina tumora iznosila je 3,35 cm, uz standardnu grešku 0,19 cm. Najmanji izmereni tumor imao je prečnik 0,50 cm, a najveći 6 cm, sa medijanom 4 cm. Distribucija veličine tumora nije pratila normalnu raspodelu, što je testirano Kolmogorov-Smirnovljevim testom ($K-S Z = 1,780; p = 0,004$). Veća prosečna veličina tumora utvrđena je u grupi bolesnika operisanih u IIIb stadijumu, u odnosu na bolesnike iz II i IIIa stadijuma OPK. Međutim, opisana razlika nije statistički značajna. U cilju ispitivanja korelacije kli-

nički nalaz je upoređivan sa analizom patohistoloških karakteristika tumora.

Značajne karakteristike primarnog tumora predstavljaju histološki i nukleusni gradus, koji su utvrđeni patohistološkom analizom. Svi ispitanici su imali OPK bez udaljenih metastaza u vreme ispitivanja. Infiltracija tumora u peritumorskom tkivu verifikovana je patohistološkom analizom okolnog vezivnog (slika 1), masnog, mišićnog tkiva i kosti koji su bili zahvaćeni resekcijom, počevši od makroskopskog nalaza ivice tumora do hiruške ivice (margine).



Sl. 1 – Infiltracija tumora u vezivno tkivo (hemotoksilin-eozin, uvećanje 100)

Uočene su značajne razlike između stepena infiltracije tumorskih ćelija u peritumorskom vezivnom tkivu kod bolesnika u različitim stadijumima OPK (tabela 2).

Imunohistohemijska analiza ekspresije proteina Bcl-2 pokazala je slabo imunoreaktivno bojenje u tumorskim ćelijama kod 25 bolesnika, od kojih je 11 bilo u stadijumu II, 5 u IIIa i 9 u stadijumu bolesti IIIb (tabela 3) (slika 2).

Tabela 1
Veličina tumora i stadijum bolesti kod obolelih od planocelularnog karcinoma

Veličina tumora	Stadijum II	Stadijum III		Ukupno
		IIIa	IIIb	
T1	24	0	0	24
T2	4	2	0	6
T3	0	11	21	32
Ukupno	28	13	34	62

T1 – tumor prečnika do 2 cm, T2 - tumor prečnika 2–4 cm; T3 - tumor veći od 4 cm

Tabela 2
Infiltracija tumora u peritumorsko vezivno tkivo i stadijum bolesti kod obolelih od oralnog planocelularnog karcinoma

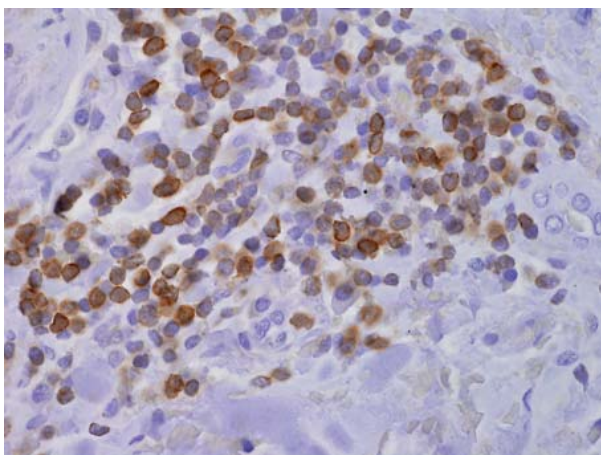
Infiltracija tumora u vezivno tkivo	Stadijum II	Stadijum III		Ukupno
		IIIa	IIIb	
VT-0	0	0	0	0
VT-1	26	5	5	36
VT-2	2	6	13	21
VT-3	0	2	3	5
Ukupno	28	13	34	62

VT-0 – nema infiltracije u vezivno tkivo; VT-1 - infiltracija u vezivno tkivo 0,5 cm od ivice tumora;
VT-2 - prisustvo infiltracije u 0,5–1 cm od ivice tumora;
VT-3 - infiltracija prisutna u vezivnom tkivu > 1 cm od ivice tumora

Tabela 3
Ekspresija Bcl-2 imunoreaktivnih ćelija u peritumorskom tkivu i stadijum bolesti kod obolelih od plancelularnog karcinoma

Bcl-2	Stadijum II	Stadijum III		Ukupno
		IIIa	IIIb	
Bcl-2-0	17	8	12	37
Bcl-2-1	11	5	9	25
Bcl-2-2	0	0	0	0
Bcl-2-3	0	0	0	0
Ukupno	28	13	34	62

Bcl-2-0-nema imunoreaktivnih ćelija; Bcl-2-1 – slabo bojenje, retke pozitivne ćelije; Bcl-2-2 – umereno bojenje, mali broj pozitivnih ćelija; Bcl-3 – intenzivno bojenje, veći broj pozitivnih ćelija



Sl. 2 – Tumorske Bcl-2-pozitivne ćelije u vezivnom tkivu (imunohistoohemijsko bojenje, uvećanje 400x)

Razlike u stepenu ekspresije proteina bcl-2 u ćelijama peritumorskog tkiva, u odnosu na stadijum bolesti, nisu bile statistički značajne, što je potvrđeno primenom Kruskal-Wallis-ovog testa ($\chi^2 = 0,086$; $p > 0,05$).

Karakteristike značajne za praćenje toka bolesti podrazumevale su analizu povezanosti parametara koji bi mogli da utiču na tok već dijagnostikovane maligne bolesti. Kao početni parametar određivan je preoperativni stadijum bolesti za svakog bolesnika. Primenjujući TNM sistem klasifikacije, 28 bolesnika bilo je u II, a 34 bolesnika u III stadijumu bolesti (13 u stadijumu IIIa i 21 u stadijumu IIIb). Analizirana je distribucija parametara karakterističnih za primarni tumor u različitim stadijumima bolesti u cilju utvrđivanja njihove učestalosti koja bi mogla biti pokazatelj proširenosti tumora i dužine ukupnog preživljavanja. Među ovim parametrima poseban prediktivni značaj ima veličina (prečnik) primarnog tumora, koja je statistički bila značajno manja kod bolesnika u stadijumu II nego kod bolesnika u stadijumu bolesti IIIa i IIIb (tabela 1).

Primenom Spirmanovog koeficijenta korelacije rangova utvrđena je statistički visokoznačajna pozitivna korelacija između histološkog gradusa i stepena infiltracije peritumorskog vezivnog ($\rho = 0,636$; $p < 0,001$) i mišićnog tkiva ($\rho = 0,646$; $p < 0,001$). Statistički značajna korelacija utvrđena je i između nuklearnog gradusa, sa jedne strane, i stepena infiltracije peritumorskog vezivnog ($\rho = 0,629$; $p < 0,001$) i mišićnog tkiva ($\rho = 0,661$; $p < 0,001$), sa druge strane. Takođe, pokazano je da je stepen infiltracije peritumorskog vezivnog,

masnog i mišićnog tkiva u pozitivnoj korelaciji sa nukleocitoplazmatskim odnosom tumorskih ćelija (vezivno tkivo, $\rho = 0,406$; $p = 0,001$; masno tkivo, $\rho = 0,312$; $p = 0,014$; mišićno tkivo, $\rho = 0,462$; $p < 0,001$). Utvrđena je statistički visokoznačajna pozitivna korelacija između stepena ekspresije proteina Bcl-2, sa jedne strane, i histološkog gradusa tumora ($\rho = 0,468$; $p < 0,001$), nukleusnog gradusa tumora ($\rho = 0,430$; $p < 0,001$) i nukleocitoplazmatskog odnosa u tumorskim ćelijama ($\rho = 0,410$; $p = 0,001$).

Diskusija

O uzrocima i kliničkoj slici planocelularnog karcinoma jezika i poda usta, uključujući i prognozu zasnovanu na TNM sistemu određivanja stadijuma bolesti i značaju histološkog nalaza, danas se mnogo zna. To, međutim, nije dovelo do značajnijeg poboljšanja u lečenju bolesnika sa OPK, pa je pažnja istraživača sve više usmerena ka rasvetljavanju molekularne osnove porekla ovog tipa karcinoma. To bi doprinelo utvrđivanju biomarkera za ranu detekciju, kao i prognostičkih i prediktivnih markera koji bi pomogli u donošenju odluke oko izbora efikasnijeg modaliteta lečenja^{1, 2, 9, 10}.

Oralni planocelularni karcinom nastaje kao krajnji stadijum višestepenog procesa kancerogeneze, koji je vođen genetskim i epigenetskim oštećenjima, uglavnom uzrokovanih delovanjem kancerogenih agenasa. Ključnu ulogu u ovom procesu imaju dve klase gena: protoonkogeni i tumor supresor geni, koji su neophodni za kontrolu procesa proliferacije, diferencijacije i smrti ćelije.

U cilju istraživanja metastatskog potencijala tumora često je analiziran niz genetskih parametara p53, Bcl-2, HER-2, EGF, VEGF koji su poređeni sa više histopatoloških parametara (prisustvo keratinizacije, nukleusni pleomorfizam, broj mitoze, način i stepen invazije i infiltracija limfocitima i dr)^{6, 11, 12}.

Mnogobrojna istraživanja usmerena su na otkrivanje i utvrđivanje osobina markera rasta kod OPK sa ciljem da se snizi morbiditet i mortalitet, kao i uspostavi korelacija između stepena ekspresije određenog markera i prognoze bolesti. Nova saznanja o molekularnim mehanizmima razvoja tumora podstakla su pokušaje da se molekularna genetika iskoristi za rešavanje nekoliko bitnih kliničkih problema, kao što su rana detekcija premaligne i maligne lezije, rano otkrivanje lokalnog recidiva i udaljenog širenja, rana prevencija sekundarnog tumora i, posebno, selekcija bolesnika za specifično lečenje^{1, 10, 13-15}.

Dok pojedine oblasti onkologije već godinama koriste prednosti specifičnih tumorskih markera, za OPK se još ne naziru prava rešenja. Najviše pažnje posvećeno je izučavanju gena p53, bilo izolovano ili u panelu sa drugim potencijalnim markerima, kao što su ciklin D1, TGF, EGF, VEGF, E-kadherin i kolagen VIII5.

Osnovni morfološki elementi pomoću kojih se procenjuje stepen maligniteta, kao što je histološki gradus, nukleusni gradus, mitotski indeks, nukleocitoplazmatski odnos, sa našim rezultatima, sa jedne strane, čine statistički značajnu korelaciju prema stepenu infiltracije tumorskog tkiva u analiziranoj margini, kao i u vezivnom, masnom i mišićnom tkivu.

Patogeneza i stadijumi bolesti, s jedne, a odgovor na lečenje i prognoza, s druge strane, procenjuju se stopom petogodišnjeg preživljavanja, pri čemu se ovaj period meri od momenta dijagnostikovanja maligne bolesti, a varira zavisno od lokalizacije. Postoje mnoge studije koje su pokazale razliku u stopi preživljavanja obolelih od oralnog karcinoma. Rezultati pojedinih studija pokazuju slabo preživljavanje bolesnika kojima je dijagnostikovano OPK sa povećanom ekspresijom Bcl-2, a kod kojih je primenjena samo hirurška terapija. Nešto bolju prognozu imali su bolesnici kod kojih je, pored hirurške terapije, primenjena i radioterapija¹⁶⁻¹⁸.

Oralni planocelularni karcinom ne pokazuje značajna antigena svojstva. U današnje vreme, kada se zna za više od sto kako dijagnostičkih, tako i prognostičkih parametara malignih tumora, nema specifičnih markera za OPK. Naš izbor IHH markera (PCNA, HER-2, CD31, Bcl-2) učinjen je na osnovu mogućnosti, ali i kao procena korišćenja nove kombinacije markera, za razliku od često primenjivanih IHH markera kod OPK, kao što su p53, EGF, VEGF i dr.

Za sada je jasno da ne postoji nijedan specifičan marker za OPK. Podaci u literaturi obiluju različitim nalazima. Do sada, najviše pažnje posvećeno je izučavanju ekspresije gena p53, bilo izolovano ili u panelu sa drugim potencijalnim markerima, kao što su ciklin D1, TGF, EGF, VEGF, E-kadherin, kolagen VII^{4, 19, 20}.

Jedan od najčešće primenjivanih IHH markera u dosadašnjim istraživanjima OPK je p53. U pojedinim oblastima onkologije već godinama koriste se prednosti specifičnih tumorskih markera, dok se za OPK još uvek ne naziru prava rešenja.

Rezultati dosadašnjih ispitivanja parametara proliferacije pokazuju pozitivnu korelaciju imunohistohemijski detektovanih proteinskih produkata PCNA, Ki-67 sa gradusom tumora i kliničkim stadijumom OPK. Za identifikaciju endotelnih ćelija u OPK korisni su CD31, VEGF i dr.^{19, 21-23}

Još uvek je nejasan prognostički značaj markera Bcl-2 kod bolesnika sa OPK koji su hirurški lečeni. Studija Yuen et al¹⁵ obuhvatila je imunohistohemijsku analizu tkiva 73 planocelularna karcinoma jezika na prisustvo ekspresije Bcl-2 i urađena je korelacija sa kliničkopatološkim nalazima. Od 73 tumora, ekspresija Bcl-2 bila je prisutna u 11% uzoraka. U ovoj studiji nije utvrđena korelacija između ekspresije Bcl-2,

s jedne i gradusa tumora, stadijuma tumora i prisustva metastaza u limfnim nodusima, s druge strane. Takođe, nije utvrđen prognostički značaj u ishodu preživljavanja navedenih bolesnika koji su hirurški lečeni, što ukazuje na to da određivanje stepena ekspresije Bcl-2 ima minorni značaj kod bolesnika sa planocelularnim karcinomom jezika^{15, 24, 25}.

Geni čiji proteinski produkti predstavljaju regulatore procesa apoptoze imaju kritičnu ulogu u razvoju i progresiji OPK. Rezultati nekih studija pokazali su da ekspresija onkoproteina Bcl-2 predstavlja nezavisan prognostički parametar i pokazuje negativnu korelaciju sa ekspresijom mutiranog p53 u istom stadijumu karcinoma¹⁷.

Da bi uradili predloženu analizu tkiva u hirurškoj margini OPK opredelili smo se, pored detaljnog patohistološkog pregleda, za nama dostupne IHH markere, koji su značajni, kako u prepoznavanju maligne ćelije, tako i za ocenu prognoze i procesa širenja maligne bolesti. Upotrebljeni su PCNA, Bcl-2, HER-2 i CD31. Naši rezultati ukazuju na to da je ekspresija ispitivanih markera u peritumorskom tkivu i vaskularnim elementima tumora visokog stepena maligniteta u korelaciji sa lošom prognozom i kraćim periodom preživljavanja bolesnika nakon operacije

Ekspresije proteina Bcl-2 bila je zastupljena u 40% ispitivanih tumora. Neusaglašenost podataka iz literature koji se odnose na ekspresiju proteina bcl-2 u OPK može biti posledica različitih lokacija ovih maligniteta u oralnoj duplji. Kod laringealnih karcinoma pokazano je da je ekspresija Bcl-2 u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji sa gradusom tumora, odnosno da je znatno viši stepen ekspresije ovog proteina zabeležen u tumorima višeg stepena maligniteta. Za razliku od laringealnih karcinoma, dosadašnja ispitivanja ekspresije Bcl-2 u OPK nisu potvrdila ovakav nalaz^{24, 25}.

Zaključak

Dobijeni rezultati ukazuju na to da se genetski markeri mogu koristiti za rešavanje značajnih kliničkih problema, kao što su rano otkrivanje premalignih i malignih lezija, rano otkrivanje lokalnog recidiva i udaljenog širenja, rana prevencija sekundarnog tumora i posebno selekcija bolesnika za primenu specifičnog terapijskog protokola.

Saznanja u ovom radu proistekla su iz jednog novog pristupa izučavanju OPK gde je primenjena korelacija kliničkog praćenja hirurškog i zračnog lečenja sa mnogobrojnim patohistološkim analizama i imunohistohemijskom ekspresijom markera koji su ranije manje ispitivani, a posebno sa morfološkim elementima u tkivima koja ulaze u sastav hirurške margine OPK.

Rezultati ukazuju na to da Bcl-2 u kombinaciji sa određenim patohistološkim parametrima može da bude značajan prognostički faktor, pa mu treba posvetiti više pažnje u okviru multidisciplinarnog istraživanja prognoze OPK. Bolje razumevanje uloge pojedinih markera i određivanje prisustva malignih ćelija u različitim tkivima hirurške margine treba da doprinese poboljšanju hirurškog lečenja OPK.

L I T E R A T U R A

1. *Kožomara R, Jović N, Vukelić-Marković S, Bročić M, Dimitrijević J, Nikolajević S.* Importance of histopathological analysis for diagnosis, treatment and follow-up of patients with squamocellular carcinoma of the tongue and mouth floor. *Arch Oncol* 2002; 10(Suppl 1): 139–40.
2. *Dimitrijević M, Ješić S, Konstantinović V.* Incidence and mortality of oral cavity carcinomas in central Serbia. *J BUON* 2001; 6: 183–7.
3. *Dimitrijević J.* Clinical pathology. *Srp Arh Celok Lek* 2006; 134(Suppl 1): 78–83. (Serbian)
4. *Wilson GD, Saunders MI, Dische S, Richman PI, Daley FM, Bentzen SM.* Bcl-2 expression in head and neck cancer: an enigmatic prognostic marker. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 49(2): 435–41.
5. *Rodrigo JP, Coto E, González MV, Maldonado M, Suárez C.* P53 allelic loss and outcome in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2001; 258(5): 255–8.
6. *Monteiro LS, Diniz-Freitas M, Garcia-Caballero T, Forteza J, Fraga M.* EGFR and Ki-67 expression in oral squamous cell carcinoma using tissue microarray technology. *J Oral Pathol Med* 2010; 39(7): 571–8.
7. *Scully C, Sudbo J, Speight PM.* Progress in determining the malignant potential of oral lesions. *J Oral Pathol Med* 2003; 32(5): 251–6.
8. *Chao DT, Korsmeyer SJ.* BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 395–419.
9. *Lo Muscio L, Santarelli A, Panzarella V, Campisi G, Carella M, Ciavarella D, et al.* Oral squamous cell carcinoma and biological markers: an update on the molecules mainly involved in oral carcinogenesis. *Minerva Stomatol* 2007; 56(6): 341–7. (English, Italian)
10. *Smilek P, Dusek L, Veselý K, Rottenberg J, Kostrica R.* Prognostic significance of mitotic and apoptotic index and the DNA cytometry in head and neck cancer. *Neoplasma* 2005; 52(3): 199–207.
11. *Papavasileiou D, Tosios K, Christopoulos P, Goutas N, Vlachodimitropoulos D.* Her-2 immunohistochemical expression in oral squamous cell carcinomas is associated with polysomy of chromosome 17, not Her-2 amplification. *Head Neck Pathol* 2009; 3(4): 263–70.
12. *Lopes MA, Nikitakis NG, Reynolds MA, Ord RA, Sauck J Jr.* Biomarkers predictive of lymph node metastases in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* 2002; 60(2): 142–7; discussion 147–8.
13. *Lothaire P, de Azambuja E, Dequanter D, Lalami Y, Sotiriou C, Andry G, et al.* Molecular markers of head and neck squamous cell carcinoma: promising signs in need of prospective evaluation. *Head Neck* 2006; 28(3): 256–69.
14. *Đukić V, Janošević LjB, Dimitrijević M, Damjanović SS., Peško P, Dotlić J.* Genetic markers for head and neck cancers – current state of art and perspectives. *Jugosl Med Biochem* 2003; 22(4): 273–82. (Serbian).
15. *Yuen AP, Lam KY, Choy JT, Ho WK, Wong LY, Wei WI.* Clinicopathologic significance of bcl-2 expression in the surgical treatment of oral tongue carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 2002; 28(6): 667–72.
16. *van Oijen MG, Leppers Vd Straat FG, Tilanus MG, Slootweg PJ.* The origins of multiple squamous cell carcinomas in the aerodigestive tract. *Cancer* 2000; 88(4): 884–93.
17. *Friedman M, Lim JW, Manders E, Schaffner AD, Kirschenbaum GL, Tanyeri HM, et al.* Prognostic significance of Bcl-2 and p53 expression in advanced laryngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2001; 23(4): 280–5.
18. *Gallo O, Boddi V, Calzolari A, Simonetti L, Trovati M, Bianchi S.* bcl-2 protein expression correlates with recurrence and survival in early stage head and neck cancer treated by radiotherapy. *Clin Cancer Res* 1996; 2(2): 261–7.
19. *Bročić M, Kožomara R, Cerović S, Jović N, Vukelić-Marković S, Stosić S.* Clinical significance of vascular endothelial growth factor expression in patients with carcinoma of the mouth floor and tongue. *Vojnosanit Pregl* 2009; 66(6): 440–8.
20. *Motta Rda R, Zettler CG, Cambruzzi E, Jotz GP, Berni RB.* Ki-67 and p53 correlation prognostic value in squamous cell carcinomas of the oral cavity and tongue. *Braz J Otorhinolaryngol* 2009; 75(4): 544–9.
21. *Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CC, Kellock DB, Watkins JA, et al.* Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 1990; 162(4): 285–94.
22. *Can B, Sökmensüer C.* Clinicopathologic features, cellular differentiation, PCNA and P53 expressions in gastrointestinal stromal tumors. *Hepatogastroenterology* 2003; 50 Suppl 2: ccxliii–ccxlvi.
23. *Bayazıt Y, Bakır K, Ucak R, Mumbuc S, Özer E, Kanlıkama M.* Clinical and histopathological correlates of the proliferative activity in squamous cell laryngeal carcinoma. *Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord)* 2002; 123(1): 43–6.
24. *Jordan RC, Catzavelos GC, Barrett AW, Speight PM.* Differential expression of bcl-2 and bax in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1996; 32B(6): 394–400.
25. *Xie X, Clausen OP, De Angelis P, Boysen M.* The prognostic value of spontaneous apoptosis, Bax, Bcl-2, and p53 in oral squamous cell carcinoma of the tongue. *Cancer* 1999; 86(6): 913–20.

Primljen: 9. XI 2010.
Prijvaćen: 23. XI 2010.